UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

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

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Biologie et écologie des forêts et des agrosystèmes

par **Delphine NOËL**

Sous la direction de Mme Mélanie MOREL-ROUHIER
et M. Rodnay SORMANI

Caractérisation de mutants de *Phanerochaete chrysosporium* résistants à des extractibles de bois

Soutenance le 5 juillet 2023

Membres du jury :

Directeurs de thèse :

Mme Mélanie MOREL-ROUHIER	PR. – UMR 1136, INRAE, Université de Lorraine
M. Rodnay SORMANI	MCF – UMR 1136, INRAE, Université de Lorraine

Président de jury :

M. Philippe SILAR	PR. – UMR 8236, CNRS, Université Paris Cité

Rapportrices :

Mme Sabine FILLINGER	DR. – UMR 1290, BIOGER, INRAE, Université Paris-Saclay
Mme Marie-Noëlle ROSSO	DR. – UMR 1163, INRAE, Université Aix-Marseille

Examinateur :

M. Damien BLAUDEZ	MCF – UMR 7360, CNRS, Université de Lorraine

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement Mme Sabine Fillinger et Mme Marie-Noëlle Rosso d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en qualité de rapportrices, ainsi que M. Damien Blaudez et M. Philippe Silar en qualité d'examinateurs.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, Mme Lyuba Ryabova, Mme Annegret Kohler et M. Philippe Silar pour les précieux conseils et la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard.

Après toutes ces heures passées au laboratoire, il est l'heure des remerciements ! Ce fût 4 années de dur labeur mais également un vrai bonheur de travailler au sein de votre équipe, j'espère donc que mes remerciements seront à la hauteur de ce que vous m'avez apporté durant ces années au laboratoire.

Je tiens à remercier grandement mes deux directeurs de thèse, Rodnay et Mélanie. Merci infiniment pour vos conseils, votre patience, vos corrections et votre bienveillance incontestable.
Rodnay, ça remonte déjà à 8 ans…, et c'est grâce à mon premier stage en L2 à tes côtés que j'ai réalisé que la recherche était un domaine dans lequel je voulais m'investir pleinement. Tu m'avais fait part de la difficulté à réaliser une thèse et que j'allais en perdre quelques cheveux, il est vrai que la vie de thésard n'est pas un long fleuve tranquille... Un grand merci pour ta confiance, ton état d'esprit toujours positif, tes conseils pour m'améliorer, et de m'avoir offert l'opportunité de participer à tant de congrès : le GDR bois, le TOR de France et incontestablement notre envol pour Asilomar ! Je te remercie vivement pour tout ce que tu m'as apporté durant ces 4 années, notamment pour toutes tes relectures et corrections à ce manuscrit et à mes différents travaux !
Mélanie, un grand merci pour tout le temps que tu m'as accordé malgré ton planning plus que chargé ! Merci de m'avoir donné l'opportunité d'écrire une revue, bientôt publiée dans MB, pour laquelle tu as fait preuve d'une grande patience, et pour toutes les corrections que tu as faites sur ce manuscrit, je t'en suis très reconnaissante ! Je me dois également de rappeler ce congrès mémorable à Innsbruck que je ne risque pas d'oublier : les pistes de ski, la séance d'ouverture avec les chants tyroliens, les « goulash » sans viande et l'incontournable Blue Chip d'Innsbruck…! Merci infiniment pour tous ces beaux souvenirs, ta bienveillance, et pour ton aide des plus précieuses notamment durant cette dernière année de thèse.

Loïck, je te remercie pour tous ces moments passés ensemble. Entre les soirées à travailler, à lâcher prise, les pauses cigarettes et les craquages de fin de rédaction, tu auras été un binôme d'exception ! Merci pour m'avoir sauvé la vie plus d'une fois, notamment avec mes problèmes de clés, et tes compétences hors pair sur Excel qui m'ont fait gagner de nombreuses heures de travail... Caro, j'ai beaucoup apprécié nos discussions également, et je te souhaite beaucoup de courage pour ta fin de thèse.
Kévin, les moments ne se comptent plus avec toi aussi. Merci pour ta gentillesse démesurée et nos sorties hebdomadaires autour d'une bonne bière et d'un perrier. Je garderai toujours en souvenirs notre congrès en Californie situé à coté de la plage, avec nos soirées posters/apéro, la soirée fin de congrès (avec ta danse incroyable sur Cupid Shuffle) et les visites de San Francisco.
Julie, ton naturel est des plus agréables qui soit, n'y change rien. Je te dois un grand merci pour l'initiation au Golden Gate et toutes tes réponses à mes questions. Je te souhaite beaucoup de courage pour l'écriture de ton manuscrit, et je t'attends avec impatience pour nos sorties Phreyjous et Choupette (en espérant que la pluie n'en fasse pas partie).

Natacha, je crois qu'on te doit une médaille du courage pour avoir eu à partager ton bureau avec 3 doctorants en rédaction… Merci pour ta patience et les séances chocolats qui nous ont bien calmé, et bon courage à toi pour ta fin de thèse !

Jean-Pierre, un grand merci à toi pour les relectures et corrections des drafts d'articles, et pour tes anecdotes scientifiques incontournables !
Nicolas, que ce soit sur le plan scientifique ou humain, j'ai pris un vrai plaisir à discuter avec toi, merci pour ta bonne humeur et tes encouragements. Une pensée particulière pour tous les colis de cigarettes que tu m'as ramenés, un bon outil anti-stress.
Tiphaine, ma voisine de paillasse, merci pour ta bonne humeur quotidienne, les petites séances potins, et ta disponibilité face à mes urgences de FPLC.
Linda, je pense que tu mérites une distinction pour ton immense gentillesse. Merci pour toutes nos discussions et ton enthousiasme lors de chacune d'entre elles.
Eric, merci pour tous tes conseils relatifs à mon projet et nos discussions sur les post-docs que j'ai beaucoup appréciées. Je garderai en mémoire ta patience extrême lors de notre retour du congrès d'Innsbruck.
Benjamin P., merci beaucoup pour ton initiation et tes précieux conseils pour le Golden Gate, tes anectodes toujours inattendues et nos quelques séances de badminton.
Flavien, merci pour tous tes très bons conseils de biochimiste et tes compétences de brasseur hors pair qui nous ont désaltérées plus d'une fois.
Muriel, ou profileuse du végétal, merci pour ces bons moments passés pendant la pause déjeuner, je te souhaite plein de succès pour votre start-up avec Flavien.
Damien, merci pour toutes les plaques de chocolat et les glaces qui m'ont permis de combler mon stress et ton côté borderline que personne n'oubliera.

Merci également : à Jean-Michel pour ton sourire et ta gentillesse, les noces d'étain ne sauraient tarder avec Agathe ; à Raph et Marie-Laure, pour les discussions et la préparation des milieux qui m'a sauvé la vie plus d'une fois ; à Corinne, pour ta sympathie et ton aide constante avec Notilus, j'y arriverai un jour… ; à Sébastien, finalement l'association café/cigarette aura fait ses preuves pour la rédaction ; à Sylvain, pour les tips du dimanche pour rendre attrayant un poster ; à Jérémy, pour ta sagesse et tes conseils lors de mes réunions avec Rodnay ; à Arthur, pour les fonds de jazz au laboratoire ; à Arnaud, pour les cours que tu m'as confié et les explications associées; et à Emilie, j'ai apprécié nos petites discussions, il faudra qu'on présente Hortense à Edouard.

Les nouveaux doctorants, Nat, Laura, Alicia, Yanis, Zhichao, je vous souhaite bon courage pour votre thèse et votre futur dans les sciences. Margot, je te souhaite bon courage pour la suite également, j'espère que IAM deviendra ta demeure autant qu'elle fût la mienne. Un grand merci également à mes trois stagiaires, Laurie, Emilie et Lucas. Vous avez chacun fait preuve d'une motivation incroyable pour m'aider à faire progresser mon projet et pour cela je vous en suis très reconnaissante.

Il y a aussi tous les anciens que je ne peux oublier dans mes remerciements. Un grand merci : à Benjamin S., pour toute ton aide au début de ma thèse et pour le plasmide pBG102 qui a été indispensable au succès de mon projet ; à Johnny, pour m'avoir transmis les tips pour les clonages et le double hybride, je n'oublierai pas non plus tous tes moments de folie au laboratoire ; à Vuong, pour m'avoir confié tes collections de mutants ; à Alexis, pour tous ces bons moments passés avec toi à IAM, on se revoit très vite à Brabois ! Des sorties blob seront à prévoir. A Marion, pour ta générosité et t'être occupée de mes mesures de minéralisation lors de mes vacances ; à Elodie, pour ton enthousiasme en particulier lors des matchs de foot ; à Anna, pour les sorties au bar et les rotors que je n'arriverai jamais à porter ; à Julien

(ou Success Machine), pour les tips des logiciels et les sorties pokémon le week-end au parc de la Pépinière ; à Mélanie, pour la super soirée karaoké au laboratoire ; à Valette, pour ton énergie débordante dès 7h30 du matin ; et à Guillaume, pour m'avoir initié à Inskape.

Papa, maman, Johanna, merci beaucoup pour votre présence et votre soutien indéfectible, y compris pour les lectures et relectures du manuscrit qui n'étaient pas toujours très compréhensibles pour vous. Petit mot spécial pour les parents de ma petite filleule d'amour, merci pour toutes les vidéos qui m'ont fait le plus grand bien en cette fin de rédaction.

Les copains, Vincent, Charlotte, Justine, Cyril, Clara, Isma, Manon, Arthur et Julien. Quatre années comme vous le savez où ma vie s'est focalisée sur ce qui est écrit dans ce manuscrit, il est temps de reprendre très vite les guinguettes.

Joan, je n'ai pas de mot pour dire à quel point j'aimerais te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Cette thèse aurait été bien différente sans notre rencontre dès le premier jour. Merci pour ton soutien et tes encouragements irremplaçables qui m'ont redonné confiance en moi dans les moments les plus compliqués. Je remercie également ta maman pour sa bienveillance unique et les boîtes de chocolats hebdomadaires durant cette fin de thèse. Et bien sûr notre Phreyja, notre dose quotidienne d'affection et d'anti-dépresseur.

Liste des figures :

Figure 1. Apparence du bois attaqué par un champignon de pourriture blanche (*P. chrysosporium*) (Malviya, 2012).

Figure 2. Dégradation du bois par des champignons de pourriture blanche via une stratégie de dégradation dite simultanée (A et B) ou sélective (C et D) (Akhtar *et al.*, 1997).

Figure 3. Apparence du bois attaqué par un champignon de pourriture brune (Goodell, 2020).

Figure 4. Dégradation du bois par des champignons de pourriture brune (Blanchette, 2000).

Figure 5. Mécanisme employé par les champignons de pourriture brune pour dégrader la lignocellulose (adapté de Arantes *et al.*, 2012).

Figure 6. Dégradation du bois par des champignons de pourriture molle (Blanchette, 2000).

Figure 7. Structure et composition de la paroi des cellules végétales (adapté de Rytioja *et al.* 2014).

Figure 8. Structure des chaînes de cellulose (Dassanayake *et al.*, 2018).

Figure 9. Mécanisme d'action des enzymes impliquées dans la dégradation des polymères de cellulose (adapté de Andlar *et al.* 2018).

Figure 10. Mécanisme de dégradation oxydatif des polymères de cellulose par l'action des LPMOs (adapté de Vu *et al.* 2014).

Figure 11. Composés retrouvés au sein des polymères d'hémicelluloses (adapté de Pereira *et al.*, 2004).

Figure 12. Représentation schématique des structures des hémicelluloses de type xylane, galactomannane et xyloglucane (adapté de Glass *et al.* 2013).

Figure 13. Mécanisme d'action des CAZymes impliquées dans la dégradation des hémicelluloses (adapté de Glass *et al.* 2013).

Figure 14. Représentation schématique des structures des hémicelluloses de type glucuronoxylane et galactoglucomannane.

Figure 15. Structure des polymères de pectine (Schmitz *et al.*, 2019).

Figure 16. Mécanisme d'action des enzymes impliquées dans la dégradation des polymères de pectine (Glass *et al.*, 2013).

Figure 17. Perception de ressources carbonées et mécanismes de régulation de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'utilisation et la dégradation des polysaccharides de la lignocellulose chez *N. crassa* (Benz *et al.*, 2014; Coradetti *et al.*, 2012, 2013; Samal *et al.*, 2017; Seibert, 2016; Znameroski *et al.*, 2014).

Figure 18. Voies de biosynthèse du shikimate et de la phénylalanine (adapté de Tohge et Fernie, 2017).

Figure 19. Structure des monolignols (précurseurs des lignines) et des unités constitutives de la lignine après polymérisation (Jouanin et Lapierre, 2006).

Figure 20. Représentation des liaisons impliquées dans les polymères de lignine (Guadix-Montero et Sankar, 2018).

Figure 21. Représentation des structures majeures retrouvées dans les polymères de lignine (adapté de Guadix-Montero et Sankar 2018; Ralph *et al.* 2004).
Figure 22. Cycle catalytique des lignine peroxydases.
Figure 23. Structure de l'alcool vératrylique.
Figure 24. Représentation des structures de composés aromatiques phénoliques et non phénoliques et des radicaux correspondants après des réactions d'oxydation (Hofrichter, 2002).
Figure 25. Clivage de la liaison β-O-4 par les LiPs à partir d'un composé modèle de lignine non phénolique β aryl éther (Pollegioni *et al.*, 2015).
Figure 26. Cycle catalytique des manganèse peroxydases.
Figure 27. Mécanisme d'action des MnPs sur des composés phénoliques présents dans les polymères de lignine conduisant à la formation de CO_2 (Hofrichter, 2002).
Figure 28. Cycle catalytique des versatile peroxydases.
Figure 29. Cycle catalytique des laccases.
Figure 30. Voie de biosynthèse des composés phénoliques dérivés de la phénylalanine chez les végétaux (adapté de Tohge *et al.* 2013).
Figure 31. Représentation des familles de flavonoïdes en fonction de leur structure chimique.
Figure 32. Structure du resvératrol (A) et de la pinosylvine (B).
Figure 33. Biosynthèse des lignanes et néolignanes via la dimérisation d'unités phénylpropanoïdes (Zálešák *et al.*, 2019).
Figure 34. Classification des tannins (Khanbabaee et van Ree, 2001).
Figure 35. Structure d'une unité isoprène.
Figure 36. Structure des principaux acides gras insaturés retrouvés dans le bois (Jansson et Nilvebrant, 2009).
Figure 37. Utilisations et recherches de composés bioactifs issus de végétaux dans divers secteurs industriels (ex : cosmétique, médecine, agro-alimentaire, foresterie).
Figure 38. Système de détoxication chez les champignons : le Xénome (adapté de Del Cerro *et al.* 2021; Morel *et al.* 2013).
Figure 39. Enrichissement de plusieurs familles de cytochromes p450 chez des champignons Basidiomycètes dégradeurs de bois (ex : *P. chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *Postia placenta*, *Serpula lacrymans*) et spécificités d'oxydation associées à des composés aromatiques (adapté de Syed *et al.* 2014).
Figure 40. Propriétés ligandines des GSTs aux extractibles de bois (adapté de Barbier *et al.* 2020; Mathieu *et al.* 2012, 2013; Meux *et al.* 2013; Perrot *et al.* 2018; Schwartz *et al.* 2018).
Figure 41. Démarche scientifique pour caractériser des collections de mutants résistants à des molécules antifongiques.

Figure 42. Représentation schématique du cycle d'activation et d'inactivation des RAB GTPases par l'activité de leur familles partenaires régulatrices : les GEFs et les GAPs (adapté de Hutagalung et Novick, 2011).
Figure 43. Embranchement contenant la séquence protéique *Hs*RAB14 dans l'arbre phylogénétique des protéines RAB14 GTPases.
Figure 44. Purification des protéines recombinantes His-*Pc*RAB4 (A) et His-*Pc*RABba (B).
Figure 45. Principe de fonctionnement des tests d'activité GTPase avec le kit GTPase-Glo™ Assay.
Figure 46. Tests d'activité GTPase des protéines recombinantes His-*Pc*RAB4 et His-*Pc*RABba.
Figure 47. Représentation schématique des 3 isoformes de la protéine *Pc*DENND6.
Figure 48. Purification des versions sauvage (1) et mutante E234K (2) de l'isoforme « longueur intermédiaire » de *Pc*DENND6.
Figure 49. Profil de migration des protéines recombinantes *Pc*DENND6 (version sauvage de l'isoforme « longueur intermédiaire ») par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide 10 %.
Figure 50. Analyse des profils de migration des protéines recombinantes *Pc*DENND6 (version sauvage de l'isoforme « longueur intermédiaire ») en présence d'agents réducteurs et/ou après dénaturation par la température, par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide 10 %.
Figure 51. Mesures d'activité GTPase des versions sauvage et mutante (E234K) des protéines recombinantes *Pc*DENND6.
Figure 52. Tests d'activité GEF des versions sauvage et mutante (E234K) des protéines recombinantes *Pc*DENND6 pour la RAB GTPase *Pc*RAB4.
Figure 53. Tests d'activité GEF des versions sauvage et mutante des protéines recombinantes *Pc*DENND6 pour les GTPases *Pc*RAB4 et *Pc*RABba.
Figure 54. Tests d'activité GEF des protéines hDbs avec les GTPases Cdc42, RhoA et Rac1 et mesures des intensités de fluorescences pour les réactions contrôles contenant uniquement les GTPases (RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit).
Figure 55. Alignement multiple des séquences protéiques des RAB GTPases humaines.
Figure 56. Alignement multiple des séquences protéiques regroupées dans les embranchements contenant *Pc*RAB4 (A) et *Pc*RABba (B) dans les analyses phylogénétiques des protéines RAB14 GTPases.
Figure 57. Test d'interaction par double hybride entre les versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6 et les variants de *Pc*RAB4.
Figure 58. Test d'interaction par double hybride entre les versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6 et les variants de *Pc*RABba.
Figure 59. Confirmation des interactions détectées par double hybride entre les versions sauvage et mutante de l'isoforme « longueur intermédiaire » de *Pc*DENND6 et le variant *Pc*RABba T70L.
Figure 60. Représentation schématique des processus appelés « cascade de RAB GTPases » (adapté de Hutagalung et Novick, 2011).

Figure 61. Essais de minéralisation du bois de hêtre (A) et de peuplier (B) par le mutant *bag4* et la souche sauvage de *P. chrysosporium*.
Figure 62. Cartes des plasmides utilisés pour la production de protéines recombinantes.
Figure 63. Cartes des plasmides utilisés pour les tests d'interaction en double hybride.

Liste des tableaux :

Tableau 1. Représentation des différences génomiques des caractères liés à la dégradation du bois entre les champignons de pourriture blanche et brune ainsi que deux espèces définies comme pourriture grise. (adapté de Riley *et al.* 2014; Rytioja *et al.* 2014).
Tableau 2. Répertoire des CAZymes fongiques impliquées dans la dégradation des différents polysaccharides du bois (adapté de Hage et Rosso 2021).
Tableau 3. Identification de plusieurs cellulases conservées dans le sécrétome de *N. crassa*, *A. nidulans* et *P. chrysosporium* en réponse à des substrats lignocellulosiques (adapté de Znameroski *et al.* 2012).
Tableau 4. Occurrence des différentes structures et liaisons au sein des polymères de lignine dans les bois de feuillus et conifères (Guadix-Montero et Sankar, 2018).
Tableau 5. Exemples de flavonoïdes isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Valette *et al.* 2017).
Tableau 6. Exemples de stilbènes isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Valette *et al.* 2017).
Tableau 7. Exemples de lignanes isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Kawamura *et al.* 2004).
Tableau 8. Exemples de tannins isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Latté et Kolodziej 2000).
Tableau 9. Classification des terpènes en fonction de leur degré de polymérisation (adapté de Jansson et Nilvebrant 2009).
Tableau 10. Exemples de terpènes isolés du bois d'espèces végétales et répertoriés avec des activités antifongiques (adapté de Cheng *et al.* 2011).
Tableau 11. Composition en acides gras saturés et insaturés dans différents bois d'espèces végétales (*Pinus sylvestris*, *Picea abies* et *Betula pendula*) (Jansson et Nilvebrant, 2009).
Tableau 12. Mode d'action des extractibles de bois expliquant leur propriétés antifongiques (adapté de Valette *et al.* 2017).
Tableau 13. Tableau de synthèse des RAB GTPases partenaires des protéines à domaine DENN chez l'homme. (Linford *et al.*, 2012; Marat *et al.*, 2011).
Tableau 14. Conditions expérimentées et utilisées pour produire et purifier les versions sauvage et mutante de la protéine *Pc*DENND6.
Tableau 15. Récapitulatif des variants de RAB GTPases et des substitutions générées.

Tableau 16. Génotype des souches d'expression d'*E. coli* utilisées dans cette étude.

Tableau 17. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour les isoformes de *Pc*DENND6 dans les vecteurs d'expression pET-15b, pCARGHO1 et pBG102.

Tableau 18. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour *Pc*RAB4 et *Pc*RABba dans les vecteurs d'expression pET-15b.

Tableau 19. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour les isoformes de *Pc*DENND6 dans les vecteurs d'expression pGADT7 et pGBKT7.

Tableau 20. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour *Pc*RAB4, *Pc*RABba et *Pc*RAB11 dans les vecteurs pGAD et pGBK.

Tableau 21. Exemple de composés polluants qui sont dégradés par des souches de l'espèce *P. chrysosporium*.

Liste des articles scientifiques :

Article 1 : Noel *et al.*, 2021 – Advances in Botanical Research, 99, 151-173.
How to rot: A role for TOR. Interplay between carbon catabolite repression and TOR signaling pathway.

Article 2 : Noel *et al.*, 2023 – Microbial Biotechnology, 16, 1438-1455.
Modes-of-action of antifungal compounds: stressors and (target-site-specific) toxins, toxicants, or toxin-stressors.

Article 3 : Nguyen *et al.* - En préparation.
Characterisation of the rapamycin target FKBP12 in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.

Article 4 : Noel *et al.* – En préparation.
Forward genetics approach to identify mutants of *Phanerochaete chrysosporium* resistant to wood extractives from *Bagassa guianensis* Aubl leads to the identification of mutations in the DENND6 coding gene.

Abréviations

2,5-DMHQ : 2,5-diméthoxyhydroquinone

AA : Activités auxiliaires

AAO : Aryl alcohol oxydase

ABC : ATP Binding Cassette

ABTS : 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)

CAZymes : Carbohydrate-active enzymes

CCR : Carbon catabolite repression

CDH : Cellobiose dehydrogenase

CE : Carbohydrate estérase

CytP450 : Cytochrome P450

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FKBP12 : FK506 Binding Protein 12

FRB : FK506 Rapamycin Binding

GAP : GTPase-Activating Proteins

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

GH : Glycoside hydrolase

GOX : Glucose oxydase

GST : Glutathion transférase

GT : Glycosyltransférase

HBT : 1-hydroxybenzotriazole

LPMO : Lytic polysaccharide monooxygenase

LRET : Transfert d'électron intramoléculaire à longue distance

MFS : Major Facilitator Superfamily

MIC : Concentration minimale inhibitrice

MOX : Méthanol oxydase

P2O : Pyranose oxydase

PL : Polysaccharide lyase

PPIase : Activité peptidyl-prolyl cis trans isomerase

SEC-MALS : Size exclusion chromatography with multi-angle light scattering

TOR : Target of rapamycin

WT : Wild-type

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 16

Chapitre I : Diversité des modes trophiques chez les champignons 17

1. Introduction générale sur les champignons 17
2. Les champignons dégradeurs de bois 18
   2.1 Les champignons de pourriture blanche 19
   2.2 Les champignons de pourriture brune 21
   2.3 Les champignons de pourriture molle 23

Chapitre II : Mécanismes de dégradation et utilisation des polysaccharides du bois par les champignons 25

1. Anatomie et structure d'un substrat complexe à dégrader : le bois 25
2. Dégradation de la cellulose 28
   2.1 Structure de la cellulose 28
   2.2 Mécanismes de dégradation des polysaccharides de cellulose 29
3. Dégradation des hémicelluloses 33
   3.1 Structure des hémicelluloses 33
   3.2 Mécanismes de dégradation des polysaccharides d'hémicellulose 34
      3.2.1 Répertoire enzymatique 34
      3.2.2 Spécificités de substrats entre les champignons de pourriture brune et blanche 37
4. Dégradation de la pectine 38
   4.1 Structure de la pectine 38
   4.2 Mécanismes de dégradation des polysaccharides de pectine 39
5. Régulation des mécanismes de dégradation des polysaccharides du bois 40
   5.1 Facteurs transcriptionnels impliqués dans la dégradation et l'utilisation des polysaccharides du bois 41
   5.2 La répression du catabolisme de substrats carbonés 44
   5.3 Intersections entre la voie de TOR et la répression du catabolisme de substrats carbonés dans les processus de dégradation du bois chez les champignons 45

Article n°1 : How to rot: A role for TOR. Interplay between carbon catabolite repression and TOR signaling pathway. 46

1. Introduction 48
2. Interplays between glucose-induced carbon catabolite repression pathway and TOR signaling pathway in the yeast *S. cerevisiae* 49
3. Lessons from the "soft-rot" fungi 54
4. A role for TOR in basidiomycete "white-rot" fungi 59
5. Conclusion 63

Chapitre III : Mécanismes de dégradation de la lignine et détoxication des extractibles du bois par les champignons 70

1. Structure et composition de la lignine 70
2. Dégradation des polymères de lignine 74
   2.1 Les peroxydases de type II 75
      2.1.1 Les lignine peroxydases 75
      2.1.2 Les manganèse peroxydases 77
      2.1.3 Les versatile peroxydases 79
   2.2 Les laccases 79
   2.3 Enzymes impliquées dans la production extracellulaire de peroxyde d'hydrogène 80
3. Les extractibles : source de composés antifongiques 81
   3.1 Les composés phénoliques 81
      3.1.1 Les flavonoïdes 82
      3.1.2 Les stilbènes 84
      3.1.3 Les lignanes 85
      3.1.4 Les tannins 87
   3.2 Les terpènes 88
   3.3 Les composés aliphatiques 90
   3.4 Importance et propriétés antifongiques des extractibles de bois 91
      3.4.1 Fonctions et biotechnologies 91
      3.4.2 Propriétés antifongiques et modes d'action 92

Article n°2 : Modes-of-action of antifungal compounds: stressors and (target-site-specific) toxins, toxicants, or toxin-stressors. 94

Introduction……...95

Simultaneous inhibition of fungi by multiple antifungals in natural habitats/ conditions……96

Antifungal compounds are stressors and (target-site-specific) toxins, toxicants, or *toxin-stressors*…….99

Analysis of fungal metabolites……101

Chemical genetic screening to identify modes-of-action……102

Transcriptomics for assessing cellular damage and cellular responses……104

Chemoproteomics to identify which proteins are targetted by an antifungal compound……105

The target-based drug-discovery strategy……106

Concluding remarks……...107

4. Détoxication des composés antifongiques issus du bois 113
5. Modèle fongique pour la dégradation du bois : *Phanerochaete chrysosporium* 117

Contexte et objectifs du projet de thèse 119

RÉSULTATS 121

Chapitre I : Caractérisation de mutants de *P. chrysosporium* résistants à la rapamycine 122

Article n°3 : Characterisation of the rapamycin target FKBP12 in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. 122

1. Introduction 125
2. Materials and methods 126
   - Fungal growth conditions 126
   - Mutagenesis of *P. chrysosporium* conidia and screening for rapamycin resistant strains 126
   - Measurements of conidia germination by nephelometry 127
   - Analysis of mutations in *Pc*TOR1, *Pc*TOR2 and *Pc*FKBP12 alleles 127
   - 3D modeling of the FKBP12-rapamycin-TOR complex of *P. chrysosporium* 127
   - Genome resequencing of the *rap8* mutant 127
   - Phylogenetic analysis of FPR proteins in the fungal Ascomycota and Basidiomycota phyla .. 128
   - Heterologous expression of *Pc*FKBP12 in *Escherichia coli* and purification of the recombinant proteins 128
   - Peptidyl-prolyl isomerase activity 129
   - Size exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering 129
   - Functional complementation of Δ*fpr*1 *S. cerevisiae* strain by WT and *rap8 Pc*FKBP12 alleles 129
3. Results 130
   - Isolation of *P. chrysosporium* mutants resistant to rapamycin (*rap* mutants) 130
   - Identification of the causative mutations for rapamycin resistance in *rap* mutants 132
   - Phylogenetic analysis of FPR proteins in Ascomycetes and Basidiomycetes 134
   - *Pc*FKBP12 is a functional peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase which binds rapamycin 136
   - Expression of *PcFKBP12* allele in *Δfpr1 S. cerevisiae* restores rapamycin sensitivity in contrast to the *rap8 PcFKBP12* allele 139
4. Discussion and perspectives 140

Chapitre II : Caractérisation de mutants de *P. chrysosporium* résistants aux extractibles de bois de *B. guianensis* 151

Article n°4 : Forward genetics approach to identify mutants of *Phanerochaete chrysosporium* resistant to wood extractives from *Bagassa guianensis* Aubl leads to the identification of mutations in the DENND6 coding gene 152

1. Introduction 155
2. Materials and methods 156
   - Preparation of *Bagassa guianensis* wood extractives and fungal growth conditions 156
   - Mutagenesis of *P. chrysosporium* conidia and screening for BWE resistant strains 156
   - Conidial germination measurements by nephelometry 156

CO_2 measurements 157
Genomic DNA purification and sequencing 157
Single nucleotide polymorphism (SNP) identification 157
Analysis of mutations in AGR57_7124 alleles 158
Transformation of *P. chrysosporium* 158
Phylogenetic analysis of DENN Domain proteins in fungal, plant and animal kingdoms 159
3D models of *Pc*DENND6 and *Pc*Rabba calculated with AlphaFold 160
3. Results 160
Bagassa guianensis wood extractives inhibit conidial germination and hyphal growth of *Phanerochaete chrysosporium* 160
bag mutants are more resistant to BWE than the wild type strain 162
bag mutants release more CO_2 from *B. guianensis* wood sawdust than the wild type strain 164
Identification of the causative mutation for BWE resistance in *bag* mutants 164
AGR57_7124 codes for a DENND6 protein 167
The E326K mutation is located in the *Pc*DENND6 protein at the interaction site with Rab-GTPase proteins 168
4. Conclusion 170

Chapitre III : Etude du rôle de la protéine DENND6 dans les mécanismes de résistance aux extractibles de bois de *B. guianensis* chez *P. chrysosporium* 181

1. Résultats 181
1.1 Identification des RAB GTPases de *P. chrysosporium* orthologues à *Hs*Rab14, partenaire de DENND6 chez l'homme 183
1.2 Caractérisation fonctionnelle de *Pc*RAB4 et *Pc*RABba 183
1.3 Caractérisation fonctionnelle de *Pc*DENND6 185
1.4 Rôle de la protéine DENND6 dans un phénomène de multi-résistance aux extractibles de bois 201
2. Conclusion et perspectives 203
2.1 La protéine *Pc*DENND6 est-elle la cible d'une toxine des extractibles de bois de *B. guianensis* ? 203
2.2 La mutation E234K dans la protéine *Pc*DENND6 induit-elle une résistance au stress chez *P. chrysosporium* ? 204
3. Matériels et méthodes 206
3.1 Souches bactériennes 206
3.2 Souche de levure 207
3.3 Cartes plasmidiques utilisées pour la production de protéines recombinantes et les tests d'interaction par double hybride 208
3.4 Etude de familles multigéniques par analyses phylogénétiques 209
3.5 Clonage des séquences d'intérêt dans un vecteur d'expression 210
3.6 Production des protéines recombinantes en système hétérologue chez *E. coli* et purification par chromatographie d'affinité 211

3.7 Caractérisation fonctionnelle des protéines recombinantes.....213
3.8 Test d'interaction par double hybride chez *S. cerevisiae* 214

DISCUSSION GÉNÉRALE.....220

1. La mutagénèse : approche prometteuse pour étudier les mécanismes de résistance aux molécules antifongiques chez les champignons filamenteux..... 221
2. Importance et limite du champignon modèle *P. chrysosporium*..... 223
3. Les extractibles : outils d'étude pour développer de nouveaux produits antifongiques..... 225
4. Génération de mutants de *P. chrysosporium* et applications en bioremédiation..... 227

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....230

INTRODUCTION

Chapitre I : Diversité des modes trophiques chez les champignons

1. Introduction générale sur les champignons

Le règne fongique regroupe plus d'un million d'espèces. Ce sont des organismes eucaryotes dépourvus de chloroplastes et ainsi hétérotrophes vis-à-vis du carbone. Ils accèdent aux nutriments carbonés notamment à partir des végétaux selon différents types trophiques : symbiotiques, pathogènes et saprotrophes qui se différencient par le mode d'acquisition des nutriments que les champignons utilisent pour se développer. La symbiose est une association bénéfique et durable entre deux organismes hétérospécifiques. Parmi les symbioses élaborées avec des organismes photosynthétiques, on retrouve les mycorhizes qui correspondent à l'association entre des champignons et les racines de plantes. Les champignons mycorhiziens sont divisés en deux classes majeures (les ectomycorhizes et les endomycorhizes) selon des critères morphologiques et diffèrent notamment dans leur mode de colonisation des racines des végétaux. Les hyphes des champignons ectomycorhiziens forment un manteau autour des racines et pénètrent entre les cellules du cortex racinaire pour construire le réseau de Hartig tandis que les hyphes des champignons endomycorhiziens pénètrent à l'intérieur des cellules racinaires. Dans les deux cas, cette association permet aux champignons d'acquérir des composés carbonés issus des photosynthétats de la plante, et aux plantes des éléments minéraux via un échange réciproque qui est bénéfique aux deux organismes. Les champignons pathogènes quant à eux, sont des organismes capables de prélever la matière organique d'un hôte (ex : végétaux, animaux) et peuvent provoquer des maladies entraînant la mort de l'hôte. Dans le cas d'hôtes végétaux, les champignons sont dits phytopathogènes et sont divisés en 3 groupes fonctionnels selon le mode de colonisation utilisé : les champignons nécrotrophes qui tuent les cellules végétales avant colonisation, biotrophes qui colonisent des tissus vivants et hémi-biotrophes qui présentent une phase biotrophe puis nécrotrophe. Enfin, les champignons saprotrophes sont caractérisés par leur capacité à dégrader et à se développer sur de la matière organique morte ou en décomposition. Ces champignons sont classés en plusieurs catégories selon la nature de leur substrat tels que les champignons décomposeurs de litière, les champignons coprophiles et les champignons dégradeurs de bois. De par leurs activités de décomposition au sein des écosystèmes, les champignons saprotrophes sont des acteurs clés dans le recyclage de la matière organique et dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote.

La classification phylogénétique des champignons se compose de 5 divisions majeures : les Chytridiomycètes, les Gloméromycètes, les Zygomycètes, les Ascomycètes, et les Basidiomycètes. Cependant, la phylogénie des organismes ne définit pas automatiquement leur mode trophique. Par exemple, la sous-division des Agaricomycètes appartenant à la division des Basidiomycètes inclue des

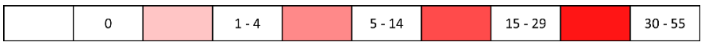
espèces fongiques saprotrophes (ex : *Phanerochaete chrysosporium*) mais également pathogènes et symbiotiques (ex : *Laccaria bicolor*, *Moniliophthora roreri*) (Grigoriev *et al.*, 2014).

2. Les champignons dégradeurs de bois

Les champignons dégradeurs de bois sont généralement divisés en trois classes : les champignons de pourriture blanche, les champignons de pourriture brune et les champignons de pourriture molle. Cette classification a été définie en fonction de l'aspect du bois après colonisation fongique, cependant, l'obtention de données génomiques ne supporte plus cette classification (Riley *et al.*, 2014). Par exemple, les champignons de pourriture blanche et brune sont différenciés par leur capacité à minéraliser ou modifier les polymères de lignine. Cette différence s'explique notamment par la présence de peroxydase de type II ainsi qu'un nombre plus important de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose crystalline (Tableau 1) (Riley *et al.*, 2014; Rytioja *et al.*, 2014). Néanmoins, les espèces *Botryobasidium botryosum* et *Jaapia argillacea*, décrites comme des pourritures blanches dû à leur capacité à dégrader la lignine ne contiennent pas de gènes codant pour des peroxydases de type II dans leur génome (Tableau 1). Les auteurs suggèrent ainsi de conserver le terme « champignons de pourriture blanche » pour les champignons dégradant tous les composés du bois et possédant dans leurs génomes des gènes codant pour des peroxydases de type II et des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose crystalline (Riley *et al.*, 2014).

Tableau 1. Représentation des différences génomiques des caractères liés à la dégradation du bois entre les champignons de pourriture blanche et brune ainsi que deux espèces définies comme pourriture grise. Les différences génomiques concernent principalement 6 familles d'enzymes, dont 5 impliquées dans la dégradation de la cellulose crystalline (CBM1, GH6, GH7, AA3_1 et AA9) et 1 dans la dégradation de la lignine (POD). Les noms complets des abréviations utilisées pour les familles de CAZymes sont les suivants : CBM1 (Carbohydrate-binding module family 1), GH6 (Glycoside hydrolase family 6), GH7 (Glycoside hydrolase family 7), AA3_1 (Cellobiose dehydrogenase) AA9 (Lytic polysaccharide monooxygenase), POD (Peroxydase de type II). Le nombre de gènes identifié pour chaque espèce fongique est coloré avec une gamme de rouge afin de contraster les différences entre les types de pourriture. Les noms complets des abréviations utilisées pour les espèces fongiques sont les suivants : *Ad* (*Auricularia delicata*); *Bb* (*Botryobasidium botryosum*); *Cs* (*Ceriporiopsis subvermispora*); *Cp* (*Coniophora puteana*); *D sp.* (*Dacryopinax sp.*); *Ds* (*Dichomitus squalens*); *Fm* (*Fomitiporia mediterranea*); *Fp* (*Fomitopsis pinicola*); *Gt* (*Gloeophyllum trabeum*); *Ja* (*Jaapia argillacea*); *Pc* (*Phanerochaete chrysosporium*); *Po* (*Pleurotus ostreatus*); *Pp* (*Postia placenta*); *Ps* (*Punctularia strigosozonata*); *Sl* (*Serpula lacrymans*); *Sh* (*Stereum hirsutum*); *Tv* (*Trametes versicolor*); *Wc* (*Wolfiporia cocos*) (adapté de Riley *et al.* 2014; Rytioja *et al.* 2014).

	Pourriture blanche									Pourriture grise		Pourriture brune						
CAZymes	*Ad*	*Cs*	*Ds*	*Fm*	*Pc*	*Po*	*Ps*	*Sh*	*Tv*	*Bb*	*Ja*	*Cp*	*D sp.*	*Fp*	*Gt*	*Pp*	*Sl*	*Wc*
CBM1	43	17	17	6	30	33	21	17	23	28	24	2	1	0	1	0	8	0
GH6	2	1	1	2	1	3	1	1	1	3	3	2	0	0	0	0	1	0
GH7	8	3	4	2	9	16	5	3	4	7	5	2	0	0	0	0	0	0
AA9	20	9	15	13	15	29	14	16	18	32	15	10	0	4	4	2	5	2
AA3_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	0	0	1	0	2	0
POD	5	15	12	16	15	9	10	5	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0



2.1 Les champignons de pourriture blanche

Les champignons de pourriture blanche représentent plus de 90% des Basidiomycètes dégradeurs de bois et sont communément retrouvés sur les bois de feuillus en comparaison aux conifères (Gilbertson, 1980). Ils sont caractérisés par leur capacité à dégrader les trois composants majeurs du bois tels que la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Blanchette, 1991). La dégradation de ces trois composés résulte ainsi en une couleur blanchâtre du bois ce qui a donné son nom à ces agents de pourriture (Fig. 1).



Figure 1. Apparence du bois attaqué par un champignon de pourriture blanche (*P. chrysosporium*) (Malviya, 2012).

Deux modes de dégradation ont été décrits chez ces champignons et impliquent une stratégie de dégradation dite simultanée ou sélective (Fig. 2). Bien qu'une majorité ait été décrite avec un mode de dégradation simultané de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine (*P. chrysosporium*), un mode de dégradation sélectif et préférentiel pour la lignine est également reporté (*Ceriporiopsis subvermispora* et *Phlebia radiata*) (Ander et Eriksson, 1977; Guerra *et al.*, 2003).

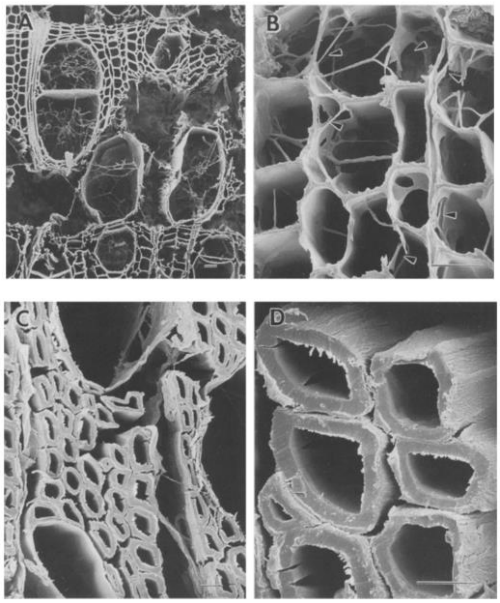


Figure 2. Dégradation du bois par des champignons de pourriture blanche via une stratégie de dégradation dite simultanée (A et B) ou sélective (C et D). (A et B) Erosion de toutes les couches de la paroi végétale incluant la lamelle moyenne. (C et D) Dégradation de la lignine au niveau de la paroi secondaire par délignification sélective. Après dégradation, les parois secondaires subsistent et sont riches en cellulose. Les cellules sont séparées des cellules adjacentes dû à l'absence de lamelle moyenne (Akhtar *et al.*, 1997).

Les champignons de pourriture blanche sont caractérisés notamment par la présence de gènes codant des peroxydases de type II, enzymes capables de dégrader des composés aromatiques complexes tels que la lignine et des colorants industriels. Ces enzymes présentent ainsi un intérêt industriel important dans différents secteurs tels que la production de biocarburants et la détoxication de polluants (ex : colorants industriels) (Asgher *et al.*, 2008; Kamei, 2020).

2.2 Les champignons de pourriture brune

Les champignons de pourriture brune représentent seulement 6% des Basidiomycètes dégradeurs de bois et sont prépondérants au sein des écosystèmes de conifères (Gilbertson, 1980; Hibbett et Donoghue, 2001). La dégradation du bois par ces champignons se caractérise par la formation de résidus cubiques de couleur brune reflétant un faible contenu en sucres et une forte présence de lignine modifiée (Eriksson *et al.*, 1990) (Fig. 3).



Figure 3. Apparence du bois attaqué par un champignon de pourriture brune (Goodell, 2020).

Il a été suggéré que les champignons de pourriture brune descendent d'un ancêtre commun appartenant aux champignons de pourriture blanche (Floudas *et al.*, 2012). En effet, ils ont perdu un ensemble d'enzymes clés impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique (ex : peroxydase de type II) en comparaison aux champignons de pourriture blanche (Eastwood *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2009). Ils utilisent ainsi des mécanismes alternatifs moins coûteux en énergie qui leur permettent de dégrader les polysaccharides présents dans le bois tout en contournant le problème posé par la dégradation de la lignine (Fig. 4).

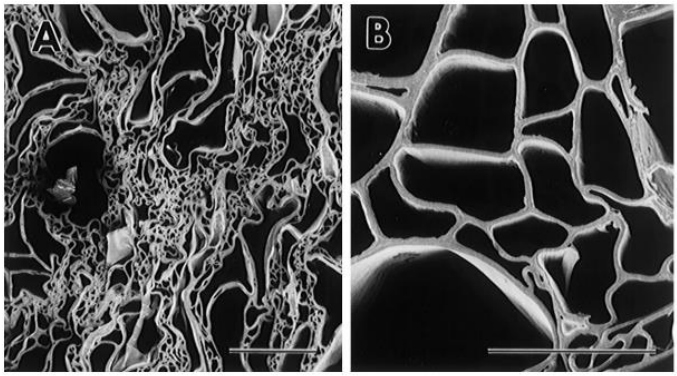


Figure 4. Dégradation du bois par des champignons de pourriture brune. (A et B) La dégradation des polymères de cellulose conduit à l'agrégation et la distorsion des parois végétales (Blanchette, 2000).

L'initiation de la dégradation a lieu au sein de la couche interne de la paroi cellulaire nommée S2 et suggère la sécrétion d'agents de diffusion plus petits que les enzymes impliquées dans la dégradation de la lignocellulose. Les champignons de pourriture brune sécrètent des molécules d'oxalate qui permettent d'acidifier le pH environnant et de chélater le fer ferrique. Les complexes oxalate-fer ferrique sont alors réduits par d'autres composés sécrétés par les champignons (2,5-diméthoxyhydroquinone et 4,5-diméthoxycatéchol) ce qui permet l'initiation de la réaction de Fenton. Cette dernière permet ainsi la génération de radicaux hydroxyls hautement réactifs qui sont impliqués dans la dépolymérisation de la cellulose et la modification des polymères de lignine (Fig. 5) (Arantes *et al.*, 2012).

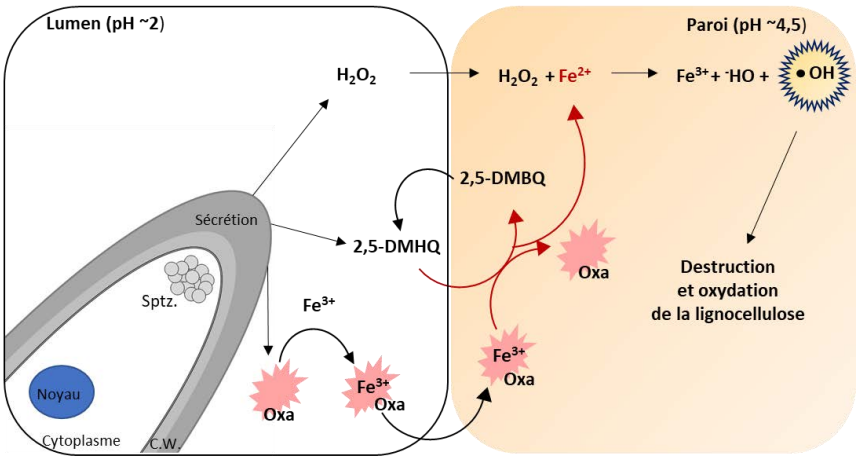


Figure 5. Mécanisme employé par les champignons de pourriture brune pour dégrader la lignocellulose. Les champignons sécrètent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), des composés réducteurs (ex : 2,5-DMHQ) et des molécules d'oxalate. Les ions Fe^{3+} sont chélatés par les molécules d'oxalate et réduits par des composés réducteurs (e.g 2,5-DMHQ). Ces réactions permettent de générer des ions Fe^{2+} et ainsi d'initier la réaction de Fenton qui aboutit à la production de radicaux hydroxyls. Ces radicaux vont attaquer et oxyder les différents composants de la lignocellulose. Les noms complets des abréviations utilisées sont les suivants : Oxa (molécule d'oxalate); C.W (paroi); Sptz. (*spitzenkörper); 2,5-DMHQ (*2,5-dimethoxyhydroquinone); 2,5-DMBQ (2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone) (adapté de Arantes *et al.*, 2012).

2.3 Les champignons de pourriture molle

Les champignons de pourriture molle, identifiés comme tels à ce jour, appartiennent à la division des Ascomycètes à la différence des champignons de pourriture brune et blanche qui sont majoritairement des Basidiomycètes. Il existe plusieurs exceptions comme par exemple l'espèce *Xylaria hypoxylon* qui est responsable d'une forme de pourriture blanche du bois et qui appartient à la division des Ascomycètes qui constitue le groupe le plus divers des champignons (Grigoriev *et al.*, 2014). Les champignons de pourriture molle sont principalement retrouvés sur des bois de feuillus dans des environnements humides. En fonction de leur mode d'action lors de la dégradation du bois, deux types de pourriture molle sont représentés et notés types I et II. Le type I se caractérise par la formation de cavités cylindriques au sein de la paroi secondaire alors que le type II engendre une érosion de la paroi secondaire (Fig. 6) (Corbett, 1965). Ces champignons sont caractérisés par leur capacité à dégrader la cellulose et les hémicelluloses. Bien qu'ils soient décrits pour simplement modifier la lignine, plusieurs études ont démontré la capacité de certains Ascomycètes (sous division des Pezizomycotina) à modifier et minéraliser la lignine (Ferrari *et al.*, 2021). Par exemple, des essais de minéralisation de lignine, de polymères synthétiques et de monomères phénoliques marqués au C14 ont montré la capacité des espèces *Chaetomium piluliferum* et *Preussia fleishhakii* à minéraliser ces composés en CO_2 (Haider et Trojanowski, 1975).

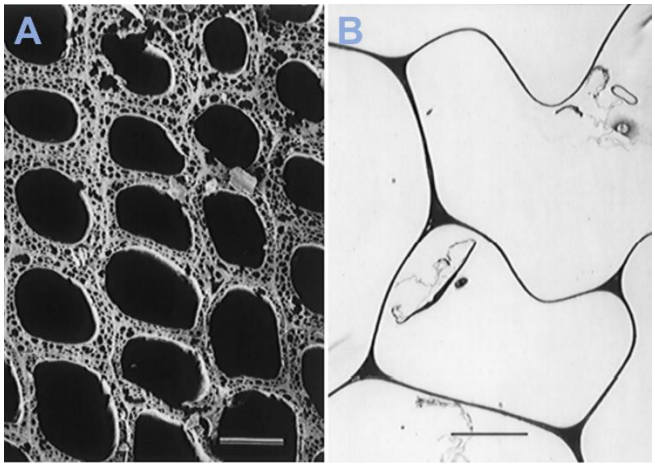


Figure 6. Dégradation du bois par des champignons de pourriture molle. (A) Attaque de type I provoquant la formation de cavités cylindriques au sein de la paroi secondaire. (B) Attaque de type II provoquant une érosion de la paroi secondaire sans dégradation de la lamelle moyenne (Blanchette, 2000).

Les espèces appartenant à la division des Ascomycètes ont été particulièrement étudiées dû à la présence de nombreux pathogènes responsables de maladies chez l'homme et de destruction de cultures agricoles. Dans le cadre de l'utilisation de la biomasse lignocellulosique, les souches d'Aspergillus (ex : *A. niger*) et *Trichoderma reesei* constituent des acteurs majeurs en industrie pour la production de biocarburants dû à leur bonne capacité de fermentation et leur haute capacité de sécrétion d'enzymes cellulolytiques

(Berka *et al.*, 1991; Durand *et al.*, 1988). Ces champignons sont utilisés également dans de nombreux domaines incluant les industries alimentaires, papetières, textiles et aussi en tant qu'organisme hôte pour la production de protéine hétérologue (Li *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022). Outre leur utilisation industrielle, ces champignons constituent des organismes modèles, incluant l'espèce *Neurospora crassa*, pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la dégradation de la biomasse lignocellulosique (Znameroski et Glass, 2013). En effet, les Ascomycètes constituent des modèles importants pour l'étude de la dégradation de la biomasse de par les outils génétiques qui ont été développés. Par exemple, une collection de souches de délétion du génome de *N. crassa* est disponible. Son utilisation a ainsi permis d'identifier des acteurs moléculaires impliqués dans l'utilisation et la dégradation de la cellulose via un criblage de mutants exposant un phénotype altéré en présence de cellulose (Coradetti *et al.*, 2012; Znameroski et Glass, 2013). En ce sens, les Basidiomycètes sont largement moins étudiés que les Ascomycètes d'un point de vue fonctionnel dû au faible développement d'outils génétiques. Le développement d'outils génétiques adaptés aux Basidiomycètes permettrait d'obtenir davantage d'informations sur les mécanismes impliqués dans la dégradation de la lignocellulose et pourrait permettre ainsi des progrès majeurs dans divers secteurs industriels (Rytioja *et al.*, 2014).

Chapitre II : Mécanismes de dégradation et utilisation des polysaccharides du bois par les champignons

1. Anatomie et structure d'un substrat complexe à dégrader : le bois

Le bois assure deux fonctions majeures chez l'arbre qui sont la conduction de la sève brute des racines vers les feuilles et l'apport d'un soutien mécanique à la structure de la plante. La production de bois est apparue chez les Spermaphytes (plantes à graines) au sein de deux sous-embranchements majeurs, les Gymnospermes (ex : les conifères) et les Angiospermes (ex : les plantes à fleurs). Ces deux sous embranchements présentent une anatomie du bois différente. Le bois est dit homoxylé chez les Gymnospermes. Les fibres trachéides ont un rôle de soutien et de conduction de la sève. Le bois est dit hétéroxylé chez les Angiospermes. Les fibres trachéides ont un rôle de soutien et les vaisseaux conducteurs ont un rôle de conduction. Néanmoins, les cellules du bois présentent une paroi épaisse lignifiée que ce soit chez les Gymnospermes ou les Angiospermes. Après maturation, les fibres trachéides et les vaisseaux perdent leur contenu cytoplasmique ce qui conduit à la présence de cellules mortes caractérisées par une paroi et un espace apoplastique au sein du bois. La paroi des cellules du bois se compose de 3 couches, à savoir la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (Rytioja *et al.*, 2014). La lamelle moyenne permet d'associer les cellules entre elles et est constituée principalement de pectine. La paroi primaire apparaît lors de la formation des cellules après division de la cellule mère. Elle est constituée de microfibrilles de cellulose mises en place lors de la croissance des cellules et devient fortement lignifiée après différenciation de ces cellules. Enfin, la paroi secondaire se forme lorsque les cellules ne sont plus en croissance et se compose de 3 couches nommées S1, S2 et S3 (Fig. 7) (Rytioja *et al.*, 2014).

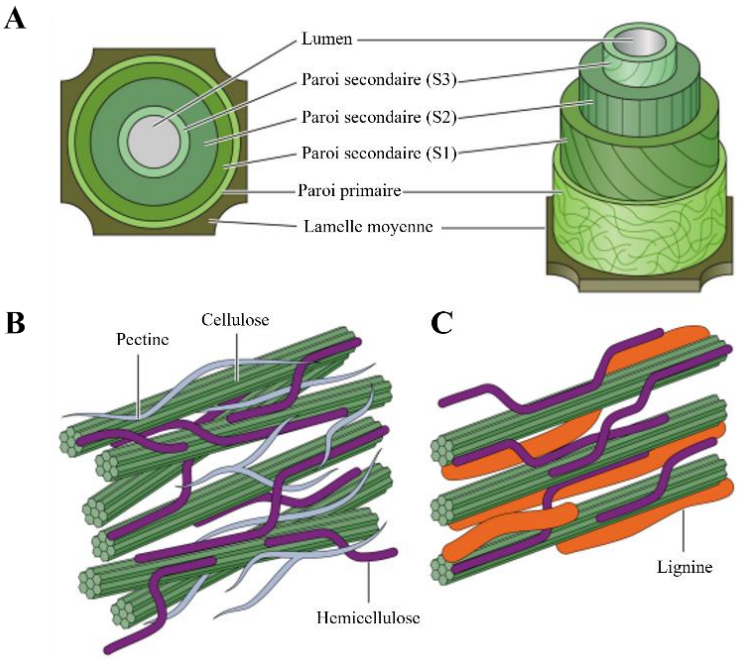


Figure 7. Structure et composition de la paroi des cellules végétales. (A) Structure de la paroi des cellules végétales (lamelle moyenne, paroi primaire et paroi secondaire). Principaux polymères retrouvés au sein des parois primaires (B) et secondaires (C). La lignine n'est pas représentée au sein de la paroi primaire dû à des compositions variées selon les espèces végétales (B) (adapté de Rytioja *et al.* 2014).

La biomasse lignocellulosique se compose de 3 polysaccharides majeurs que sont la cellulose, les hémicelluloses et la pectine, et de composés aromatiques sous la forme de polymères de lignine ou d'extractibles. De par la complexité de ce substrat, les champignons dégradeurs de bois requièrent un arsenal d'enzymes pour le dégrader efficacement. Ces enzymes ont été répertoriées sous le nom de carbohydrate-active enzymes (CAZymes) et sont classifiées en plusieurs familles au sein de la base de données « CAZy » en fonction de leur séquence en acides aminés et de leur similarité structurale (http://www.cazy.org/) (Drula *et al.*, 2022). Les CAZymes sont représentées par 5 familles : les glycoside hydrolases (GHs), les carbohydrate estérases (CEs), les polysaccharide lyases (PLs), les glycosyltransférases (GTs), et des enzymes avec des activités auxiliaires (AA) (Tableau 2) (Cantarel *et al.*, 2009; Levasseur *et al.*, 2013; Lombard *et al.*, 2014). A l'instar des champignons ectomycorhiziens et pathogènes biotrophes qui possèdent un nombre réduit de gènes codant pour des CAZymes, les champignons saprotrophes et en particulier dégradeurs de bois présentent une grande diversité de ces enzymes (Hage et Rosso, 2021; Zhao *et al.*, 2013). Chez les champignons symbiotiques, cette réduction du nombre de gènes s'explique par le rôle des CAZymes, limité au remodelage des parois végétales et fongiques lors de l'établissement de la structure symbiotique (Zuccaro *et al.*, 2011). Dans le cas des champignons pathogènes, cette réduction du nombre de CAZymes permet de réduire les dommages causés aux parois des cellules végétales, limitant ainsi la mise en place de réponse immunitaire par la plante lors de l'infection (Kämper *et al.*, 2006).

Tableau 2. Répertoire des CAZymes fongiques impliquées dans la dégradation des différents polysaccharides du bois (adapté de Hage et Rosso, 2021).

Polysaccharide	Superfamille de CAZymes	Activité enzymatique	Famille et sous-famille de CAZymes
Cellulose	Glycoside Hydrolases	Endoglucanase	GH5,4, GH5_5, GH12, GH45,GH74, GH131
		Cellobiohydrolase	GH6, GH7, GH5_1, GH48
		β-glucosidase	GH1, GH3, GH30_1, GH5_7, GH5_22
	Auxiliary Activities	Lytic polysaccharide monooxygenase	AA9, AA16
Hémicellulose	Glycoside Hydrolases	Endo-1,4-β-xylanase	GH5_22, GH8, GH10, GH11, GH30_7
		xyloglucanase	GH74, GH44
		Endo-β-1,4-mannanase	GH5_1, GH5_7, GH26, GH113, GH134
		Endo-α-1,5-arabinanase	GH93
		β-1,3-glucanase	GH16
		α-L-arabinofuranosidase	GH43, GH51, GH54, GH62
		β-Glucuronidase	GH115, GH2
		α-1,2-glucuronidase	GH67, GH115
		β-mannosidase	GH2, GH5_2
		β-Galactosidase	GH35, GH53
		α-Galactosidase	GH27, GH36
		β-xylosidase	GH52, GH54, GH120, GH30_1, GH39
		α-L-fucosidase	GH29, GH95, GH141
	Carbohydrate Esterases	Acetylxylan esterase	CE1, CE2, CE3, CE4, CE6, CE16
		Cutinase	CE5
	Auxiliary Activities	Glucuronyl methyl esterase	CE15
		Lytic polysaccharide monooxygenase	AA14
Pectine	Glycoside Hydrolases	Polygalacturonases	GH28, GH78
		β-glucuronyl hydrolase	GH88, GH105
		α-L-rhamnosidase	GH78, GH106
	Polysaccharide Lyases	Polygalacturonate lyase	PL1, PL3, PL9
		Rhamnogalacturonan lyase	PL4, PL11, PL26
	Carbohydrate Esterases	Rhamnogalacturonan acetylesterase	CE12
		Pectin methylesterase	CE8

2. Dégradation de la cellulose

2.1 Structure de la cellulose

La cellulose constitue la molécule organique la plus abondante sur terre et le composé majeur des parois des cellules végétales (40 à 50 % du poids sec du bois) (Pettersen, 1984). Ce polysaccharide est retrouvé au sein de la paroi primaire et secondaire des cellules végétales et lui confère sa structure rigide (Sjöström, 1993). Il s'agit d'un polymère de glucane composé d'unités D-glucopyranose ($C_6H_7O_2(OH)_3$) qui sont assemblées entre elles par des liaisons β-1,4-glucosidiques. L'unité de base de la cellulose est une molécule de cellobiose qui est définie par deux unités D-glucopyranose (Fig. 8A). La cellulose présente de nombreux groupements hydroxyles qui sont impliqués dans la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires au sein d'une même chaîne de cellulose et de liaisons hydrogène intermoléculaires entre deux chaînes de cellulose (Fig. 8B) (Hallac et Ragauskas, 2011). Ces liaisons hydrogène permettent ainsi la formation de microfibrilles de cellulose qui présentent des régions hautement ordonnées (dites cristallines) et des régions désordonnées (dites amorphes) (Fig. 8C). Ces longues chaînes de cellulose sont étroitement liées entre elles au sein des microfibrilles et sont liées par des liaisons hydrogène aux hémicelluloses au sein des parois des cellules végétales (Lynd *et al.*, 2002). Le nombre de molécules de cellulose composant une microfibrille, l'organisation de ces microfibrilles les unes par rapport aux autres, et l'organisation des régions cristallines par rapport aux régions amorphes, dépend du tissu, des conditions de culture et de l'espèce considérée.

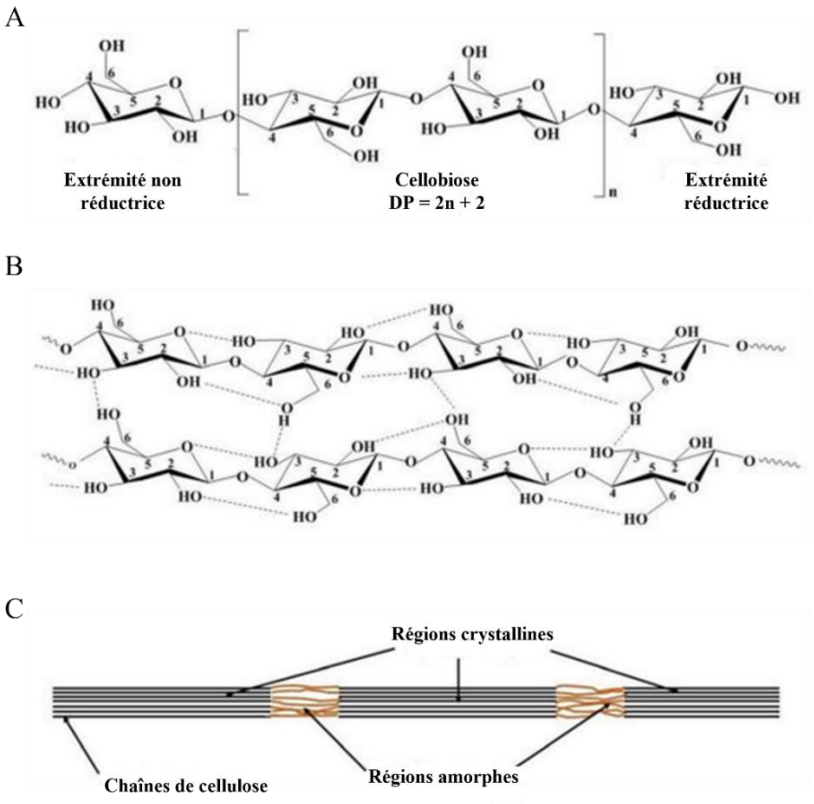


Figure 8. Structure des chaînes de cellulose. (A) Structure chimique de la cellulose. (B) Liaisons hydrogène intra et inter-moléculaires impliquées dans les chaînes de cellulose. (C) Représentation schématique des régions crystallines et amorphes composant les chaînes de cellulose (Dassanayake *et al.*, 2018).

2.2 Mécanismes de dégradation des polysaccharides de cellulose

La dégradation des polysaccharides de cellulose a lieu par l'action de plusieurs cellulases. Ces enzymes sont répertoriées au sein de la famille des glycosides hydrolases (http://www.cazy.org/) et divisées en trois classes en fonction de leur activité enzymatique : les endoglucanases, les exoglucanases et les β-glucosidases (Lynd *et al.*, 2002).

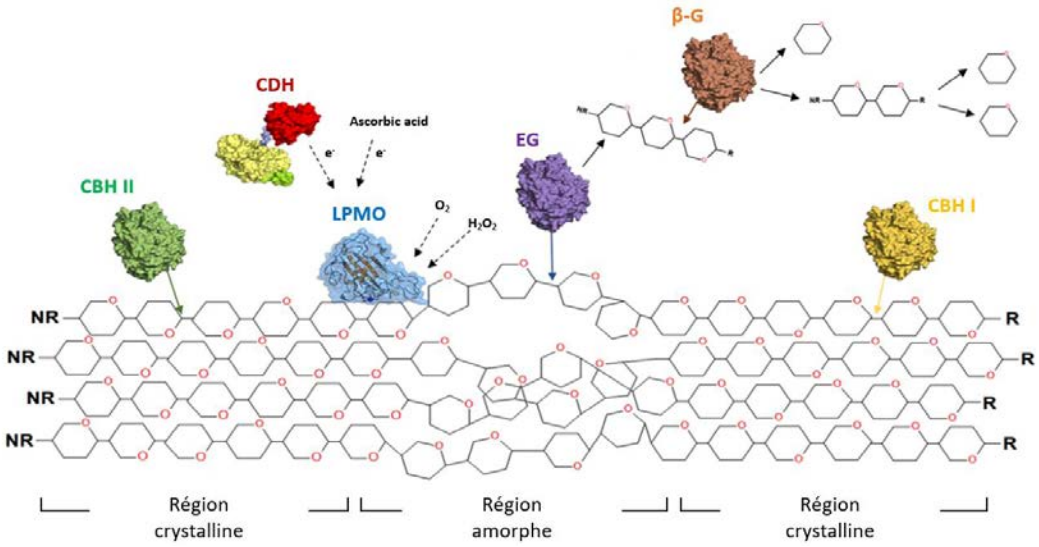
Les endoglucanases hydrolysent les liaisons β-1,4-glucosidiques au niveau des régions amorphes des chaînes de cellulose (Fig. 9). Ces enzymes sont également appelées carboxymethylcellulases car elles sont actives sur un substrat synthétique nommé carboxyméthylcellulose (Dashtban *et al.*, 2009). Les enzymes présentant ces activités ont été répertoriées dans les familles GH5,4, GH5_5, GH12, GH45, GH74 et GH131 (Tableau 2) (Hage et Rosso, 2021).

Les exoglucanases, appelées également cellobiohydrolases, hydrolysent des unités de cellobiose à partir des extrémités réductrices et non réductrices des chaînes de cellulose (Fig. 9). Les enzymes

présentant ces activités ont été répertoriées dans les familles GH6, GH7, GH5_1 et GH48 (Tableau 2) (Hage et Rosso, 2021).

Enfin, les β-glucosidases permettent l'hydrolyse des oligosaccharides libérés (ex : cellobiose) en glucose (Fig. 9). Les enzymes présentant ces activités ont été répertoriées dans les familles GH1, GH3, GH30_1, GH5_7 et GH5_22 (Tableau 2) (Hage et Rosso, 2021).

En complément de ce set d'enzymes hydrolytiques (glycosides hydrolases), les champignons dégradeurs de bois utilisent des processus oxydatifs pour dégrader les polysaccharides de cellulose. Ces processus oxydatifs sont assurés par les cellobiose dehydrogenases (CDHs) et les lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs).



CBH II : Cellobiohydrolase (clive des unités de cellobiose à partir des extrémités non réductrices)
CDH : Cellobiose dehydrogenase ; **LPMO** : Lytic polysaccharide monooxygenase
EG : Endoglucanase ; **β-G** : β-glucosidase
CBH I : Cellobiohydrolase (clive des unités de cellobiose à partir des extrémités réductrices)
NR : Extrémité non réductrice des chaînes de cellulose
R : Extrémité réductrice des chaînes de cellulose.

D-glucose

Cellobiose

Cellotriose

Figure 9. Mécanisme d'action des enzymes impliquées dans la dégradation des polymères de cellulose (régions amorphes et crystallines) (adapté de Andlar *et al.* 2018).

Les CDHs (AA8, AA3_1) sont des enzymes extracellulaires composées de deux domaines dont un est capable de fixer la flavine adénine dinucléotide (FAD) et le second contient un hème (Tableau 1). Les premières CDHs ont été identifiées chez les champignons de pourriture blanche

P. chrysosporium et *Trametes versicolor* (Bao *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1996). Les gènes codant ces enzymes sont retrouvés dans le génome des champignons de pourriture blanche et molle, mais ne sont pas conservés chez une partie des champignons de pourriture brune (Dimarogona *et al.*, 2012). Les CDHs sont capables d'oxyder des produits issus de la dégradation de la cellulose (ex : cellobiose, cellodextrines, lactose) par la réduction d'une large gamme de substrats comme des quinones, des radicaux organiques et des ions métalliques (Fe^{3+}, Cu^{2+}) (Henriksson *et al.*, 2000). Les produits oxydés sont cependant variables selon les espèces fongiques. Par exemple, la CDH de *P. chrysosporium* est capable d'oxyder le cellobiose, les cellodextrines, le lactose, le mannobiose, et le galactosylmannose alors que la CDH de *Irpex lacteus* oxyde uniquement le cellobiose et les cellodextrines (Hai *et al.*, 2000; Henriksson *et al.*, 2000).

Les LPMOs (AA9, AA16) sont des monooxygénases à cuivre capables d'oxyder directement les chaînes de cellulose ce qui permet le clivage des liaisons glycosidiques (Fig. 10) (Tableau 1) (Vu *et al.*, 2014). Elles sont retrouvées dans la plupart des génomes d'Ascomycètes et de Basidiomycètes dont les pourritures blanches et brunes. Ces enzymes peuvent être classées en trois catégories sur la base de leur similarité de séquence et leur activité sur les chaînes de cellulose (Vu *et al.*, 2014). Les LPMOs de type 1 oxydent les unités de glucose en position C-1 ce qui permet la formation d'acides aldoniques au niveau des extrémités réductrices des chaînes de cellulose. Les LPMOs de type 2 oxydent les unités de glucose en position C-4 ce qui engendre la formation d'hexose avec un groupement cétone au niveau des extrémités non réductrices de la cellulose. Enfin, les LPMOs de type 3 ne sont pas spécifiques et sont capables d'oxyder les unités de glucose à ces deux positions (Fig. 10). Une action synergique entre les LPMOs et les CDHs a été identifiée et a permis de montrer le rôle des CDHs comme donneur d'électrons pour les LPMOs (Fig. 9) (Langston *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2011).

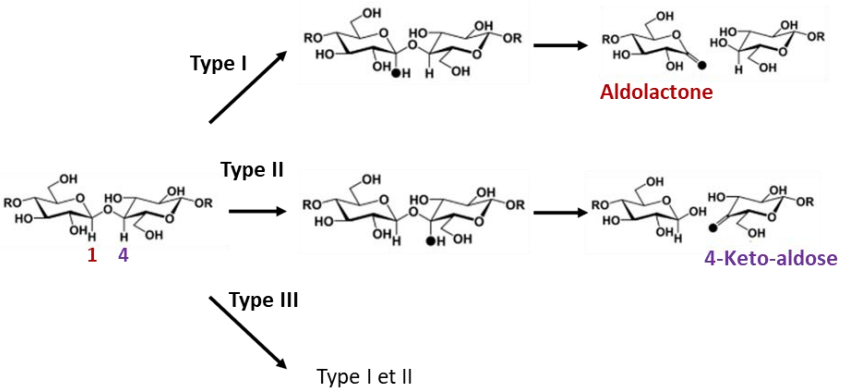


Figure 10. Mécanisme de dégradation oxydatif des polymères de cellulose par l'action des LPMOs. Clivage des liaisons glucosidiques par hydroxylation des unités glucose aux positions C1 et C4 et formation des produits correspondants (adapté de Vu *et al.* 2014).

Chez les champignons de pourriture blanche et molle, la dégradation des polysaccharides implique l'action combinée de processus hydrolytiques et oxydatifs. Des études de protéomique chez *N. crassa*, *A. nidulans*, et *P. chrysosporium* ont permis de mettre en avant un ensemble de protéines clé hautement conservé entre ces organismes fongiques (Znameroski et Glass, 2013). Ce set de protéines comprend trois cellulases, une β-glucosidase, et une CDH sécrétées en présence de biomasse lignocellulosique (Tableau 3) (Adav *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2011; Saykhedkar *et al.*, 2012; Znameroski et Glass, 2013).

Tableau 3. Identification de plusieurs cellulases conservées dans le sécrétome de *N. crassa*, *A. nidulans* et *P. chrysosporium* en réponse à des substrats lignocellulosiques (adapté de Znameroski *et al.* 2012).

Fonction	**Annotation chez *N. crassa***	**Identification dans le sécrétome**		
		N. crassa	***A. nidulans***	***P. chrysosporium***
Endoglucanase	GH5-1	+	+	+
	GH7-1	+	+	+
	GH6-3	+	ND	+
Cellobiohydrolase	CBH-1	+	+	+
	GH6-2	+	-	-
β-glucosidase	GH3-4	+	+	+
Cellobiose dehydrogenase	CDH-1	+	+	+

Bien que des LPMOs aient été identifiées dans le sécrétome de *N. crassa*, aucun orthologue n'a été identifié pour *P. chrysosporium* dans cette étude. Cependant, la présence de ces enzymes chez *P. chrysosporium* a été montrée dans d'autres études de protéomique en réponse à un substrat lignocellulosique (Machado *et al.*, 2020). Les champignons de pourriture brune utilisent des mécanismes différents pour dégrader les polymères de cellulose. En effet, une réduction du nombre de gènes codant pour les cellobiohydrolases (GH6, GH7), les LPMOs (AA9) et les CDHs (AA3_1 et AA8) a été mise en évidence chez les champignons de pourriture brune avec cependant plusieurs exceptions pour des espèces appartenant à l'ordre des Bolétales (e.g *Serpula lacrymans* et *Coniophora puteana*) (Tableau 1) (Martinez *et al.*, 2009; Rytioja *et al.*, 2014; Schmidhalter et Canevascini, 1993). Ces différences suggèrent que les champignons de pourriture brune dégradent la cellulose et les hémicelluloses grâce à la sécrétion d'un ensemble réduit de CAZymes et utilisent une stratégie non enzymatique basée sur la production d'oxydants hautement réactifs. Ces oxydants sont notamment générés par la réaction de Fenton qui permet la production de radicaux hydroxyles (Fig. 5) (Eastwood *et al.*, 2011; Hatakka et Hammel, 2011; Martinez *et al.*, 2009).

3. Dégradation des hémicelluloses

3.1 Structure des hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent le deuxième composé majeur des parois des cellules végétales et représentent généralement entre 25 et 35 % du poids sec du bois (Pettersen, 1984). Elles sont retrouvées au sein de la paroi primaire et secondaire des cellules végétales et ont pour rôle de soutenir la structure des microfibrilles de cellulose. Ces polymères forment des liaisons hydrogène avec les microfibrilles de cellulose et des liaisons covalentes avec le polymère de lignine ce qui confère une stabilité à la paroi des cellules végétales. Les hémicelluloses sont hétérogènes et ramifiées et peuvent être composées de pentoses (β-D-xylose, α-L-arabinose, α-L-arabifuranose), hexoses (β-D-mannose, β-D-glucose, α-D-galactose) et/ou d'acides uroniques (acides α-D-glucuronique, α-D-4-O-methylgalacturonique et α-D-galacturonique). D'autres sucres peuvent être retrouvés en faible quantité (ex : α-L-rhamnose and α-L-fucose) et les groupements hydroxyles présents sur ces sucres peuvent être substitués partiellement par des groupements acétyls (Fig. 11) (Gírio *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2004).

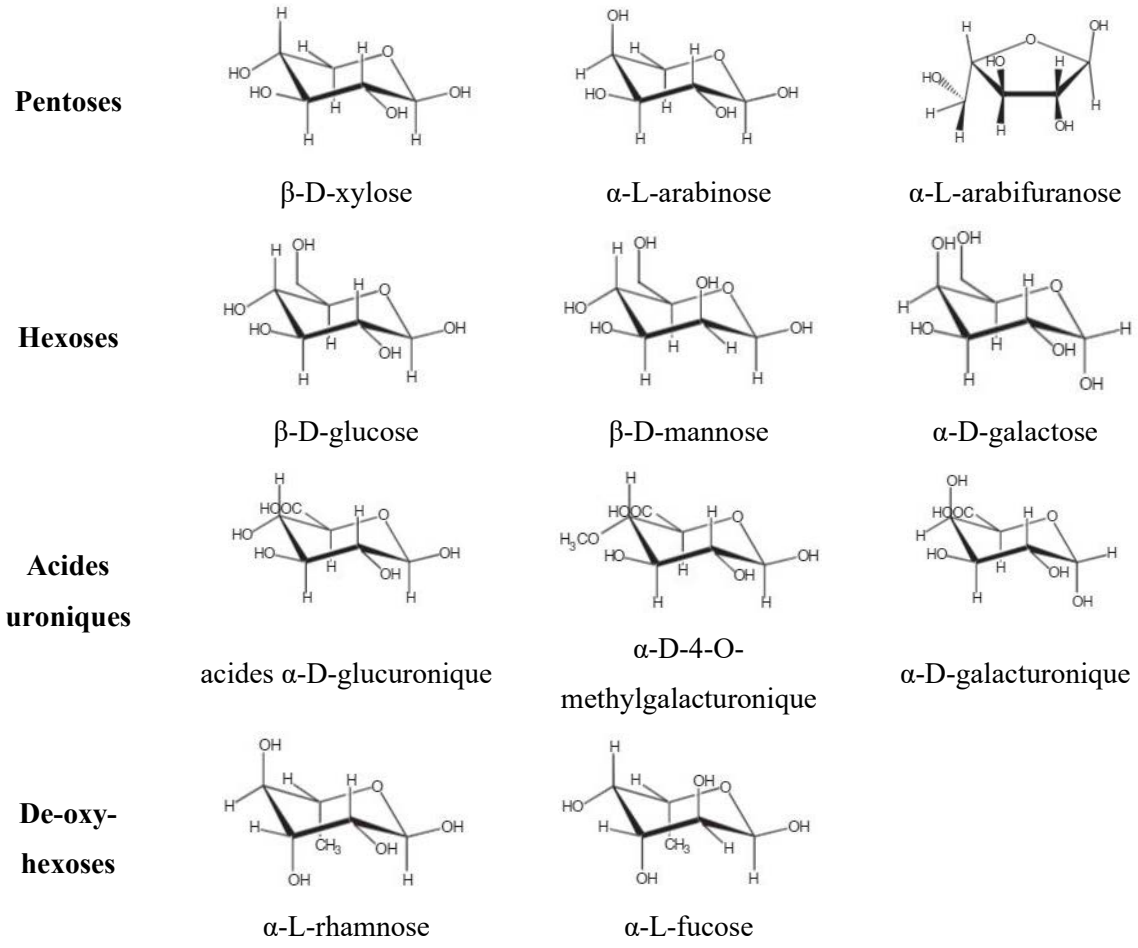


Figure 11. Composés retrouvés au sein des polymères d'hémicelluloses (adapté de Pereira *et al.*, 2004).

Les hémicelluloses du bois peuvent être divisées en 3 groupes tels que les hémicelluloses de type xylane, xyloglucane et galactomannane (Fig. 12). Chaque type d'hémicellulose comprend également des sous classes qui sont définies en fonction de la structure du squelette et/ou des résidus qui y sont attachés.

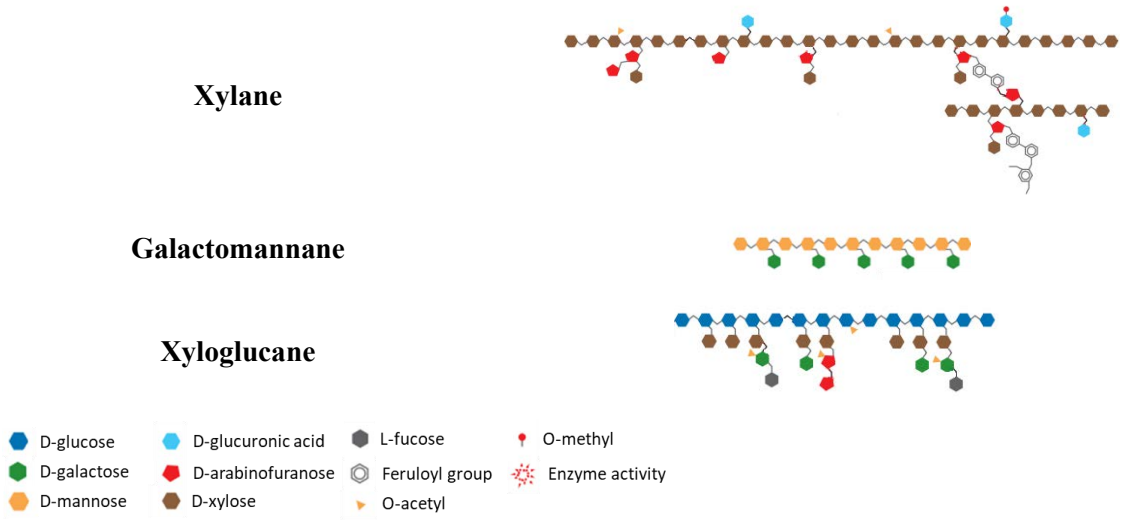


Figure 12. Représentation schématique des structures des hémicelluloses de type xylane, galactomannane et xyloglucane (adapté de Glass *et al.* 2013).

3.2 Mécanismes de dégradation des polysaccharides d'hémicellulose

3.2.1 Répertoire enzymatique

La dégradation des hémicelluloses implique des enzymes responsables de l'hydrolyse du squelette du polymère et des enzymes de débranchement responsables de l'hydrolyse des chaînes latérales des hémicelluloses (de Vries et Visser, 2001; van den Brink et de Vries, 2011). Un ensemble de CAZymes spécifique a été associé au squelette constituant le polymère des hémicelluloses (Fig. 13) (de Vries et Visser, 2001; van den Brink et de Vries, 2011).

- Le polymère de xylane est dégradé par l'action de β-1,4-endoxylanases (GH10, GH11) et β-1,4-xylosidases.
- Le polymère de xyloglucane est dégradé par l'action de β-1,4-endoglucanases (GH12, GH74) et β-1,4-glucosidases.
- Le polymère de galactomannane est dégradé par l'action de β-1,4-endomannanases (GH5, GH26) et β-1,4-mannosidases (GH2).

Les résidus attachés aux squelettes de xylane, galactomannane et xyloglucane peuvent être de diverses natures et requièrent ainsi la présence d'un arsenal d'enzymes spécialisées dans la dégradation de ces résidus (Fig. 13) (van den Brink et de Vries, 2011).

- Les résidus L-Arabinose sont retrouvés sur les polymères de xyloglucane et arabinoxylane. Ces résidus sont hydrolysés par des α-arabinofuranosidases (GH51 et GH54) et des arabinoxylan arabinofuranohydrolases (Gielkens *et al.*, 1997; Ravanal *et al.*, 2010).
- Les résidus D-Xylose (liaisons α) sont retrouvés sur les polymères de xyloglucane et hydrolysés par des α-xylosidases (GH31) (van den Brink et de Vries, 2011).
- Les résidus L-Fucose sont retrouvés au sein des polymères de xyloglucane et sont hydrolysés par des α-fucosidases (GH29 et GH95) (van den Brink et de Vries, 2011).
- Les résidus D-galactose (liaisons α) sont retrouvés sur les polymères de xylane et galactomannane et sont hydrolysés par des α-galactosidases (GH27 et GH36) (van den Brink et de Vries, 2011).
- Les résidus d'acide D-glucuronique sont retrouvés au sein des polymères de xylane et sont hydrolysés par l'action des α-glucuronidases (GH67 et GH115) (Ryabova *et al.*, 2009).
- Des résidus acétyl sont retrouvés sur les polymères de xylane et sont hydrolysés par des acetylxylan esterases (CE1, CE4, CE5 et CE16) (Biely *et al.*, 2011).
- Des acides féruliques et p-coumarique sont également présents au sein des polymères de xylane et sont hydrolysés par des feruloyl et p-coumaroyl esterases respectivement (McCrae *et al.*, 1994).

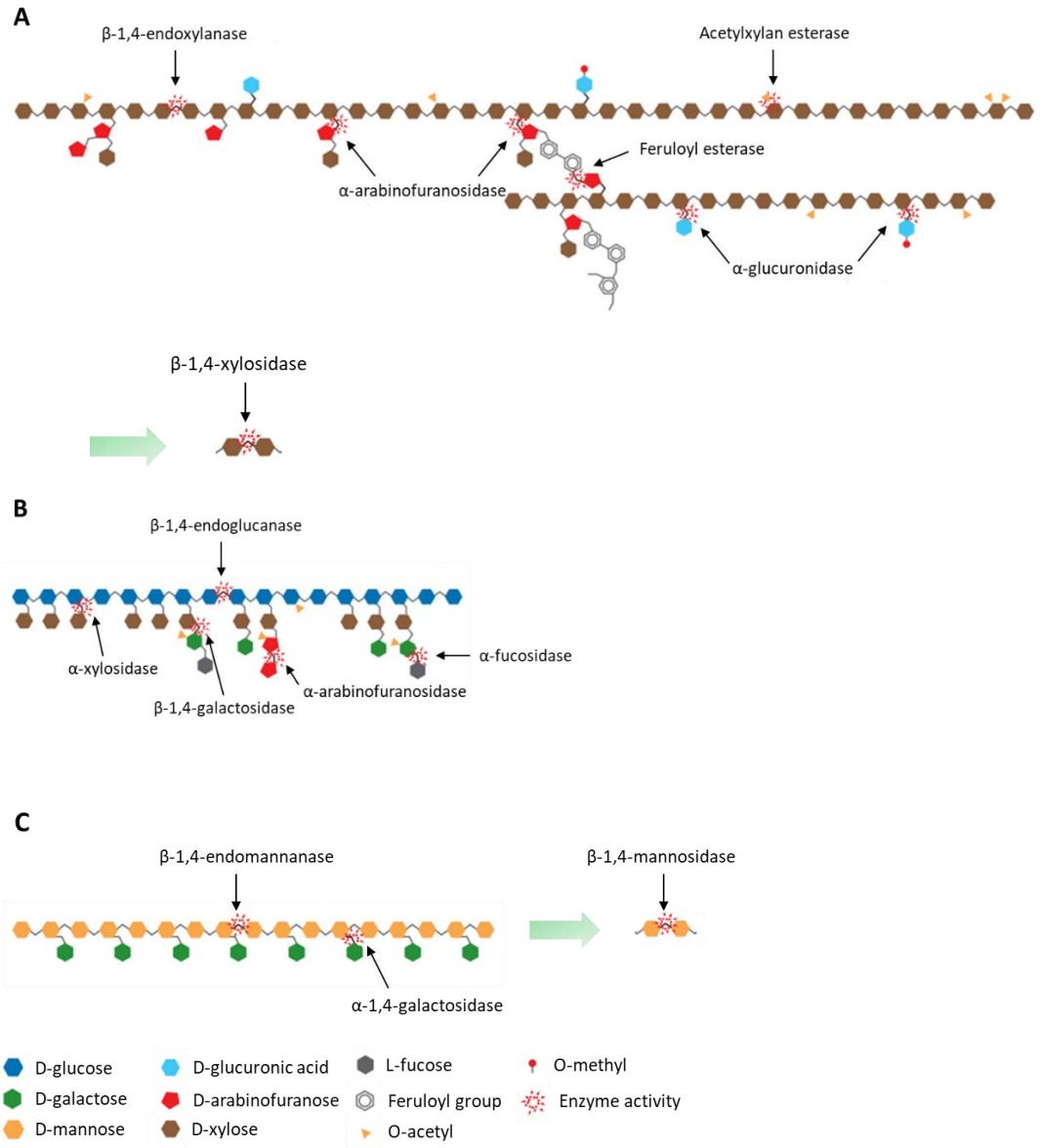


Figure 13. Mécanisme d'action des CAZymes impliquées dans la dégradation des hémicelluloses. (A) Dégradation des hémicelluloses de type xylane. (B) Dégradation des hémicelluloses de type xyloglucane. (C) Dégradation des hémicelluloses de type galactomannane (adapté de Glass *et al.* 2013).

Par ailleurs, la participation des CDHs et LPMOs à la dégradation des polymères d'hémicellulose a été observée chez les champignons de pourriture blanche et molle. En effet, les CDHs sont capables d'accepter des électrons de différents oligosaccharides incluant des xylosaccharides. Chez *P. chrysosporium*, la coproduction de CDH et LPMO a été détectée en réponse à la cellulose et au xylane (Hori *et al.*, 2011). De plus, le clivage de xyloglucane, β-glucane et glucomannane a été démontré avec la LPMO9C provenant du champignon *N. crassa* en présence d'un réducteur, l'acide ascorbique (Agger *et al.*, 2014). Cela suggère que ces enzymes sont impliquées à la fois dans la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses au sein de la biomasse lignocellulosique.

3.2.2 Spécificités de substrats entre les champignons de pourriture brune et blanche

Une préférence de substrat pour les feuillus ou les conifères est également observée entre les champignons de pourriture blanche et brune. Les champignons de pourriture blanche sont communément isolés à partir de bois de feuillus en comparaison aux champignons de pourriture brune isolés à partir de bois de conifères. Cela peut s'expliquer par une différence de composition en hémicellulose entre ces essences et les sets d'enzymes associés à ces agents de pourriture. En effet, les feuillus contiennent majoritairement des hémicelluloses de type glucuronoxylane alors que les conifères de type galactoglucomannane (Fig. 14) (Gírio *et al.*, 2010).

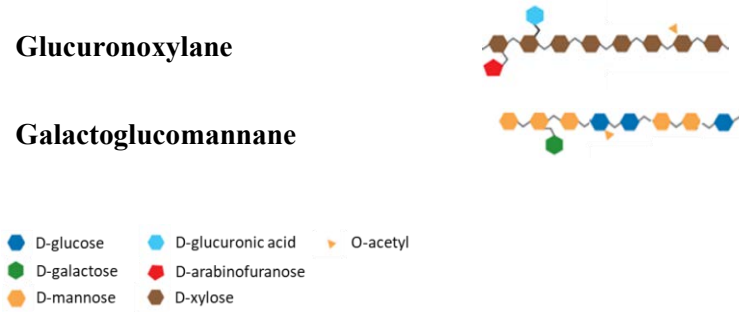


Figure 14. Représentation schématique des structures des hémicelluloses de type glucuronoxylane et galactoglucomannane.

Les hémicelluloses de type glucuronoxylane sont composées d'un squelette d'unité β-D-xylopyranosyl liées par des liaisons glycosidiques β-(1,4). Ils peuvent être composés de résidus d'acides uroniques, de résidus L-rhamnose, de résidus d'arabinose et de groupements acétyls (Gírio *et al.*, 2010). La dégradation de ces hémicelluloses implique ainsi la sécrétion d'un ensemble d'enzymes capables de dégrader le squelette de xylane (β-1,4-endoxylanases, β-1,4-xylosidases) et les résidus qui y sont attachés (α-arabinofuranosidases, arabinoxylan arabinofuranohydrolases, α-glucuronidases et acetyl xylan esterases) (Mäkelä *et al.*, 2014).

Les hémicelluloses de type galactoglucomannane sont composées d'un squelette d'unités β-D-glucopyranosyl et β-D-mannopyranosyl liées par des liaisons β-(1,4) glycosidiques. Ces unités sont partiellement acétylées en C2 ou C3 et substituées par des unités α-D-galactopyranosyl (Gírio *et al.*, 2010). La dégradation de ces polymères implique l'action de différentes enzymes telles que des endomannanases, des β-mannosidases, des α- et β-galactosidases, des β-glucosidases, et des galactomannan acetyl esterases (Mäkelä *et al.*, 2014).

Cette spécificité de substrat s'explique notamment par la présence d'un arsenal enzymatique différent entre les champignons de pourriture brune et blanche. En effet, les champignons de pourriture brune ont perdu un ensemble de gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation des hémicelluloses de type xylane telles que des endoxylanases (GH10 et GH11) et glucuronoyl esterases (CE15) (Martinez

et al., 2009; Rytioja *et al.*, 2014; Vanden Wymelenberg *et al.*, 2010). De plus, plusieurs champignons de pourriture brune (*C. puteana*, *Dacryopinax sp.*, *F. pinicola*, *P. placenta*, and *S. lacrymans*) ont perdu les gènes codant pour les acetyl xylane esterases et feruloyl esterases (CE1) (Rytioja *et al.*, 2014). Ces différences exposent ainsi de plus faible capacité des champignons de pourriture brune à dégrader les hémicelluloses de type xylane.

Bien qu'une préférence de substrat soit communément observée, des exceptions dérogent à cette règle. Par exemple, au sein d'un même genre, les espèces de pourriture blanche *P. chrysosporium* et *Phanerochaete carnosa* sont retrouvées sur des bois de feuillus et de conifères respectivement (Suzuki *et al.*, 2012). Néanmoins, ces spécificités de substrats ont été corrélées avec le répertoire enzymatique de ces deux espèces. Des analyses de sécrétome de *P. chrysosporium* et *P. carnosa* en réponse à un milieu contenant de la cellulose ont permis de mettre en évidence la sécrétion d'une mannosidase et mannanase chez *P. carnosa* en comparaison à *P. chrysosporium* (Mahajan et Master, 2010; Rytioja *et al.*, 2014; Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009; Wymelenberg *et al.*, 2006). Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation des hémicelluloses de type galactoglucomannane qui sont retrouvées dans les essences de conifères. Ceci démontre bien une corrélation entre la composition des enzymes sécrétées par les champignons et les bois sur lesquels ils se développent dans l'environnement.

4. Dégradation de la pectine

4.1 Structure de la pectine

La pectine est un polysaccharide composé d'acide D-galacturonique. Elle est retrouvée principalement dans la paroi primaire et la lamelle moyenne des cellules végétales, et forme des liaisons avec la cellulose et les hémicelluloses (Caffall et Mohnen, 2009). Trois grands groupes de pectine ont été définis : les homogalacturonanes, les xylogalacturonanes, et les rhamnogalacturonanes (types I et II) (Fig. 15) (Caffall et Mohnen, 2009; Ridley *et al.*, 2001).

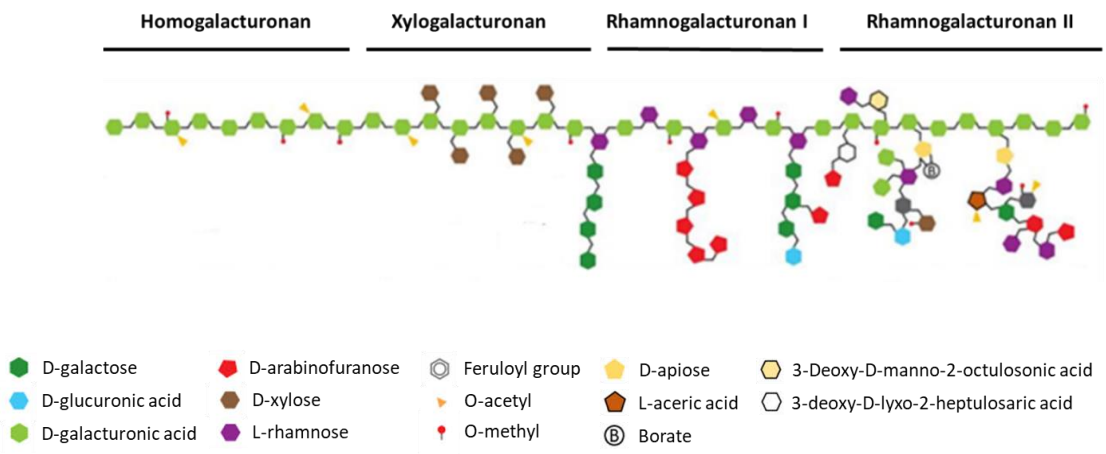


Figure 15. Structure des polymères de pectine (Schmitz *et al.*, 2019).

Les homogalacturonanes, appelés également « smooth region of pectin », constituent un polymère linéaire composé de résidus d'acide D-galacturonique liés par des liaisons α-(1,4) qui peuvent être méthylés ou acétylés. Les xylogalacturonanes se composent également d'un squelette de résidus d'acide D-galacturonique, sur lesquels sont ajoutés des résidus D-xylose liés par des liaisons β-(1,3). Le groupe des rhamnogalacturonanes se divise en deux sous-groupes nommés type I et type II. Les rhamnogalacturonanes de type I sont composés d'un squelette alternant des résidus d'acide D-galacturonique et L-rhamnose qui sont liés respectivement pas des liaisons α-(1,2) et α-(1,4). Cette classe de pectine est également appelée « hairy region of pectin » car des chaînes latérales d'arabinane ou d'arabinogalactane I peuvent être ajoutées sur les résidus rhamnose. Les rhamnogalacturonanes de type II possèdent un squelette de résidus d'acide D-galacturonique sur lesquels un ensemble de 12 résidus peuvent être attachés (ex : 2-O-methyl xylose, 2-O-methyl fucose, aceric acid, 2-keto-3-deoxy-D-lyxo heptulosaric acid) (Mäkelä *et al.*, 2014).

4.2 Mécanismes de dégradation des polysaccharides de pectine

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la pectine ont été étudiées principalement chez les Ascomycètes et corrélées à chaque groupe de pectine décrit (homogalacturonane, xylogalacturonane et rhamnogalacturonane) (Mäkelä *et al.*, 2014). La dégradation des polymères d'homogalacturonane et de xylogalacturonane implique plusieurs enzymes telles que des endo- et exopolygalacturonases, pectate lyases, pectin acetyl et pectin methyl esterases, et des β-xylosidases (Fig. 16). La dégradation des polymères de rhamnogalacturonane de type I nécessite l'implication d'enzymes supplémentaires dû à la présence de résidus rhamnose et de résidus greffés au squelette telles que les rhamnogalacturonan hydrolases et lyases, β-glucuronidases, endo et exo-arabinanases, α-arabinofuranosidases, endogalactanases, β-galactosidases, feruloyl esterases, et rhamnogalacturonan acetyl esterases (Fig. 16) (Mäkelä *et al.*, 2014). De par sa structure atypique, le rhamnogalacturonane de type II constitue une structure hautement résistante face à ces enzymes pectinolytiques (Mäkelä *et al.*, 2014).

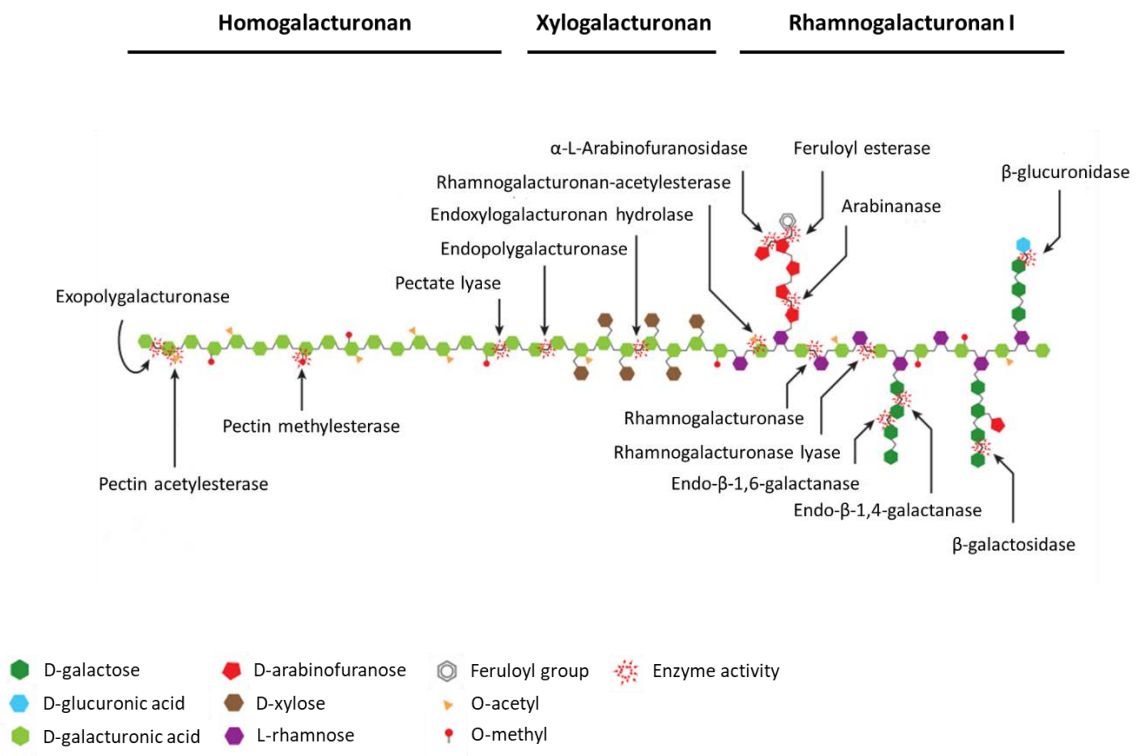


Figure 16. Mécanisme d'action des enzymes impliquées dans la dégradation des polymères de pectine (Glass *et al.*, 2013).

Dû à la diversité et complexité des résidus présents dans les polymères de pectine, la dégradation de ce polymère nécessite une machinerie enzymatique élaborée. En effet, un ensemble de 80 protéines a été identifié dans le sécrétome de *N. crassa* en réponse à la pectine (Benz *et al.*, 2014). Une comparaison des sécrétomes de *N. crassa* en réponse à la cellulose, au xylane et à la pectine a permis d'identifier 55 protéines sécrétées uniquement en réponse à la pectine ce qui démontre la complexité enzymatique liée à la dégradation de ce composé (Benz *et al.*, 2014; Sun et Glass, 2011; Tian *et al.*, 2009).

5. Régulation des mécanismes de dégradation des polysaccharides du bois

Les champignons produisent une cohorte d'enzymes spécifiques pour pouvoir dégrader la diversité de polymères osidiques présents au sein de la biomasse lignocellulosique. La production de ces enzymes est induite de façon coordonnée pour dégrader efficacement le bois. L'expression des gènes codant ces enzymes est contrôlée par un réseau de facteurs de transcription qui sont actifs en réponse à des substrats spécifiques. Les facteurs de transcription impliqués dans la dégradation et l'utilisation de la cellulose, des hémicelluloses et de la pectine ont été identifiés principalement chez des espèces appartenant à l'ordre des Ascomycètes (ex : *N. crassa*, *T. reesei, A. nidulans*, *A. niger*) (Benocci *et al.*, 2017). Cependant, les protéines orthologues de ces facteurs de transcription n'ont pas pu être identifiées par similarité de séquence chez les Basidiomycètes, à l'exception du répresseur transcriptionnel CreA/Cre1

(Todd *et al.*, 2014). L'état de l'art des régulateurs transcriptionnels connus et les enzymes dont ils régulent l'expression génique sont présentés ci-dessous.

5.1 Facteurs transcriptionnels impliqués dans la dégradation et l'utilisation des polysaccharides du bois

En présence de lignocellulose, les champignons dégradeurs de bois perçoivent de faibles concentrations en sucres simples dans leur environnement. Cela conduit à un phénomène de dérépression de l'expression des gènes codant des enzymes hydrolytiques et des transporteurs de haute affinité par le système de répression du catabolisme de substrats carbonés (Coradetti *et al.*, 2012; Delmas *et al.*, 2012). La dégradation des polymères libère des oligosaccharides qui agissent comme des inducteurs sur l'activité des facteurs de transcription permettant l'activation de l'expression des gènes codant les enzymes de dégradation (Fig. 17). Plusieurs molécules inductrices issues de la dégradation des polysaccharides du bois ont été décrites (ex : cellobiose, cellotriose, sophorose) (Sternberg et Mandels, 1979; Suzuki *et al.*, 2010; Znameroski *et al.*, 2012). Cependant, ces systèmes d'induction diffèrent entre les espèces fongiques (Amore *et al.*, 2013; Znameroski *et al.*, 2012). Par exemple, deux inducteurs ont été clairement identifiés : le cellobiose et le sophorose. Pour étudier l'effet inducteur de ces molécules chez *N. crassa*, une souche délétée pour les gènes codant les β-glucosidases a été utilisée. Cette souche permet d'empêcher la dégradation des disaccharides en glucose et donc inhibe l'activation de la répression du catabolisme de substrats carbonés (Znameroski *et al.*, 2012). Chez ce mutant, uniquement le cellobiose induit l'expression des gènes codant pour des cellulases. A l'inverse, chez *T. reesei*, le sophorose induit l'expression des gènes codant pour des cellulases à la différence du cellobiose (Sternberg et Mandels, 1979).

Chez *N. crassa*, deux régulateurs transcriptionnels impliqués dans la dégradation et l'utilisation de la cellulose ont été identifiés et nommés *clr-1* et *clr-2* (Coradetti *et al.*, 2012). Les mutants délétés pour ces gènes ont été identifiés via un criblage de mutants avec un déficit de croissance sur de la cellulose crystalline (Avicel®). Des études de transcriptomique chez *N. crassa* ont permis d'identifier la régulation spécifique d'un ensemble de 212 gènes en réponse au substrat Avicel® et a été nommé « régulon Avicel » (Fig. 17). Au sein de ce régulon, l'expression de 135 gènes est régulée par CLR-1 et CLR-2, incluant des gènes codant pour des transporteurs de cellodextrines et des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose (Coradetti *et al.*, 2012). Plus précisément, CLR-1 régule de manière directe l'expression de 27 gènes (fixation à la région promotrice) codant pour des endo-β-1,4-glucanases, AA9 LPMOs, exo-β-1,4-glucanases, β-glucosidases, et des transporteurs de cellodextrines. Concernant les cibles régulées par CLR-2, 37 gènes ont été identifiés dont 23 codent pour des protéines impliquées dans l'utilisation de la cellulose et 12 dans l'utilisation du xylane ou mannane (Craig *et al.*, 2015; Samal *et al.*, 2017). Les orthologues de CLR-1 et CLR-2 ont été identifiés chez *A. nidulans* et

nommés ClrA et ClrB respectivement. Ces facteurs de transcription régulent également l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation des polysaccharides de cellulose et d'hémicellulose. Cependant, le mécanisme d'action de ClrA ne semble pas conservé entre ces deux espèces car la délétion de *clrA* résulte en une faible diminution de l'expression des cellulases et hémicellulases en comparaison à la souche de *N. crassa* délétée pour *clr-1* (Coradetti *et al.*, 2012).

Concernant les hémicelluloses, le facteur de transcription XlnR est un régulateur majeur de l'expression des gènes impliqués dans la dégradation et l'utilisation des hémicelluloses. Ce facteur de transcription a d'abord été identifié chez *A. niger* (XlnR) puis caractérisé chez d'autres Ascomycètes tels que *T. reesei* (Xyr1) et *N. crassa* (XLR-1) (Stricker *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012; van Peij *et al.*, 1998). Chez ces différentes espèces, ces facteurs de transcription régulent l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le catabolisme du D-xylose et les gènes xylanolytiques (Stricker *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012; van Peij *et al.*, 1998). Cependant, les gènes dont l'expression est régulée par XlnR/Xyr1/XLR-1 diffèrent selon les espèces. En effet, chez les espèces du genre *Aspergillus* (à l'exception de *Aspergillus aculeatus*) et *T. reesei*, XlnR est impliqué également dans la régulation du système cellulolytique alors que seulement quelques gènes codant pour des cellulases sont régulés chez *N. crassa* (Fig. 17). De plus, chez *T. reesei*, Xyr1 est impliqué dans la régulation du système arabinanolytique (Akel *et al.*, 2009). Chez *T. reesei*, les systèmes cellulolytique et hémicellulolytique sont régulés également par les facteurs de transcription ACE2 et ACE3. A la différence de *N. crassa* et les espèces du genre *Aspergillus*, aucun orthologue de CLR-1 n'a été identifié chez *T. reesei* (Tani *et al.*, 2014).

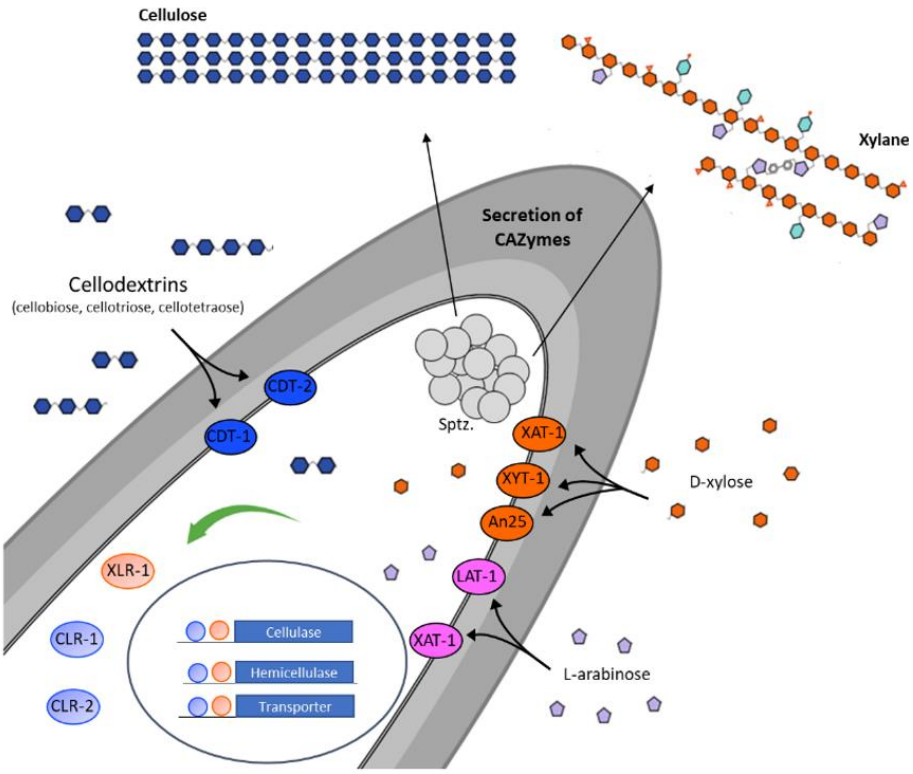


Figure 17. Perception de ressources carbonées et mécanismes de régulation de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'utilisation et la dégradation des polysaccharides de la lignocellulose chez *N. crassa*. La dégradation des polysaccharides par les CAZymes conduit à la détection et au transport de saccharides dans les cellules fongiques par l'activité d'un ensemble de transporteurs. La détection des composés carbonés dans l'environnement conduit ainsi en l'activation de régulateurs transcriptionnels qui induisent l'expression de CAZymes et de transporteurs pour dégrader et récupérer les ressources carbonés présentes dans le bois (Benz *et al.*, 2014; Coradetti *et al.*, 2012, 2013; Samal *et al.*, 2017; Seibert, 2016; Znameroski *et al.*, 2014).

Bien que ces régulateurs transcriptionnels jouent un rôle important chez les Ascomycètes, aucun orthologue n'a été identifié par similarité de séquence chez les Basidiomycètes. Néanmoins, un activateur transcriptionnel impliqué dans la dégradation de la cellulose a été identifié récemment chez le Basidiomycète *S. commune* (Marian *et al.*, 2022). Ce facteur de transcription a été nommé Roc1 (pour Regulator of cellulase 1) et semble être conservé uniquement au sein de la classe des Agaricomycètes. La délétion de *roc1* résulte en l'incapacité de *S. commune* à croître en présence de cellulose et montre une inhibition de croissance en présence de cellobiose et xylane. Plus précisément, des analyses transcriptomiques de la souche WT et délétée pour *roc1* ont permis de mettre en avant la régulation spécifique d'un ensemble de 194 gènes en présence de cellulose. Ce régulon se compose de gènes codant pour des LPMOs, des endo β-1,4-glucanases, des β-glucosidases, des 1,4-β-xylosidases et des β-d-xylosidases. Ces différents résultats suggèrent ainsi un rôle de Roc1 dans la régulation des gènes impliqués dans la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses. Des orthologues de Roc1 ont également été identifiés chez *Agaricus bisporus* et *Dichomitus squalens*. De manière intéressante, leurs

profils d'expression sont similaires à celui de Roc1 chez *S. commune* en réponse à la lignocellulose (Daly *et al.*, 2019; Morin *et al.*, 2012).

Les facteurs transcriptionnels AraR, RhaR, GaaR, GalR et GalX ont été caractérisés au sein des espèces Aspergilli et sont impliqués dans la régulation des gènes codant des protéines impliquées dans la dégradation de la pectine. Ces facteurs de transcription sont activés en réponse à différents monosaccharides tels que des résidus L-arabinose pour AraR, L-rhamnose pour RhaR , D-galactose pour GalR/X et l'utilisation de l'acide D-galaturonique est régulé par GaaR (activateur) et GaaX (répresseur) (Benocci *et al.*, 2017).

5.2 La répression du catabolisme de substrats carbonés

La répression du catabolisme de substrats carbonés est un processus central de régulation présent chez la majorité des micro-organismes. Ce phénomène favorise l'assimilation de la source carbonée la plus facilement métabolisable (le glucose) par la répression de l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de sources carbonées alternatives. En ce sens, lors de la dégradation de la biomasse lignocellulosique, la libération de glucose dans le milieu conduit à la répression de l'expression des gènes impliqués dans la dégradation de composés carbonés complexes. Ce processus est régulé par un acteur transcriptionnel central nommé Cre1/CreA chez les champignons filamenteux et connu sous le nom de Mig1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Brown *et al.*, 2014). CreA a été identifié pour la première fois chez *A. nidulans* (Arst *et al.*, 1990; Bailey et Arst, 1975) et les protéines orthologues de CreA ont ensuite été identifiées et caractérisées chez *N. crassa* et *T. reesei* (de la Serna *et al.*, 1999; Ilmén *et al.*, 1996). Bien que ce processus ait été étudié principalement chez des champignons appartenant à l'embranchement des Ascomycètes, des orthologues de CreA ont été identifiés dans la plupart des génomes de Basidiomycètes séquencés (Todd *et al.*, 2014). Des études portant sur la répression du catabolisme de substrats carbonés ont été réalisées chez plusieurs Basidiomycètes tels que *P. chrysosporium* (Suzuki *et al.*, 2008) et *D. squalens* (Daly *et al.*, 2019) avec seulement une étude fonctionnelle effectuée chez *P. ostreatus* (Yoav *et al.*, 2018). Cette étude démontre ainsi le rôle régulateur de CRE1 sur les enzymes impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique (Yoav *et al.*, 2018).

Lors de la dégradation du bois, les champignons de pourriture requièrent la mise en place de différents systèmes pour utiliser les produits issus de la biomasse lignocellulosique. Chez *N. crassa*, des analyses de transcriptomique et protéomique chez un mutant délété pour *cre-1* ont permis d'identifier une augmentation de l'expression des gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose en réponse au substrat Avicel® (Sun et Glass, 2011). Plus précisément, CRE-1 se lie aux promoteurs des gènes codant les facteurs de transcription CLR-1 et ARA-1 et les transporteurs de

cellodextrines CDT-1, CDT-2 et SUT-12/CBT-1. Ces résultats suggèrent ainsi une action de CRE-1 à différents niveaux impliquant une répression de l'expression des gènes codant des transporteurs spécifiques, des facteurs de transcription et des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides de cellulose, hémicellulose et pectine (Wu *et al.*, 2020). L'utilisation de mutants de CreA chez *A. nidulans* et *T. reesei* a permis de mettre en avant également la régulation d'un ensemble d'hémicellulases et de pectinases en plus des gènes codant pour des cellulases (Aro *et al.*, 2005).

Chez les Basidiomycètes, la fonction répresseur de CRE1 a été démontrée chez *P. ostreatus* par l'utilisation de mutants (Yoav *et al.*, 2018). Des transformants délétés (KO*cre1*) et surexprimant (OE*cre1*) le gène *cre1* ont permis de mettre en avant le rôle de cette protéine dans la régulation de l'expression des enzymes cellulolytiques. En effet, la délétion de *cre1* résulte en une augmentation des activités cellulolytiques en réponse à la cellulose et la lignocellulose (paille de blé) alors que la surexpression de *cre1* conduit à une diminution de ces mêmes activités. Ainsi cette étude a permis de démontrer pour la première fois de manière fonctionnelle l'action répresseur de CRE1 chez un Basidiomycète. La répression du catabolisme de substrats carbonés a également été étudiée chez le Basidiomycète *D. squalens* par des analyses de transcriptomique et exoprotéomique (analyse du sécrétome : protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire) (Daly *et al.*, 2015). Ces analyses ont permis de mettre en évidence la répression de l'expression de plusieurs groupes de gènes par le glucose. Ces gènes codent pour des enzymes ayant des activités hydrolase, des transporteurs trans-membranaires de sucres ainsi qu'un ensemble de gènes codant des enzymes impliquées dans le catabolisme des celluloses, hémicelluloses et pectine. Des études portant sur la répression du catabolisme de substrats carbonés ont également été initiées chez d'autres Basidiomycètes par l'analyse de l'expression de gènes spécifiques. Par exemple, chez *P. chrysosporium*, des expériences de RT-qPCR ont permis de mettre en avant des phénomènes de répression et dérépression de gènes codant des enzymes avec des activités cellulolytiques. En effet, les gènes codant pour les enzymes cel7C, cel7D, cel6A et CDH sont fortement réprimés en présence de glucose puis surexprimés après consommation de glucose dans le milieu (Suzuki *et al.*, 2008). L'analyse du sécrétome de *P. chrysosporium* a permis également de révéler une composition différente des protéines sécrétées en présence et en absence de glucose (Nguyen *et al.*, 2020). L'étude de CRE1 chez d'autres Basidiomycètes pourrait ainsi permettre d'obtenir davantage d'informations pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués lors de la dégradation du bois.

5.3 Intersections entre la voie de TOR et la répression du catabolisme de substrats carbonés dans les processus de dégradation du bois chez les champignons

Chez les eucaryotes, la voie de TOR est au cœur des processus cellulaires régulant la croissance (González *et al.*, 2020; Shertz *et al.*, 2010). L'acteur principal de cette voie est une protéine kinase appelée TOR pour Target Of Rapamycin dont l'activité est inhibée de manière spécifique par la

molécule de rapamycine (Heitman *et al.*, 1991). Chez *S. cerevisiae*, l'activité de cette protéine est régulée par des signaux environnementaux tels que la disponibilité en nutriments et la présence de stress (Bertram *et al.*, 2002; Stracka *et al.*, 2014). En réponse à ces signaux, la protéine TOR module des processus essentiels à la croissance tels que la synthèse protéique, la biogénèse des ribosomes, l'autophagie et l'organisation du cytosquelette (Wullschleger *et al.*, 2006). Récemment, les différents acteurs moléculaires de la voie de TOR ont été identifiés par homologie de séquence chez le champignon de pourriture blanche *P. chrysosporium* (Nguyen *et al.*, 2020). L'activité toxique et antifongique de la rapamycine a été validée chez ce champignon et a permis de mettre en évidence le rôle de la voie de TOR dans la germination des conidies, la croissance végétative et la composition du sécrétome de *P. chrysosporium*. Cela suggère ainsi la présence de connections entre la voie de TOR, acteur central de la croissance chez les eucaryotes, et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression des gènes codant les CAZymes chez les champignons ligninolytiques.

Bien que les mécanismes de régulation des CAZymes aient été décrits principalement chez les Ascomycètes, la répression catabolique de substrats carbonés a également été mise en évidence chez les Basidiomycètes. En utilisant les données acquises chez la levure *S. cerevisiae* et les champignons ligninolytiques appartenant au phylum des Ascomycètes, l'objectif du chapitre présenté ci-dessous est de mettre en lumière les potentiels mécanismes de régulation exercés par la voie de TOR sur l'expression des gènes codant les enzymes de dégradation du bois chez les Basidiomycètes. Les acteurs moléculaires impliqués dans la voie de TOR et le CCR étant conservés chez les Basidiomycètes, l'utilisation de ces données pourrait permettre d'élucider de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des CAZymes chez les champignons de pourriture blanche.

Article n°1 : How to rot: A role for TOR. Interplay between carbon catabolite repression and TOR signaling pathway.

Auteurs : Delphine Noël, Duy Vuong Nguyen, and Rodnay Sormani

https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.002

CHAPTER FIVE

How to rot: A role for TOR. Interplay between carbon catabolite repression and TOR signaling pathway

Delphine Noël, Duy Vuong Nguyen, and Rodnay Sormani*
Université de Lorraine, INRAE, IAM, Nancy, France
*Corresponding author: e-mail address: rodnay.sormani@univ-lorraine.fr

Contents

1. Introduction 152
2. Interplays between glucose-induced carbon catabolite repression pathway and TOR signaling pathway in the yeast *S. cerevisiae* 153
   2.1 Glucose sensing by the AMPK/Snf1 pathway 153
   2.2 Glucose sensing by the PKA pathway 156
   2.3 Glucose sensing by casein kinases 157
3. Lessons from the "soft-rot" fungi 158
   3.1 Cellulose as substrate, from glucose starvation to glucose as a main source of carbon for rotting fungi 158
   3.2 Carbon catabolite repression in filamentous "soft-rot" fungi 161
4. A role for TOR in basidiomycete "white-rot" fungi 163
   4.1 A carbon catabolite repression program in white-rot basidiomycete fungi? 164
   4.2 Involvement of nitrogen perception in wood decay? 165
5. Conclusion 167
References 167

Abstract

Dead wood is mainly composed of cellulose and hemicellulose which are sugar polymers but also of lignin, a polymer of phenolic compounds. Wood is an ecological niche for lignocellulosic saprotrophic fungi which are able to degrade those polymers and use degradation products for their growth. The major component released from wood decay is glucose. In the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a saprotrophic but not a lignocellulolytic fungus, glucose is more than a nutrient. It is also a signal molecule reprogramming cell physiology. This phenomenon, described as glucose-induced carbon catabolite repression occurs through signaling cascades interacting with the TOR signaling pathway. In filamentous soft-rot fungi, growing on lignocellulosic materials leads to carbon catabolite repression and involves the TOR signaling pathway in the

Advances in Botanical Research, Volume 99
ISSN 0065-2296
https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.002

Copyright © 2021 Elsevier Ltd
All rights reserved.

regulation of this cellular program. White-rot fungi are able to use all woody components including lignin. A carbon catabolite repression program has also been depicted in those fungi. Key actors of this program can be identified in white-rot fungi including segments of a TOR signaling pathway. This review aims to summarize those interplays between carbon catabolite repression and TOR signaling pathway in these different fungi.

1. Introduction

Wood degradation by rotting fungi has one goal, retrieve nutrients to grow. Most extracellular enzymes involved in the cleavage of wood polysaccharides belong to CAZymes and mediate the lignocellulose decaying process. Nutrient sensing pathways, especially those enabling the use of preferred carbon sources are essential in the survival strategy elaborated by fungi. In filamentous fungi, those pathways act upstream of the direct activation of genes encoding carbohydrate-active-enzymes (CAZymes) (Levasseur, Drula, Lombard, Coutinho, & Henrissat, 2013; Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014) and modulate their expression according to medium conditions. Cellulose and hemicellulose constitute the main components of plant cell wall providing high levels of available glucose for rotting fungi. Besides glucose, hemicellulose and pectin degradation supply other sugars such as xylose, mannose, galactose, rhamnose and glucuronic acid. Among rotting fungi, a particular interest is focused on white-rot fungi due to their singular ability to mineralize the lignin component of wood. This property suggests that lignin degradation products could be used by those fungi as well.

To survive, fungi have to cope with their environment and adapt their growth according to the availability of nutrients. To select preferred carbon source as glucose during wood decay process, a signaling pathway called carbon catabolite repression has been established and leads to a genetic re-programming of cells. Indeed, in presence of glucose, the genes coding enzymes involved in the uptake and catabolism of the less desirable carbon sources are transcriptionally repressed (Adnan et al., 2018; Gancedo, 1998).

The TOR (Target of Rapamycin) pathway is a signaling pathway conserved in all eukaryotes (González, Hall, Lin, & Hardie, 2020; Shertz, Bastidas, Li, Heitman, & Cardenas, 2010). As its name implies, this pathway features a Ser/Thr kinase named TOR, which is inhibited by a macrolide antibiotic called Rapamycin (Heitman, Movva, & Hall, 1991). In cells, TOR kinases are present as two complexes called TORC1 and TORC2.

In *Saccharomyces cerevisiae*, TORC1 is composed of Tor1 or Tor2, Lst8, Kog1 and Tco89 while TORC2 is composed of Tor2, Lst8, Avo1, Avo2, Avo3/Tsc11, Bit2 and Bit61 (Eltschinger & Loewith, 2016; Loewith, 2010; Roelants, Leskoske, Martinez Marshall, Locke, & Thorner, 2017). Using rapamycin to inhibit TOR kinase activity and genetic studies, the TOR signaling pathway has been deciphered in diverse organisms although most of the information stem from mammalian cells and *S. cerevisiae*. In the current knowledge, the TOR signaling pathway integrates cues from different signaling pathways to sense nutrient availability, cellular energy level and hormones leading to an adjustment of cell growth (Liu & Sabatini, 2020; Wullschleger, Loewith, & Hall, 2006).

In the following paragraphs, we will discuss about the interplays between the TOR signaling pathway and carbon catabolite repression induced by glucose in the model yeast *S. cerevisiae* and in lignocellulolytic filamentous fungi from the Ascomycota phylum. Then, we will summarize current knowledge about those pathways in Basidiomycete white-rot fungi.

2. Interplays between glucose-induced carbon catabolite repression pathway and TOR signaling pathway in the yeast *S. cerevisiae*

In the model yeast *S. cerevisiae*, the presence of glucose in the extracellular medium leads to the repression of genes involved in the uptake and catabolism of other carbon sources (Gancedo, 1998). To better understand the mechanisms involved during this metabolism shift, three signaling pathways need to be considered as (i) AMPK (AMP-activated protein kinase) known as Snf1 in *S. cerevisiae* (Sanz, Viana, & Garcia-Gimeno, 2016), (ii) PKA (Protein Kinase A) (Kim et al., 2013; Zhang & Cao, 2017) and (iii) Casein kinases Yck1, Yck2 and their involvement in the proteasome functioning (Paiva et al., 2009) (Fig. 1).

2.1 Glucose sensing by the AMPK/Snf1 pathway

In *S. cerevisiae*, hexose transporters are coded by the multigenic *HXT* family of 20 genes named *HXT1-17* plus one gene coding for a galactose transporter named *GAL2* and two genes coding for glucose receptors named *SNF3* and *RTG2* (Diderich et al., 1999; Wieczorke et al., 1999). The Hexose kinase 2 (Hxk2) can be inactivated by autophosphorylation when interacting with xylose, while when glucose is present in the cell, Hxk2 is protected from inactivation by xylose due to Hxt activities. As a consequence,

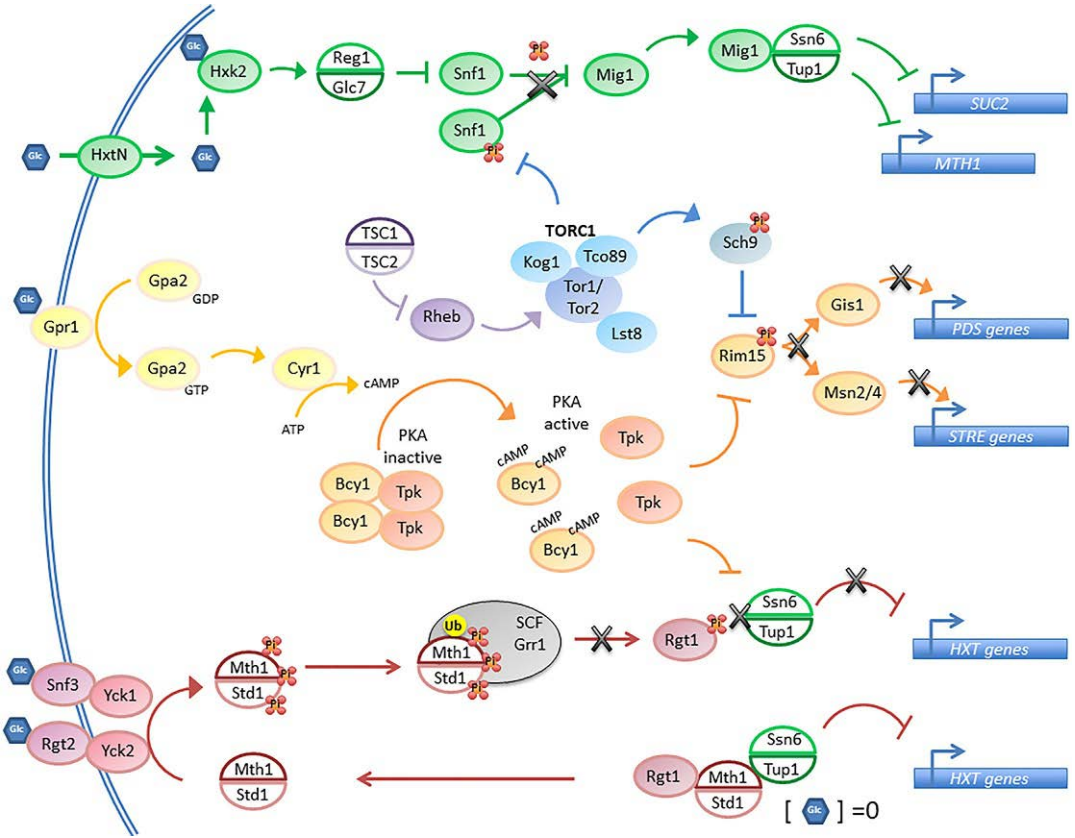


Fig. 1 See figure legend on opposite page.

Hxk2 acts as an intracellular glucose sensor (Vega, Riera, Fernández-Cid, Herrero, & Moreno, 2016). Therefore, in the presence of glucose, Hxk2 activates Reg1 which turns on the Reg1/Glc7 phosphatase complex and leads to the inhibition of the kinase Snf1 (Sanz, Alms, Haystead, & Carlson, 2000). The Snf1 kinase is the catalytic subunit of the AMPK/SNF1 complex (Hedbacker & Carlson, 2008) and is involved in the regulation of the expression of glucose-repressed genes by inhibiting the Mig1 transcription repressor (Fig. 1, green tones).

Indeed, in glucose depleted conditions, Mig1 is phosphorylated and inactivated by Snf1 leading to the release of carbon catabolite repression program and hence to the expression of glucose-repressed genes. The phosphorylation state of Mig1 controls its export from nucleus to cytoplasm while when glucose is added to de-repressed cells, the repressor protein Mig1 is imported in the nucleus. In the nucleus, Mig1 binds to upstream regulatory elements (URE) of genes coding for transcription factors involved in alternative carbon usage and represses the transcription of nearly 350 genes

Fig. 1 Interplays between TORC1 and the glucose induced carbon catabolite repression in *S. cerevisiae*. The three main pathways involved in sugar perception are presented as well as the interactions of TORC1 with those pathways in blue tones. In repressive conditions, glucose is available and enters into the cell through Hexose transporters N ($1 < N < 17$). Inside the cell, glucose interacts with Hxk2 which activates the phosphatase complex Reg1/Glc7. This complex dephosphorylates the kinase Snf1. As there is no inhibition of Mig1 activity by Snf1 kinase, Mig1 binds to Ssn6/Tup1 complex leading to the inhibition of *SUC2* gene. The TORC1 complex is represented in blue in the scheme. In addition, a feedback loop between SNF1 and TORC1 complex involving TSC1/2 and rheb proteins, which are conserved in soft-rot fungi although missing in *S. cerevisiae*, is represented in purple tones. The second signaling pathway, depicted in yellow tones, involves the GPCR Gpr1 to sense glucose at plasma membrane. Gpr1 activates the G protein Gpa2 which turns on the adenylate cyclase Cyr1 leading to cAMP biosynthesis. cAMP molecules trigger the activation of the PKA complex which phosphorylates and inhibits Rim15 protein. It results in the inhibition of transcription factors Gis1 and Msn2/4 and so the non-induction of *PDS* and *STRE* genes. In parallel, the TOR pathway was shown to activate Sch9 leading to the inhibition of Rim15 as well as PKA pathway. The last branch is depicted in red tones and involves the repressor complex Rgt1-Mth1/Std1–Ssn6/Tup1. In glucose depleted conditions, those proteins are associated and form a repressor complex leading to the inhibition of *HXT* gene expression. In glucose conditions, transceptors Snf3 and Rgt2 stimulate the phosphorylation of repressor Mth1-Std1 through casein kinase Yck1 and 2 activity. That phosphorylation triggers the ubiquitination and proteasome degradation of that complex. In parallel, PKA catalytic subunits phosphorylate Rgt1 protein preventing the establishment of the repressor complex and so allowing the expression of *HXT* genes.

including the gene coding for the saccharase Suc2 (Treitel & Carlson, 1995). More precisely, Mig1 was shown to form a complex with transcriptional co-repressors of glucose-repressed genes named Tup1 and Ssn6 (Papamichos-Chronakis, Gligoris, & Tzamarias, 2004). That complex binds to promoters of alternative carbon usage genes leading to their repression through the modulation of nucleosome positioning (Hedbacker & Carlson, 2008; Treitel & Carlson, 1995).

In addition, TORC1 can directly inhibit the kinase activity of Snf1 on Mig1 through phosphorylation at Thr210 (Orlova, Kanter, Krakovich, & Kuchin, 2006). That is a first point of interplay identified between glucose sensing and TOR signaling pathway. Interestingly, in human cells, AMPK (human homolog of Snf1) phosphorylates TSC1 in the TSC1/TSC2 complex leading to the inhibition of TORC1 activity (González et al., 2020). In *S. cerevisiae*, a TSC1/TSC2 complex does not exist but was shown to be conserved in other fungi (González et al., 2020; Shertz et al., 2010). In that respect, this complex could be involved in feedback loop regulation in filamentous fungi compared to *S. cerevisiae* (Fig. 1, purple tones).

2.2 Glucose sensing by the PKA pathway

The second pathway involved in glucose perception involves the PKA role (Fig. 1, yellow tones). In presence of glucose, a GPCR (G protein-coupled receptor) named Gpr1 is activated. GPCRs are membrane receptors coupled to a trimeric G protein including the alpha, beta and gamma subunits. Glucose sensing by Gpr1 activates the alpha subunit called Gpa2 and leads to the activation of the adenylate cyclase Cyr1 (Kraakman et al., 1999; Xue, Batlle, & Hirsch, 1998).

The Cyr1 protein catalyzes the synthesis of AMPc molecules which can bind to the PKA complex. PKA is a heterotetrameric complex composed of two regulatory subunits, a couple of Bcy1 subunits, and two catalytic subunits among Tpk1, Tpk2, Tpk3. AMPc molecules bind to the regulatory subunits of PKA and trigger the release of the active catalytic subunits. The activation of catalytic subunits leads to the phosphorylation and inhibition of the kinase Rim15 (Pedruzzi et al., 2003; Zhang & Cao, 2017). In absence of glucose, Rim15 is activated and phosphorylates transcription factors such as Msn2 and Msn4 which bind Stress Responsive Elements (STRE) to induce transcription of stress responsive genes (Hirata, Andoh, Asahara, & Kikuchi, 2002) as well as Gis1 transcription factor, binding PDS element in the promoters of genes involved in Post-Diauxic Shift (Pedruzzi, Bürckert, Egger, & De Virgilio, 2000).

In parallel, Sch9, a kinase under the control of the TOR pathway (Urban et al., 2007), exerts a similar role than PKA on Rim15 in a non-redundant manner (Roosen et al., 2005). The Sch9 kinase is the *S. cerevisiae* homolog of mammalian Akt/PKB and was described to control the nuclear localization of Rim15 and its repressor activity on PDS and STRE genes expression (Pedruzzi et al., 2003). As Sch9 kinase constitutes a major target of TORC1 complex (Urban et al., 2007), another interplay between glucose-induced carbon catabolite repression and the TOR signaling pathway is highlighted.

2.3 Glucose sensing by casein kinases

The last pathway (Fig. 1 in red tones) starts with the perception of glucose at the plasma membrane by Snf3 and Rgt2. In the presence of glucose, Snf3 and Rgt2 stimulate the phosphorylation of Mth1 and Std1 by the casein kinases Yck1 and Yck2. Phosphorylated Mth1 and Std1 are then subjected to SCF/Grr1-mediated ubiquitination followed by proteasome degradation (Santangelo, 2006). In glucose depleted conditions, Rtg1 recruits the Ssn6/Tup1 complex in the nucleus to form a repressor complex with Std1 in an Mth1-dependent manner (Fig. 1). Glucose perception appears to disrupt this complex due to the proteasomal degradation of Mth1 and Std1. The dissociation of the repressor complex prevents Rtg1 to act on DNA binding sites and results in de-repression of downstream *HXT* target genes for example (Roy, Jouandot, Cho, & Kim, 2014). Interestingly, interplays between this pathway and the two others discussed previously were found. First, *MTH1* gene expression is repressed by the Snf1-Mig1 pathway while degradation of Mth1 protein is regulated by phosphorylation through casein kinases. Second, Rtg1 is phosphorylated by PKA under glucose repression which inhibits its repressor activity (Roy et al., 2014; Roy, Shin, Cho, & Kim, 2013).

These three pathways as well as the TOR signaling pathway are involved in the regulation of major cellular events such as the diauxic shift and the G1/G0 phase transition in yeast (Galdieri, Mehrotra, Yu, & Vancura, 2010). Even though the glucose-mediated catabolite repression was extensively researched, it is still unclear whether similar hierarchies exist for other carbon sources and how these different sources are sensed. It has only been recently demonstrated in *S. cerevisiae* that acetate represses the utilization of ethanol (Simpson-Lavy & Kupiec, 2019). After having provided a detailed view of those signaling pathways in the model yeast, knowledge will be transferred to the lignocellulolytic fungi.

3. Lessons from the "soft-rot" fungi

In filamentous fungi, carbon catabolite repression pathway was mainly studied in lignocellulolytic Ascomycota fungi as *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei* and *Aspergillus nidulans* (Adnan et al., 2018). Those fungi, often referred as soft-rot fungi, are used to produce second-generation biofuels from non-food plant materials, i.e., lignocellulosic biomass. During the industrial process, the combined action of secreted CAZymes such as cellulases and xylanases leads to the hydrolysis of polysaccharides. However, consumption of the produced sugars by the fungus is a major drawback. Those key points lead the research in this field.

3.1 Cellulose as substrate, from glucose starvation to glucose as a main source of carbon for rotting fungi

Cellulose constitutes the most abundant polysaccharide in wood (40% to 50% of dry weight). It is a linear polymer of D-glucose units linked by β 1-4 glycosidic bonds and so its degradation could represent a significant glucose source for fungi. However, cellulose constitutes an insoluble compound and needs to be degraded to be transported into the cell. To counteract that problem, fungi have evolved a two-stage process including a basal level of cellulase gene expression followed by a strong induction of cellulases in response to soluble inducers (Suto & Tomita, 2001). The molecular events described in the following paragraphs are depicted in Fig. 2.

The development of a basal cellulase production is aimed at releasing the cellulose inducers to adequately modulate the set of genes responsible for cellulose degradation. Once a basal level of cellulase gene expression has occurred, soluble inducers as cellodextrins are released and lead to a strong induction of cellulases. Cellodextrins (such as cellobiose, cellotriose and cellotetraose) constitute glucose polymers and were proved to be key actors in the activation of that second step in *T. reesei*, *N. crassa*, and *Aspergillus* species (Chikamatsu, Shirai, Kato, Kobayashi, & Tsukagoshi, 1999; Kubicek, Messner, Gruber, Mach, & Kubicek-Pranz, 1993; Mandels & Reese, 1960; Vaheri, Vaheri, & Kauppinen, 1979; Znameroski et al., 2012). Indeed, cellobiose compounds were shown to be transported directly into the cell through specific transporters in *N. crassa* and *T. reesei* leading to cellulase gene expression (Xiong et al., 2014). In *N. crassa*, cellobiose specific transporters were characterized through heterologous expression in *S. cerevisiae* and were named CDT-1 and CDT-2 (Galazka et al., 2010). They act as

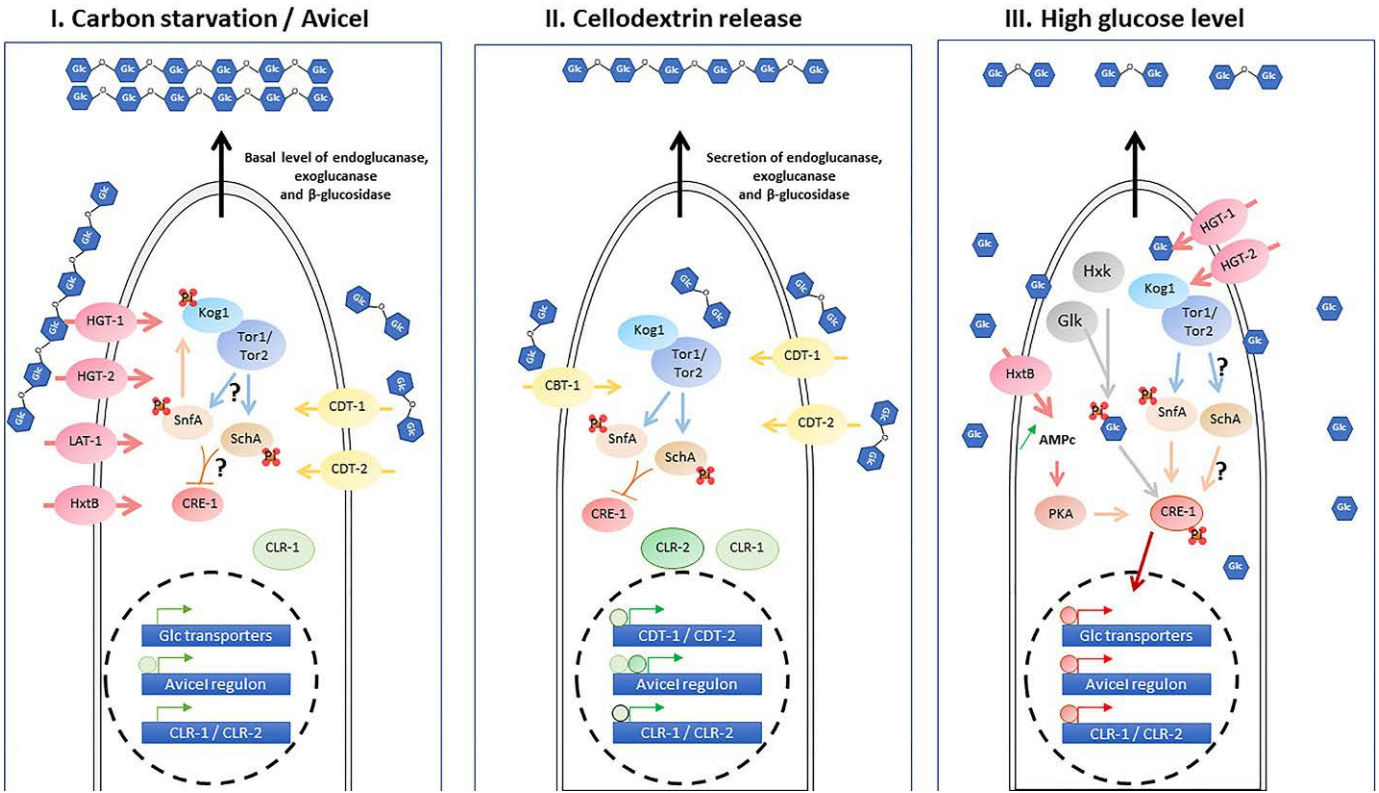


Fig. 2 Involvement of TOR during the cellulose degradation in soft-rot fungi. The three panels represent the hyphae tip of filamentous soft-rot fungi and depict a temporal view of the cellulose decaying process. In the first panel, cellulose is intact and glucose concentration is low outside the cell, mimicking a carbon starvation. Those hyphae produce enzymes decaying cellulose and release cellodextrin compounds. In the middle panel, cellodextrins induce a cellular response leading to cellulose decay. In the last panel, cellulose decay leads to an increase of glucose concentration which is perceived in the cell and triggers the carbon catabolite repression process. It is interesting to note that the TOR signaling pathway is conserved in those fungi. The interactions between TOR signaling pathway and the cellulose decaying process are represented by a limited view of TORC1 signaling through two components as the Tor kinase and Kog1.

transceptors involved in the perception of cellodextrins and the downstream transcriptional regulation of *cbh-1* and *gh5-1* (Znameroski et al., 2014). CDT-1/CDT-2 homologs were reported as well in *A. nidulans* and are known as CltB/CltA respectively. Mutants deleted for *cltB* or *cltA/cltB* display a decrease in cellulase activity indicating a key role of cellobiose transporters in that process (dos Reis et al., 2016).

In soft-rot filamentous fungi, transcription factors involved in lignocellulose degradation have been well described (Huberman, Liu, Qin, & Glass, 2016). In *N. crassa*, cellulolytic genes were reported to be induced through two transcription factors named CLR-1 and CLR-2 (cellulose degradation regulator 1 et 2). In response to crystalline cellulose (Avicel), CLR-1 induces a 212 gene set named the Avicel regulon including cellodextrin transporters, cellulases, hemicellulases, β-glucosidases, and the clr-2 gene (Coradetti et al., 2012). In *N. crassa*, CLR-1 was shown to bind to the regulatory regions of 27 genes involved in cellulose utilization as cellodextrin transporters, cellulases and β-glucosidases while CLR-2 binds to 23 genes involved in this pathway. While CLR-2 is regulated by CLR-1, 19 out of 27 genes regulated by CLR-1 were described as being regulated by CLR-2 as well (Craig, Coradetti, Starr, & Glass, 2015). Those results suggest that CLR-2 makes a positive feedback loop through CLR-1 to accelerate cellulose degradation in response to inducer molecules (Samal et al., 2017). CDT-1 and CDT-2, as well as CLR-1/CLR-2 homologs are found in the fungal kingdom although it was shown to be functionally different in *A. nidulans* (Coradetti et al., 2012).

In presence of lignocellulose, the glucose concentration is low and is perceived as a carbon starvation environment (Fig. 2, left panel). In *N. crassa*, no carbon condition was shown to induce genes coding high affinity glucose transporters as *hgt-1/-2* and *lat-1* (Wang et al., 2017). In accordance with that, in *A. nidulans*, a glucose transporter named Hxtb is present at the plasma membrane under low and high glucose concentrations and is involved in glucose signaling (dos Reis et al., 2017). In the model yeast *S. cerevisiae*, high affinity hexose transporters are expressed under de-repressed conditions (Ozcan & Johnston, 1995), suggesting that this could also happen in soft-rot fungi. In support of that proposal, hexokinase homologs to Hxk2 have been identified in soft-rot fungi. In *A. nidulans* and *T. reesei*, glucokinase and hexokinase were shown to be essential in glucose phosphorylation to mediate carbon catabolite repression. Indeed, in *A. nidulans*, a double *ΔglkA ΔhxkA* mutant has revealed a loss of glucose phosphorylation with absence of growth in response to glucose (Flipphi et al., 2003), and the use of 6-deoxyglucose, a compound which cannot be phosphorylated, led

to a carbon catabolite de-repression (for review Brown, de Gouvea, Krohn, Savoldi, & Goldman, 2013). In *T. reesei*, de-repression was also observed in double *Δglk1 Δhxk1* mutant (Kubicek, Mikus, Schuster, Schmoll, & Seiboth, 2009).

In *N. crassa*, transcriptomic analyses were performed comparing fungi grown on crystalline cellulose and fungi grown without carbon sources. Similar expression profiles were observed during the first hour followed by a significant induction of cellulase gene expression as 1000-fold more in response to crystalline cellulose compared to carbon starvation (Coradetti et al., 2012). This illustrates the fact that in response to cellulose we observe a transcriptional program due to de-repression combined with a cellodextrin-induced response. The resulting transcriptional response is even more complicated when the carbon source is more complex such as lignocellulosic material (Samal et al., 2017).

Furthermore, if a transcriptional response occurs in response to crystalline cellulose, a post-transcriptional response was also demonstrated by a phosphoproteomic study in *N. crassa* (Xiong et al., 2014). This indicates that signal transduction cascades drive the adaptation to carbon sources in this case. Interestingly, when comparing the fungal responses to crystalline cellulose (Avicel) and lack of carbon source, change in phosphorylation status of Kog1 was identified at Ser16 (Xiong et al., 2014). Kog1 is a conserved subunit of TORC1 (Fig. 1). In *S. cerevisiae*, phosphorylation of Kog1 was observed in response to glucose starvation (Fig. 2) (Hughes Hallett, Luo, & Capaldi, 2015). This phosphorylation is due to AMPK Snf1 kinase activity and occurs on Ser491 and 494. Those serine residues are found in a prion-like domain of Kog1 which is not conserved in *N. crassa*. More generally, the presence of a prion-like structure domain in Kog1 seems to be correlated with the lack of TSC1/2 complex (Hughes Hallett et al., 2015). These feedback loops should be further investigated in filamentous fungi (Fig. 1, purple tones).

After occurring of the processes explained above, cellulose is at least partially degraded and glucose concentration increase in the medium. Another step of regulation can occur.

3.2 Carbon catabolite repression in filamentous "soft-rot" fungi

At some points, degradation of cellulose leads to an increase in glucose concentration in extracellular medium (Fig. 2, right panel). As shown in *S. cerevisiae*, carbon catabolite repression induced by glucose occurs.

In filamentous fungi, the functional homologs of *S. cerevisiae* Mig1 are named CreA/Cre1 for Catabolite repressor A or 1 (depending of species). CreA was firstly identified in *A. nidulans* through a genetic screen designed to identify regulators of carbon catabolite repression (Arst & Cove, 1973). In accordance with that, CreA is described as a transcriptional repressor of genes involved in carbon catabolite repression. However, this repressor is not only regulated by glucose but also by other sugars resulting from carbon nutrient sources (Brown et al., 2013; Sun & Glass, 2011). The role of CreA nuclear localization in regulation of carbon catabolite repression was confirmed in *A. nidulans* and *N. crassa* by use of GFP fusions (Brown et al., 2013; Sun & Glass, 2011). As it was shown for Mig1 in *S. cerevisiae*, nuclear localization of CreA/Cre1 is carbon-nutrient dependent. Surprisingly, in *T. reesei*, Cre1 phosphorylation positively regulates DNA binding (Cziferszky, Mach, & Kubicek, 2002).

Homologs of the *S. cerevisiae* Tup1 and Ssn6 co-repressors (Fig. 1) were also identified in filamentous fungi (García, Mathieu, Nikolaev, Felenbok, & Scazzocchio, 2008). In *A. nidulans*, the homologs of Tup1 and Ssn6 are RcoA and SsnF respectively. It was shown that RcoA acts as a co-repressor and is involved in the remodeling of the chromatin structure while ssnF is an essential gene for which deletion is lethal and so cannot be further studied (García et al., 2008). In addition, a role of Cre1 in nucleosome positioning has been shown in *T. reesei*. In this fungus, Cre1 is essential for correct nucleosome positioning in the cellulase promoter cbh2 under repressing and inducing conditions (Zeilinger, Schmoll, Pail, Mach, & Kubicek, 2003).

In addition to CreA/Cre1, the Sucrose non-fermenting kinase (SnfA/Snf1) and PKA have been identified in those fungi. In *A. nidulans*, SnfA plays also regulatory roles during carbon catabolite repression and modulates the expression of genes coding lignocellulolytic enzymes through CreA localization (Brown et al., 2013). It has been shown as well that the phosphorylation of CreA is managed by PKA and SnfA (Ribeiro et al., 2019; Ries, Beattie, Espeso, Cramer, & Goldman, 2016). In *A. nidulans*, the low affinity glucose transporter HxtB was shown to be involved in glucose sensing and to modulate PKA activity. Indeed, in presence of glucose, *ΔhxtB* mutant displayed a decrease in cAMP accumulation leading to lower PKA activity in response to glucose cue (dos Reis et al., 2017).

Besides the cAMP/PKA pathway, the TOR pathway was suggested to regulate the expression of cell wall degrading enzymes in response to

lignocellulosic material in *A. nidulans* (Brown et al., 2013) and in *N. crassa* (Xiong et al., 2014). In *A. nidulans*, one TOR kinase was identified and named TorA. As an exception, there is only one gene coding for TOR in that fungus compared to other fungi (Fitzgibbon, Morozov, Jones, & Caddick, 2005). The *A. nidulans* homolog of the known TOR target Sch9 (Urban et al., 2007) was identified and named SchA (Brown et al., 2013). Using deletion mutants, it was proved that SchA and SnfA have synergistic roles in the regulation of CreA de-repression. Interestingly, both SchA and SnfA are involved in induction of endoglucanases EglA and EglB which contribute to the extracellular endocellulase activity (Brown et al., 2013).

In *A. nidulans*, CreA is at the center of all attention. Recently, another level in the regulation of carbon catabolite repression was identified involving ubiquitination process. Indeed, the F-box protein Fbx23, being a part of SCF complex, was highlighted to interact with CreA/SsnF/RcoA complex through the GskA protein kinase (de Assis et al., 2018). Previously, CreA was shown to be regulated by the CreB–CreC deubiquitination complex which prevents ubiquitination of CreA and so proteasome degradation (Lockington & Kelly, 2002). To better understand the interplay between the two components of that regulation system, additional studies will be required.

4. A role for TOR in basidiomycete "white-rot" fungi

White-rot fungi term refers to fungi which are able to decay all the polymers from wood including lignin. Most of them belong to the Basidiomycetes and more precisely Agaricomycetes class. The first enzyme involved in lignin degradation has been characterized in the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* (Tien & Kirk, 1983). Since, a large set of enzymes was described to be involved in lignin degradation and is classified as AA for enzymes with Auxiliary Activities in the CAZYmes database (Levasseur et al., 2013; Lombard et al., 2014). AA enzymes are not restricted to white-rot fungi and can be found in brown-rot fungi (which modify lignin to have access to polysaccharides) or even soft-rot fungi. Evolution of lignin decomposition system will be discussed (Floudas, 2021) and lignin degradation by soft-rot Ascomycetes will be described (Ferrari, Gautier, & Silar, 2021). Here we will focus on current knowledge in white-rot fungi of the signaling pathways described in previous paragraphs (Fig. 3).

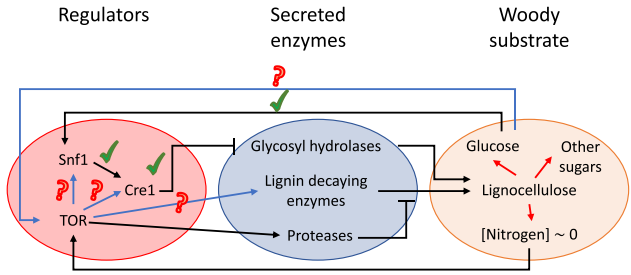


Fig. 3 TOR and Carbon Catabolite Repression regulators are involved in wood degradation in white-rot fungi. Wood decay by white-rot fungi release glucose, other sugars and various molecules from lignin degradation (not represented on the schema). In addition, woody materials are considered as low nitrogen source. TOR signaling pathway, represented by the Tor kinase on the schema, and carbon catabolite repression regulators, Snf1 and CreA, are retrieved in white-rot fungi. In response to glucose, regulation of CreA by Snf1 occurs and a role for CreA in the regulation of genes coding for secreted glycosyl hydrolases has been demonstrated to date. TOR is known to integrate nitrogen signaling and in the context of wood degradation, glucose could be also perceived as a signal molecule. Moreover, a role for TOR on secreted protease was demonstrated in another Basidiomycete. Interplays between those signaling pathways and their potential activities remain to be decipher. Check marks represent conserved interactions/interplays while question marks represent putative ones.

4.1 A carbon catabolite repression program in white-rot basidiomycete fungi?

White-rot basidiomycete fungi attracted particular interest due to their ability to degrade all woody components. They produce and secrete a set of enzymes involved in the degradation of all components of wood. The enzymes and chemical mixes secreted by the fungus are called secretomes and are studied through proteomic and metabolomic tools. Earlier studies of those secreted enzymes by rot fungi were done by comparing culture conditions with lignocellulose materials compared to glucose. It was shown that the secretome complexity increases when fungi are cultivated on complex carbon sources compared to glucose (Wymelenberg et al., 2010, 2011).

A first evidence of a carbon catabolite repression program affecting secretome composition has been found in the white-rot fungus *Dichomitus squalens* (Daly et al., 2019). To investigate secretome composition, two complex sources of carbon as Avicel and Xylan were used in the culture medium with or without glucose. The results showed that the presence of glucose in the medium led to a drastic repression of "almost half" (108/233) of the CAZyme coding genes (Daly et al., 2019). In the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, a recent study highlighted a new level of regulation in secretome composition (Alfaro, Majcherczyk, Kües, Ramírez, & Pisabarro, 2020).

Comparison of secretome complexity was performed using woody material (*Populus alba* sawdust) or glucose as carbon sources. It resulted in higher diversity of secreted proteins in response to woody material and highlighted a correlation between secretome complexity and secretion of CAZymes from various families. Interestingly, glucose added to the woody material showed a decrease in secretome complexity. Indeed, secreted enzymes involved in cellulose and hemicellulose degradation are less various and lead to the conclusion that the presence of glucose in the medium could repress the expression of enzymes involved in wood degradation (Alfaro et al., 2020). Interestingly, enzymes involved in lignin degradation were not affected by the glucose-induced carbon catabolite repression in both studies (Alfaro et al., 2020; Daly et al., 2019).

In rotting fungi from the Basidiomycota phylum, the data on signaling pathway are scarce. In *Ganoderma lucidum*, homologs of the Snf1 kinase and CreA transcription factor were identified (Fig. 3). In this fungus, Snf1 phosphorylation status appears to respond to carbon sources and regulates CreA at the transcriptional level and cellular re-localization. Together, Snf1 and CreA were shown to regulate expression of cellulase coding genes (Hu et al., 2019, 2020). Indeed, in strains impaired for both Snf1 and CreA, the cellulase activity was reported to be lower than in WT (Hu et al., 2020). Interestingly, this result suggests that regulatory pathways independent of Snf1-CreA exist in *G. lucidum* to modulate cellulase activity as well. In addition, a TOR signaling pathway was described in this fungus where a function in the cell wall integrity maintenance was shown to involve a Slt2-MAPK pathway (Chen et al., 2019). In the white-rot fungus *P. chrysosporium*, the TOR pathway is also conserved and inhibition of TOR activity using rapamycin has been shown to affect secretome composition (Nguyen et al., 2020). Secretome analyses were performed with or without sugar and revealed changes in protein composition. Interestingly, rapamycin treatment with or without sugar in the medium, induced secretome differences in both conditions.

Altogether, those results indicate the involvement of a carbon catabolite repression pathway in white-rot fungi as well. Some of the elements involved in those signaling cascades were identified while others remain to be investigated (Fig. 3).

4.2 Involvement of nitrogen perception in wood decay?

Considering wood composition, nitrogen sources are scarce. Decaying wood was during a long time considered as a nitrogen deprived condition

for fungal growth (Levi & Cowling, 1969). In the white-rot fungus *P. chrysosporium*, proteases were found induced and secreted under cellulolytic condition (Wymelenberg et al., 2009). In addition, proteases were found in various secretome studies and different fungi (Staszczak, Nowak, Grzywnowicz, & Leonowicz, 1996). It was suggested that those enzymes are involved in decomposition of surrounding organic matter and in the recycling of the enzymes secreted to degrade the wood. Interestingly, they are not repressed by glucose induced catabolite repression (Alfaro et al., 2020; Daly et al., 2019) and can be considered as markers of nitrogen deprivation. In the only analysis of secretome under TOR inhibition, proteases were found regulated during the inhibition of TOR by rapamycin (Nguyen et al., 2020). In addition, there is one evidence in the literature that in the fungus *Candida albicans*, the TOR signaling pathway controls the secreted protease Sap2 (Chen et al., 2012). This control occurs at the transcriptional level and affects also Sap2 protein levels.

In *S. cerevisiae*, interplays between nitrogen deprivation and TOR signaling pathway were described (Loewith & Hall, 2011). Indeed, TORC1 perceives amino acid availability throughout the EGO complex (Exit from rapamycin-induced GrOwth arrest) located on the vacuolar/lysosomal membrane (Binda et al., 2009; González et al., 2020). In presence of nitrogen, TORC1 is activated and phosphorylates Tap42 which binds to the phosphatase Sit4. In parallel, Ure2 retains the transcription factor/activator Gln3 in the cytoplasm under a phosphorylated form. In absence of nitrogen, TORC1 is inactivated leading to the dissociation of Sit4 from Tap42. Sit4 is then activated and dephosphorylates Gln3 which dissociates from Ure2. That dissociation leads to the translocation of Gln3 to the nucleus and activates the transcription of genes involved in efficient nitrogen use, for review (Crespo & Hall, 2002). The phosphorylation status of Gln3 is also under control of Snf1 kinase activity (Bertram et al., 2002). To date, only one Ure2 homolog was studied in *P. chrysosporium* among all components described previously in white-rot fungi (Bchini, Girardet, Sormani, Gelhaye, & Morel-Rouhier, 2021; Roret et al., 2015; Thuillier et al., 2013) although no evidence for a role in nitrogen signaling has been reported.

In *P. chrysosporium*, nitrogen limitation is involved in production of oxidative enzymes which contribute to lignin degradation (Faison & Kirk, 1985). Indeed, transcriptional activation of lignin peroxidase coding genes occurs in response to nitrogen deprivation (Li, Alic, & Gold, 1994; Stewart & Cullen, 1999). Now that the listing of enzymes involved in lignin degradation is far more detailed, nitrogen is one of the first parameter

tested to optimize enzyme production in the fungal cultures (Martani, Beltrametti, Porro, Branduardi, & Lotti, 2017). Once again, work has to be done to decipher signaling pathways activated in response to low nitrogen (Fig. 3).

5. Conclusion

In forest, wood decaying fungi have an important ecological role in scavenging all the dead material falling to the ground. Wood is a very specific ecological niche to grow: rich in sugar polymers, poor in nitrogen and a highly toxic environment due to the presence of extractives and lignin degradation products. Thanks to the work done in *S. cerevisiae* and other Ascomycetes, we have some knowledge on how the response to that specific environment occurs at the molecular level. In comparison, what we know for Basidiomycetes and specifically for white-rot fungi is limited but ongoing. A better understanding on how those fungi cope with this environment and what they perceive will allow us to better manage forest soil and can lead also to better choices in biotechnological applications.

References

Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., et al. (2018). Carbon catabolite repression in filamentous Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 48. https://doi.org/10.3390/ijms19010048.

Alfaro, M., Majcherczyk, A., Kües, U., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G. (2020). Glucose counteracts wood-dependent induction of lignocellulolytic enzyme secretion in monokaryon and dikaryon submerged cultures of the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Scientific Reports*, *10*(1), 12421. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68969-1.

Arst, H. N., & Cove, D. J. (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*, *126*(2), 111–141. https://doi.org/10.1007/BF00330988.

Bchini, R., Girardet, J.-M., Sormani, R., Gelhaye, E., & Morel-Rouhier, M. (2021). Oxidized glutathione promotes association between eukaryotic translation elongation factor 1Bγ and Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *The FEBS Journal*, *288*(9), 2956–2969. https://doi.org/10.1111/febs.15614.

Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Chan, T.-F., Ai, W., & Zheng, X. F. S. (2002). Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(4), 1246–1252. https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1246-1252.2002.

Binda, M., Péli-Gulli, M.-P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T. W., et al. (2009). The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Molecular Cell*, *35*(5), 563–573. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.033.

Brown, N. A., de Gouvea, P. F., Krohn, N. G., Savoldi, M., & Goldman, G. H. (2013). Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 91. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-91.

Chen, Y.-T., Lin, C.-Y., Tsai, P.-W., Yang, C.-Y., Hsieh, W.-P., & Lan, C.-Y. (2012). Rhb1 regulates the expression of secreted aspartic protease 2 through the TOR signaling pathway in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, *11*(2), 168–182. https://doi.org/10.1128/EC.05200-11.

Chen, D.-D., Shi, L., Yue, S.-N., Zhang, T.-J., Wang, S.-L., Liu, Y.-N., et al. (2019). The Slt2-MAPK pathway is involved in the mechanism by which target of rapamycin regulates cell wall components in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genetics and Biology*, *123*, 70–77. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.12.005.

Chikamatsu, G., Shirai, K., Kato, M., Kobayashi, T., & Tsukagoshi, N. (1999). Structure and expression properties of the endo-β-1,4-glucanase a gene from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, *175*(2), 239–245. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13626.x.

Coradetti, S. T., Craig, J. P., Xiong, Y., Shock, T., Tian, C., & Glass, N. L. (2012). Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(19), 7397–7402. https://doi.org/10.1073/pnas.1200785109.

Craig, J. P., Coradetti, S. T., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2015). Direct target network of the *Neurospora crassa* plant cell wall deconstruction regulators CLR-1, CLR-2, and XLR-1. *MBio*, *6*(5), e01452-15. https://doi.org/10.1128/mBio.01452-15.

Crespo, J. L., & Hall, M. N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(4), 579–591. https://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.579-591.2002.

Cziferszky, A., Mach, R. L., & Kubicek, C. P. (2002). Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Journal of Biological Chemistry*, *277*(17), 14688–14694. https://doi.org/10.1074/jbc.M200744200.

Daly, P., Peng, M., Falco, M. D., Lipzen, A., Wang, M., Ng, V., et al. (2019). Glucose-mediated repression of plant biomass utilization in the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(23), e01828-19. https://doi.org/10.1128/AEM.01828-19.

de Assis, L. J., Ulas, M., Ries, L. N. A., Ramli, N. A. M. E., Sarikaya-Bayram, O., Braus, G. H., et al. (2018). Regulation of *Aspergillus nidulans* CreA-mediated catabolite repression by the F-Box proteins Fbx23 and Fbx47. *MBio*, *9*(3), 00840-18. https://doi.org/10.1128/mBio.00840-18.

Diderich, J. A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttik, M. A. H., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., et al. (1999). Glucose uptake kinetics and transcription of HXTGenes in Chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(22), 15350–15359. https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15350.

dos Reis, T. F., de Lima, P. B. A., Parachin, N. S., Mingossi, F. B., de Castro Oliveira, J. V., Ries, L. N. A., et al. (2016). Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(1), 204. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0611-1.

dos Reis, T. F., Nitsche, B. M., de Lima, P. B. A., de Assis, L. J., Mellado, L., Harris, S. D., et al. (2017). The low affinity glucose transporter HxtB is also involved in glucose signalling and metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports*, 7(1), 45073. https://doi.org/10.1038/srep45073.

Eltschinger, S., & Loewith, R. (2016). TOR complexes and the maintenance of cellular homeostasis. *Trends in Cell Biology*, *26*(2), 148–159. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.003.

Faison, B. D., & Kirk, T. K. (1985). Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, *49*(2), 299–304.

Ferrari, R., Gautier, V., & Silar, P. (2021). Lignin degradation by ascomycetes. *Advances in Botanical Research*, *99*, 77–113. (Chapter 3).

Fitzgibbon, G. J., Morozov, I. Y., Jones, M. G., & Caddick, M. X. (2005). Genetic analysis of the TOR pathway in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, *4*(9), 1595–1598. https://doi.org/10.1128/EC.4.9.1595-1598.2005.

Flipphi, M., van de Vondervoort, P. J. I., Ruijter, G. J. G., Visser, J., Arst, H. N., & Felenbok, B. (2003). Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(14), 11849–11857. https://doi.org/10.1074/jbc.M209443200.

Floudas, D. (2021). Evolution of lignin decomposition systems in fungi. *Advances in Botanical Research*, *99*, 37–76. (Chapter 2).

Galazka, J. M., Tian, C., Beeson, W. T., Martinez, B., Glass, N. L., & Cate, J. H. D. (2010). Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, *330*(6000), 84–86. https://doi.org/10.1126/science.1192838.

Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., & Vancura, A. (2010). Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, *14*(6), 629–638. https://doi.org/10.1089/omi.2010.0069.

Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(2), 334–361. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.334-361.1998.

García, I., Mathieu, M., Nikolaev, I., Felenbok, B., & Scazzocchio, C. (2008). Roles of the *Aspergillus nidulans* homologues of Tup1 and Ssn6 in chromatin structure and cell viability. *FEMS Microbiology Letters*, *289*(2), 146–154. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01379.x.

González, A., Hall, M. N., Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2020). AMPK and TOR: The yin and yang of cellular nutrient sensing and growth control. *Cell Metabolism*, *31*(3), 472–492. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.015.

Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, *13*, 2408–2420.

Heitman, J., Movva, N. R., & Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, *253*(5022), 905–909. https://doi.org/10.1126/science.1715094.

Hirata, Y., Andoh, T., Asahara, T., & Kikuchi, A. (2002). Yeast glycogen synthase kinase-3 activates Msn2p-dependent transcription of stress responsive genes. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1), 302–312. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-05-0247.

Hu, S., Huang, J., Pei, S., Ouyang, Y., Ding, Y., Jiang, L., et al. (2019). Ganoderma lucidum polysaccharide inhibits UVB-induced melanogenesis by antagonizing cAMP/PKA and ROS/MAPK signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 7330–7340. https://doi.org/10.1002/jcp.27492.

Hu, Y., Xu, W., Hu, S., Lian, L., Zhu, J., Shi, L., et al. (2020). In Ganoderma lucidum, Glsnf1 regulates cellulose degradation by inhibiting GlCreA during the utilization of cellulose. *Environmental Microbiology*, *22*(1), 107–121. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14826.

Huberman, L. B., Liu, J., Qin, L., & Glass, N. L. (2016). Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi. *Fungal Biology Reviews*, *30*(3), 101–111. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.001.

Hughes Hallett, J. E., Luo, X., & Capaldi, A. P. (2015). Snf1/AMPK promotes the formation of Kog1/raptor-bodies to increase the activation threshold of TORC1 in budding yeast. *eLife*, *4*, e09181. https://doi.org/10.7554/eLife.09181.

Kim, M., Kim, M., Lee, S., Kuninaka, S., Saya, H., Lee, H., et al. (2013). CAMP/PKA signalling reinforces the LATS–YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *The EMBO Journal*, *32*(11), 1543–1555. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.102.

Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W. R. H., Donaton, M. C. V., Dijck, P. V., et al. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular Microbiology*, *32*(5), 1002–1012. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01413.x.

Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R. L., & Kubicek-Pranz, E. M. (1993). The Trichoderma cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, *15*(2), 90–99. https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90030-6.

Kubicek, C. P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., & Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*, *2*(1), 19. https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-19.

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 41. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41.

Levi, M. P., & Cowling, E. B. (1969). Role of nitrogen in wood deterioration. VII. Physiological adaptation of wood destroying and other fungi to substrates deficient in nitrogen. *Phytopathology*, *59*, 460–468.

Li, D., Alic, M., & Gold, M. H. (1994). Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(9), 3447–3449.

Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(4), 183–203. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y.

Lockington, R. A., & Kelly, J. M. (2002). The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, *43*(5), 1173–1182. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02811.x.

Loewith, R. (2010). 9—TORC1 signaling in budding yeast. In *Vol. 27. The enzymes* (pp. 147–175). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S1874-6047(10)27009-9.

Loewith, R., & Hall, M. N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, *189*(4), 1177–1201. https://doi.org/10.1534/genetics.111.133363.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, *42*(Database issue), D490–D495. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178.

Mandels, M., & Reese, E. T. (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, *79*(6), 816–826.

Martani, F., Beltrametti, F., Porro, D., Branduardi, P., & Lotti, M. (2017). The importance of fermentative conditions for the biotechnological production of lignin modifying enzymes from white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, *364*, fnx134. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx134.

Nguyen, D. V., Roret, T., Fernandez-Gonzalez, A., Kohler, A., Morel-Rouhier, M., Gelhaye, E., et al. (2020). Target of rapamycin pathway in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *PLoS One*, *15*(2), e0224776. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224776.

Orlova, M., Kanter, E., Krakovich, D., & Kuchin, S. (2006). Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, *5*(11), 1831–1837. https://doi.org/10.1128/EC.00110-06.

Ozcan, S., & Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(3), 1564–1572.

Paiva, S., Vieira, N., Nondier, I., Haguenauer-Tsapis, R., Casal, M., & Urban-Grimal, D. (2009). Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: Role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(29), 19228–19236. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008318.

Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T., & Tzamarias, D. (2004). The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO Reports*, *5*(4), 368–372. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400120.

Pedruzzi, I., Bürckert, N., Egger, P., & De Virgilio, C. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *The EMBO Journal*, *19*(11), 2569–2579. https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2569.

Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., et al. (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Molecular Cell*, *12*(6), 1607–1613. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00485-4.

Ribeiro, L. F. C., Chelius, C., Boppidi, K. R., Naik, N. S., Hossain, S., Ramsey, J. J. J., et al. (2019). Comprehensive analysis of *Aspergillus nidulans* PKA phosphorylome identifies a novel mode of CreA regulation. *MBio*, *10*(2), 02825-18. https://doi.org/10.1128/mBio.02825-18.

Ries, L. N. A., Beattie, S. R., Espeso, E. A., Cramer, R. A., & Goldman, G. H. (2016). Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *203*(1), 335–352. https://doi.org/10.1534/genetics.116.187872.

Roelants, F. M., Leskoske, K. L., Martinez Marshall, M. N., Locke, M. N., & Thorner, J. (2017). The TORC2-dependent signaling network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomolecules*, *7*(3), 66. https://doi.org/10.3390/biom7030066.

Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., et al. (2005). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 862–880. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04429.x.

Roret, T., Thuillier, A., Favier, F., Gelhaye, E., Didierjean, C., & Morel-Rouhier, M. (2015). Evolutionary divergence of Ure2pA glutathione transferases in wood degrading fungi. *Fungal Genetics and Biology*, *83*, 103–112. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.09.002.

Roy, A., Jouandot, D., Cho, K. H., & Kim, J.-H. (2014). Understanding the mechanism of glucose-induced relief of Rgt1-mediated repression in yeast. *FEBS Open Bio*, *4*, 105–111. https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.12.004.

Roy, A., Shin, Y. J., Cho, K. H., & Kim, J.-H. (2013). Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of Rgt1. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(9), 1493–1503. https://doi.org/10.1091/mbc.e13-01-0047.

Samal, A., Craig, J. P., Coradetti, S. T., Benz, J. P., Eddy, J. A., Price, N. D., et al. (2017). Network reconstruction and systems analysis of plant cell wall deconstruction by Neurospora crassa. *Biotechnology for Biofuels*, *10*, 225. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0901-2.

Santangelo, G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(1), 253–282. https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.253-282.2006.

Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A. J., & Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(4), 1321–1328. https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1321-1328.2000.

Sanz, P., Viana, R., & Garcia-Gimeno, M. A. (2016). AMPK in yeast: The SNF1 (sucrose non-fermenting 1) protein kinase complex. In M. D. Cordero, & B. Viollet (Eds.), *AMP-activated protein kinase* (pp. 353–374). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3_14.

Shertz, C. A., Bastidas, R. J., Li, W., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2010). Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. *BMC Genomics*, *11*(1), 510. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-510.

Simpson-Lavy, K., & Kupiec, M. (2019). Carbon catabolite repression in yeast is not limited to glucose. *Scientific Reports*, *9*(1), 6491. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43032-w.

Staszczak, M., Nowak, G., Grzywnowicz, K., & Leonowicz, A. (1996). Proteolytic activities in cultures of selected white-rot fungi. *Journal of Basic Microbiology*, *36*(3), 193–203. https://doi.org/10.1002/jobm.3620360306.

Stewart, P., & Cullen, D. (1999). Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, *181*(11), 3427–3432. https://doi.org/10.1128/JB.181.11.3427-3432.1999.

Sun, J., & Glass, N. L. (2011). Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*. *PLoS One*, *6*(9), e25654. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025654.

Suto, M., & Tomita, F. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *92*(4), 305–311. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80231-0.

Thuillier, A., Roret, T., Favier, F., Gelhaye, E., Jacquot, J.-P., Didierjean, C., et al. (2013). Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, *587*(14), 2125–2130. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.031.

Tien, M., & Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science (New York, N.Y.)*, *221*(4611), 661–663. https://doi.org/10.1126/science.221.4611.661.

Treitel, M. A., & Carlson, M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(8), 3132–3136. https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3132.

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., et al. (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, *26*(5), 663–674. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.020.

Vaheri, M. P., Vaheri, M. E. O., & Kauppinen, V. S. (1979). Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *8*(1), 73–80. https://doi.org/10.1007/BF00510268.

Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., & Moreno, F. (2016). Hexokinase 2 is an intracellular glucose sensor of yeast cells that maintains the structure and activity of Mig1 protein repressor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(14), 7267–7285. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711408.

Wang, B., Li, J., Gao, J., Cai, P., Han, X., & Tian, C. (2017). Identification and characterization of the glucose dual-affinity transport system in *Neurospora crassa*: Pleiotropic roles in nutrient transport, signaling, and carbon catabolite repression. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(17), 0705-4. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0705-4.

Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., & Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *464*(3), 123–128. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01698-1.

Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, *124*(3), 471–484. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016.

Wymelenberg, A. V., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martinez, D., et al. (2009). Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(12), 4058–4068. https://doi.org/10.1128/AEM.00314-09.

Wymelenberg, A. V., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., et al. (2010). Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(11), 3599–3610. https://doi.org/10.1128/AEM.00058-10.

Wymelenberg, A. V., Gaskell, J., Mozuch, M., Splinter BonDurant, S., Sabat, G., Ralph, J., et al. (2011). Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(13), 4499–4507. https://doi.org/10.1128/AEM.00508-11.

Xiong, Y., Coradetti, S. T., Li, X., Gritsenko, M. A., Clauss, T., Petyuk, V., et al. (2014). The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation. *Fungal Genetics and Biology*, *72*, 21–33. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.05.005.

Xue, Y., Batlle, M., & Hirsch, J. P. (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Gα subunit and functions in a Ras-independent pathway. *The EMBO Journal*, *17*(7), 1996–2007. https://doi.org/10.1093/emboj/17.7.1996.

Zeilinger, S., Schmoll, M., Pail, M., Mach, R. L., & Kubicek, C. P. (2003). Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter cbh2 associated with cellulase induction. *Molecular Genetics and Genomics*, *270*(1), 46–55. https://doi.org/10.1007/s00438-003-0895-2.

Zhang, N., & Cao, L. (2017). Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity. *Current Genetics*, *63*(5), 839–843. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0697-4.

Znameroski, E. A., Coradetti, S. T., Roche, C. M., Tsai, J. C., Iavarone, A. T., Cate, J. H. D., et al. (2012). Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(16), 6012–6017. https://doi.org/10.1073/pnas.1118440109.

Znameroski, E. A., Li, X., Tsai, J. C., Galazka, J. M., Glass, N. L., & Cate, J. H. D. (2014). Evidence for transceptor function of cellodextrin transporters in *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(5), 2610–2619. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533273.

Chapitre III : Mécanismes de dégradation de la lignine et détoxication des extractibles du bois par les champignons

1. Structure et composition de la lignine

Après la cellulose et les hémicelluloses, la lignine constitue le troisième composé majeur des parois des cellules végétales (Sjöström, 1993). La lignine forme des liaisons avec les polymères de cellulose et d'hémicellulose ce qui confère une résistance mécanique au bois et protège les polysaccharides de la dégradation par des agents biologiques (Sánchez, 2009). Il s'agit d'un hétéropolymère aromatique et constitue ainsi la partie non saccharidique du bois. Néanmoins, plusieurs composés aromatiques sont retrouvés également sur les chaînes latérales des polymères d'hémicellulose et de pectine au sein du bois (Ishii, 1997).

La majorité des composés aromatiques du bois est issue de la voie de biosynthèse du shikimate. Cette dernière se compose de 7 réactions enzymatiques et résulte en la formation de chorismate qui est un précurseur commun pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) (Fig. 18) (Tohge *et al.*, 2013; Tohge et Fernie, 2017).

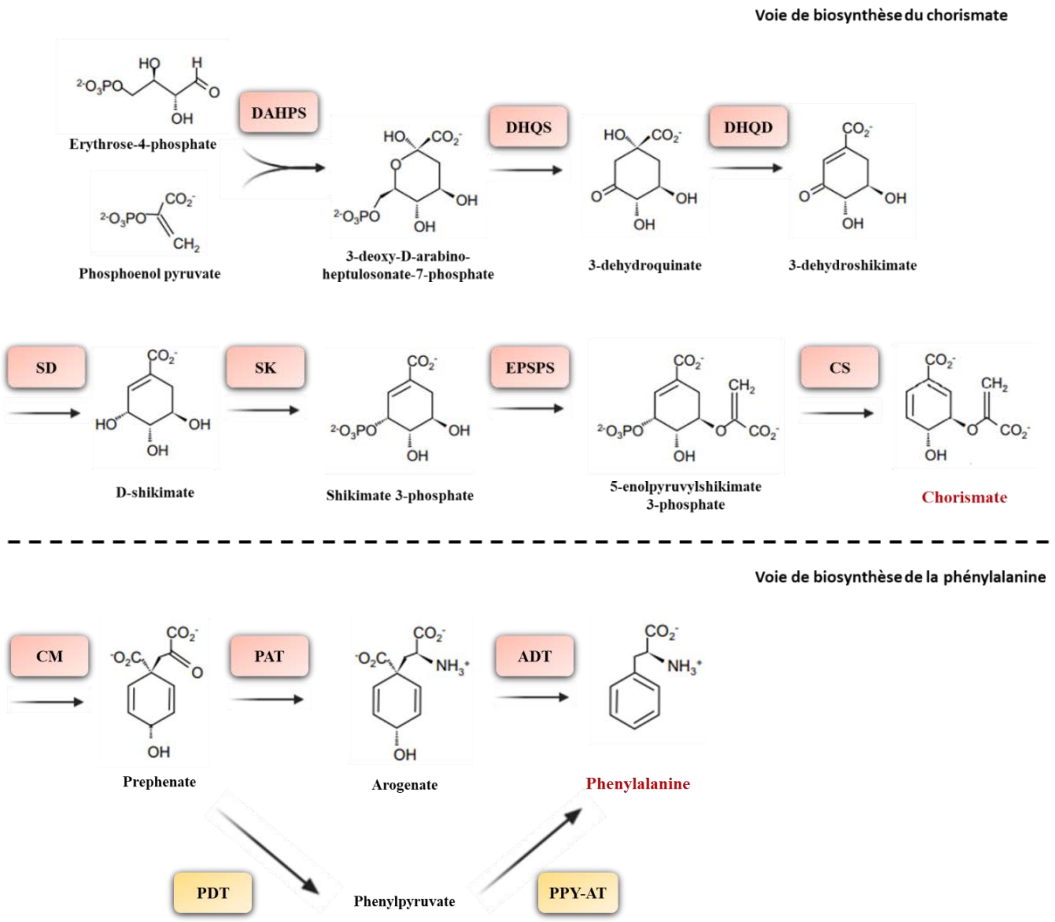
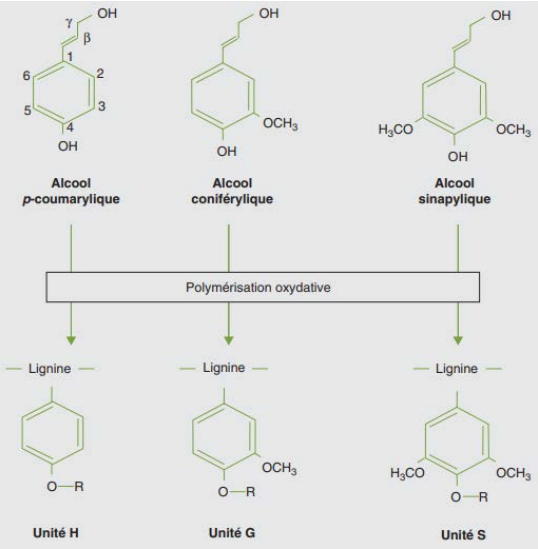


Figure 18. Voies de biosynthèse du shikimate et de la phénylalanine. Les noms complets des abréviations sont les suivants : DAHPS (Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase), DHQS (3-déshydroquinate synthase), DHQD (3-déshydroquinate déshydratase), SD (Shikimate déshydrogénase), SK (Shikimate kinase), EPSPS (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), CS (Chorismate synthase), CM (Chorismate mutase), PAT (Prephenate aminotransferase), ADT (Arogenate dehydratase), PDT (Prephenate dehydratase) et PPY-AT (Phenylpyruvate aminotransferase) (adapté de Tohge et Fernie, 2017).

Parmi ces acides aminés aromatiques, la phénylalanine constitue le précurseur commun de la voie des phénylpropanoïdes (composés issus de la phénylalanine) dont sont issus les composés initiateurs de la lignine appelés monolignols (Tohge *et al.*, 2013; Tohge et Fernie, 2017). L'assemblage de la lignine a lieu par le couplage radicalaire de trois monolignols, dénommés alcool paracoumarylique, alcool conifé rylique et alcool sinapylique, qui sont à l'origine des unités constitutives de la lignine. Ces dernières sont appelées unité H (hydroxyphényle), G (guaïacyle) et S (syringyle) (Fig. 19) (Higuchi, 2006).



R = H ou chaîne alkyle en C3.

Figure 19. Structure des monolignols (précurseurs des lignines) et des unités constitutives de la lignine après polymérisation (Jouanin et Lapierre, 2006).

Le couplage radicalaire des monolignols est aléatoire ce qui résulte en un polymère complexe et amorphe présentant différents types de liaisons (liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène). La lignine comprend majoritairement des liaisons β-O-4 (45 à 50% chez les conifères et 60 à 62% chez les feuillus) mais également divers types de liaisons tels que des liaisons α-O-4, 5-5, β–β, 4-O-5, β-5, et β-1 qui donnent lieu à différentes structures (Fig. 20 et 21 ; Tableau 4).

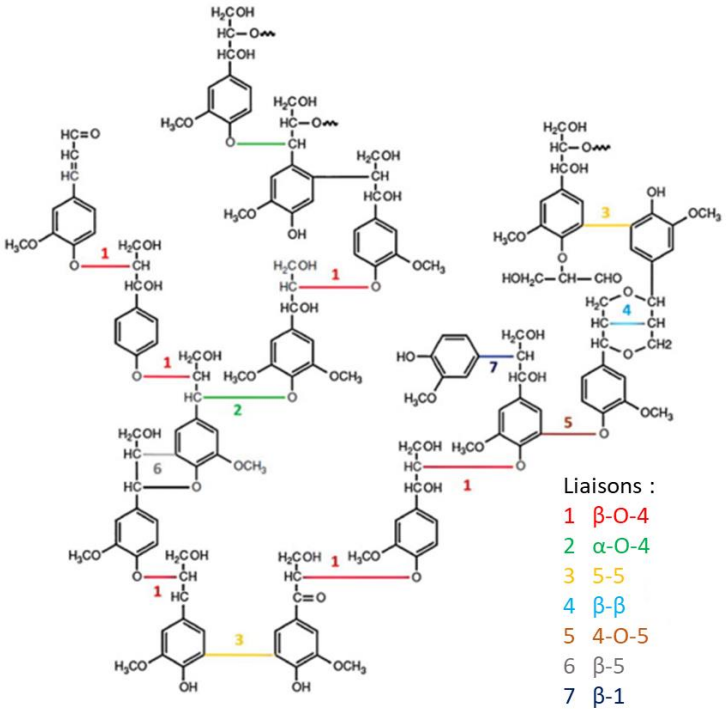


Figure 20. Représentation des liaisons impliquées dans les polymères de lignine (Guadix-Montero et Sankar, 2018).

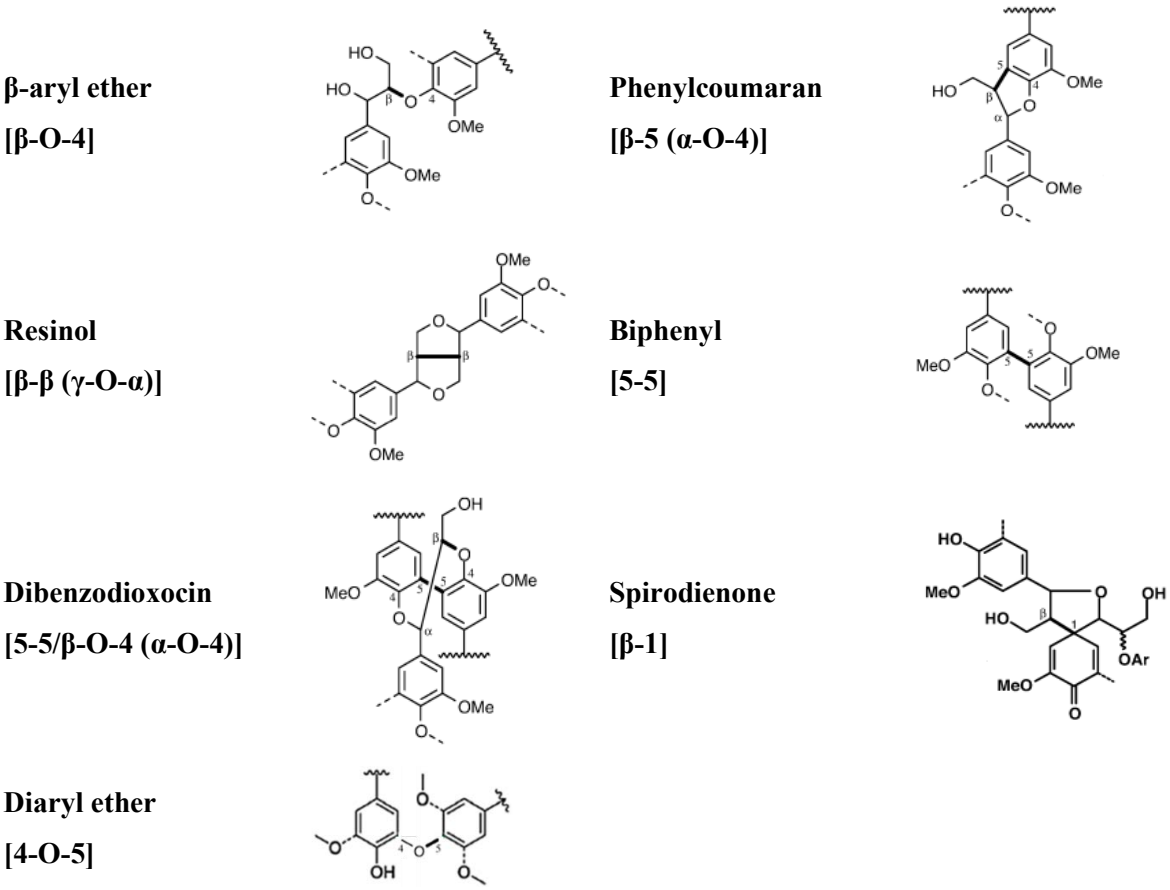


Figure 21. Représentation des structures majeures retrouvées dans les polymères de lignine. Les liaisons impliquées dans le couplage radicalaire des monolignols sont représentées en gras et indiquée en dessous du nom de la structure (adapté de Guadix-Montero et Sankar 2018; Ralph *et al.* 2004).

Tableau 4. Occurrence des différentes structures et liaisons au sein des polymères de lignine dans les bois de feuillus et conifères (Guadix-Montero et Sankar, 2018).

	β-aryl ether [β-O-4]	Phenylcoumaran [β-5 (α-O-4)]	Resinol [β- β (γ-O-α)]	Biphenyl [5-5]	Dibenzodioxocin [5-5/β-O-4 (α-O-4)]	Spirodienone [β-1]	Diaryl ether [4-O-5]
Conifère (%)	45-50	9-12	2-6	-	5-7	1-9	2
Feuillus (%)	60-62	3-11	3-16	-	< 1	1-7	2

A la différence des polysaccharides du bois, ces liaisons ne sont pas hydrolysables et contribuent ainsi à la rigidité et à la résistance des polymères de lignine face aux micro-organismes dégradeurs de bois. Bien que les précurseurs de la lignine soient des composés phénoliques, ce polymère aromatique est principalement non phénolique dû à l'éthérification fréquente des fonctions hydroxyles des groupements phénols (Ralph *et al.*, 2004). La dégradation de la lignine nécessite ainsi l'action d'enzymes oxydatives et de radicaux capables d'agir de manière non spécifique et d'oxyder les structures phénoliques et non phénoliques de la lignine (Hatakka et Hammel, 2011).

De par sa complexité et sa liaison aux polysaccharides du bois, la composition chimique exacte de la lignine reste difficile à établir (Amthor, 2003). Néanmoins, des différences en terme d'abondance et de composition en lignine ont été identifiées entre les feuillus et les conifères (Sjöström, 1993). En effet, un contenu plus important en lignine a été décrit chez les conifères en comparaison aux feuillus (26 à 32 % du poids sec du bois chez les conifères contre 20 à 25 % chez les feuillus). De plus, les unités phénylpropanoïdes de type guaiacyle sont prédominantes chez les conifères contre une prédominance des unités de type guaiacyle et syringyle chez les feuillus. En revanche, les unités de type p-hydroxyphényle sont décrites comme minoritaire au sein des deux sous-embranchements (Sjöström, 1993).

2. Dégradation des polymères de lignine

Pour dégrader les héteropolymères de lignine présents dans la biomasse lignocellulosique, les champignons dégradeurs de bois requièrent des systèmes de dégradation extracellulaires oxydatifs et non spécifiques. Ce sont des études menées sur le champignon de pourriture blanche *P. chrysosporium* qui ont permis de comprendre les mécanismes impliqués dans la dégradation de la lignine. En effet, les premières enzymes ligninolytiques ont été identifiées chez ce champignon (ex : lignine peroxydase et manganèse peroxydases) (Glenn *et al.*, 1983; Glenn et Gold, 1985; Tien et Kirk, 1983). Les enzymes ligninolytiques sont généralement classées en 3 catégories : les peroxydases de type II, les phénol oxydases (laccases) et les dye-decolorizing peroxydases (étudiées principalement chez les bactéries). La capacité de dégradation des polymères de lignine a été principalement corrélée à la sécrétion de peroxydases de type II (Hatakka, 1994; Morgenstern *et al.*, 2008). Les peroxydases de type II ont été identifiées chez les champignons de pourriture blanche et incluent 3 types de peroxydases : les lignine peroxydases, les manganèse peroxydases et les versatile peroxydases. Une analyse comparative des génomes de champignons de pourriture a permis de mettre en évidence la perte de ces enzymes chez les champignons de pourriture brune (Tableau 1) (Floudas *et al.*, 2012). Chez les Ascomycètes (champignon de pourriture molle), des analyses phylogénétiques ont permis d'identifier trois classes de peroxydase de type II chez des Pézizomycètes nécrotrophes ou hémibiotrophes (Mathé *et al.*, 2019). Des divergences entre les peroxydases de type II d'Ascomycètes et de Basidiomycètes (ex : résidus impliqués dans le transfert d'électrons et position des cystéines conservées) ont été reportées et suggèrent des fonctions différentes entre ces deux embranchements. Néanmoins, ces enzymes sont potentiellement impliquées dans la dépolymérisation de la lignine pour permettre l'infection des cellules hôtes par des champignons pathogènes (Mathé *et al.*, 2019).

2.1 Les peroxydases de type II

2.1.1 Les lignine peroxydases

Les lignine peroxydases (AA2) sont des glycoprotéines à hème avec une masse moléculaire comprise entre 38 et 46 kDa (Pollegioni *et al.*, 2015). Ce sont les premières enzymes qui ont été identifiées avec un rôle dans la dépolymérisation oxydative de la lignine. La première LiP a été identifiée dans le sécrétome de *P. chrysosporium* en réponse à un milieu carencé en azote (Glenn *et al.*, 1983; Tien et Kirk, 1983). Depuis, de nombreux isoformes de lignine peroxydases ont été identifiées chez ce champignon (10 isoformes) et les champignons de pourriture blanche (Kersten et Cullen, 2007). Le cycle catalytique des LiPs est typique de celui des peroxydases à hème et peut être décomposé en deux étapes (Wong, 2009) (Fig. 22) :

- La première étape implique une oxydation à deux électrons de l'enzyme ferrique (Fe^{3+}) par réaction avec du peroxyde d'hydrogène. Cette étape génère un composé intermédiaire appelé LiP-I .
- La deuxième étape consiste en deux phases successives de réduction à un électron. La première réaction permet la réduction du composé I avec un substrat réducteur (ex : alcool vératrylique), ce qui génère un composé II et un cation radical. La seconde réaction permet la réduction du composé II avec un substrat réducteur (ex : alcool vératrylique) générant un second cation radical et le retour de l'enzyme sous sa forme native à l'état d'oxydation ferrique. Les cations radicaux générés lors du processus catalytique des LiPs permettent ainsi la formation de radicaux au sein des polymères de lignine conduisant à sa dépolymérisation et modification.

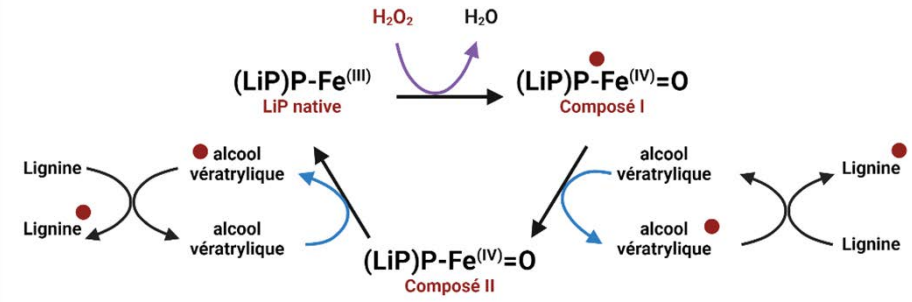


Figure 22. Cycle catalytique des lignine peroxydases. Les LiPs contiennent une protoporphyrine (P) de Fe^{3+}. Une première étape d'oxydation de l'enzyme ferrique a lieu avec du peroxyde d'hydrogène suivie de deux étapes de réduction conduisant à un retour de l'enzyme sous sa forme native et la génération de cations radicaux. Les ronds rouges correspondent à des réactions d'oxydation des composés.

Lors de la dégradation des polymères de lignine, l'alcool vératrylique (Fig. 23) joue un rôle important dans le processus catalytique des LiPs chez les champignons de pourriture blanche. En effet, c'est un médiateur redox des LiPs et la présence d'alcool vératrylique a été corrélée avec une augmentation de l'activité des LiPs chez *P. chrysosporium* (Christian *et al.*, 2005; Goodwin *et al.*, 1995; Harvey *et al.*,

1986). L'oxydation de l'alcool vératrylique par les LiPs permet ainsi la génération de cation radicaux qui sont impliqués dans l'oxydation des polymères de lignine et conduisent à leur fragmentation (Teeri et Henriksson, 2009).

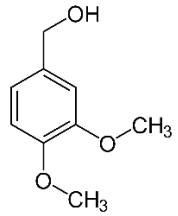


Figure 23. Structure de l'alcool vératrylique.

Durant la dégradation des polymères de lignine, les LiPs sont capables d'oxyder une variété de composés incluant des composés phénoliques (guaïacol, alcool vanillique, catéchol, acide syringique, acétosyringone, etc.) et non phénoliques (ex : alcool vératrylique, composés modèles de lignine β-O-4 et diarylpropane) (Harvey et Palmer, 1990; Kirk *et al.*, 1986; Leisola *et al.*, 1985; Umezawa et Higuchi, 1989). L'oxydation des composés phénoliques conduit à la formation de radicaux phénoxy. En présence d'oxygène, ces radicaux peuvent donner des produits de clivage des noyaux aromatiques. L'oxydation des composés non phénoliques conduit à la formation de radicaux aryl cations. Ces radicaux peuvent subir diverses réactions telles que des clivages de chaîne latérale, déméthylation, addition intramoléculaire et des réarrangements (Fig. 24 et 25) (Mäkelä *et al.*, 2015).

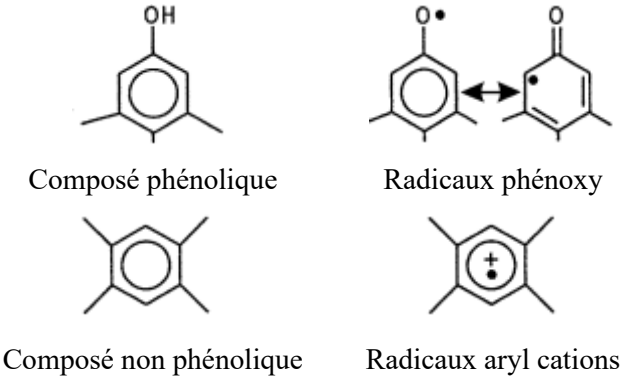


Figure 24. Représentation des structures de composés aromatiques phénoliques et non phénoliques et des radicaux correspondants après des réactions d'oxydation. L'oxydation des composés phénoliques et non phénoliques conduit à la formation de radicaux cations et de radicaux aryl cations respectivement (Hofrichter, 2002).

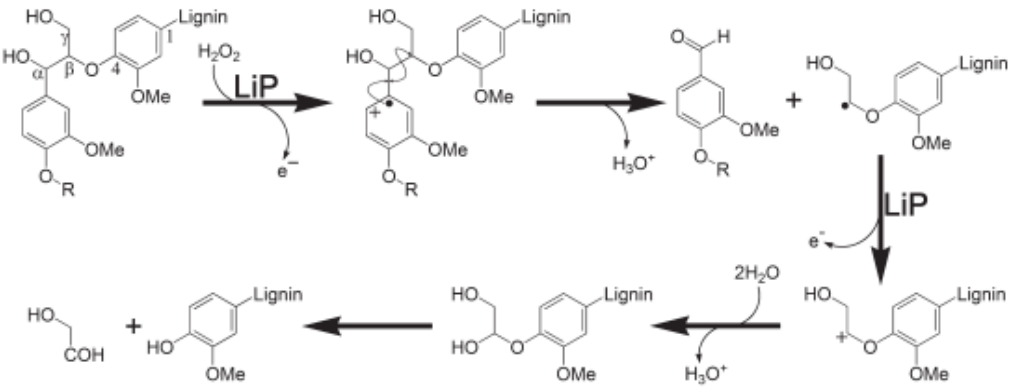


Figure 25. Clivage de la liaison β-O-4 par les LiPs à partir d'un composé modèle de lignine non phénolique β aryl éther (Pollegioni *et al.*, 2015).

L'alcool vératrylique joue un rôle particulièrement important dans ces processus par sa capacité à protéger les LiPs de l'inactivation (formation du composé LiP-III). Il est capable de convertir directement le composé LiP-III et de restaurer l'enzyme sous sa forme native (Wariishi et Gold, 1989). En effet, l'oxydation des composés phénoliques par les LiPs a été associée à une accumulation de composé LiP-III et ainsi à une diminution de leur activité enzymatique (Harvey et Palmer, 1990). A la différence de l'alcool vératrylique, les radicaux phénoxy issus de l'oxydation des composés phénoliques sont incapables de convertir le composé LiP-III et ainsi de restaurer la forme native de l'enzyme (Chung et Aust, 1995).

2.1.2 Les manganèse peroxydases

Les manganèse peroxydases (AA2) sont des glycoprotéines à hème avec une masse moléculaire comprise entre 40 et 50 kDa. La première MnP a été purifiée à partir du milieu extracellulaire de *P. chrysosporium* (Glenn et Gold, 1985). Il a été démontré que l'expression des MnPs est régulée par la présence de Mn^{2+} dans le milieu de culture. Le cycle catalytique des MnPs est semblable à celui des peroxydases à hème avec la particularité d'utiliser les ions Mn^{2+} comme substrat réducteur. Le cycle catalytique des manganèse peroxydases se déroule de la manière suivante (Fig. 26) (Wong, 2009) :

- L'enzyme ferrique est oxydée par du peroxyde d'hydrogène ce qui génère un composé intermédiaire contenant un atome de fer sous forme Fe^{4+} nommé MnP-I.
- La réduction du composé MnP-I en composé MnP-II a lieu grâce à la présence de donneurs d'électrons qui peuvent être des ions Mn^{2+} ou des composés phénoliques, générant des ions Mn^{3+} ou des radicaux phénoxy respectivement. En revanche, la réduction du composé MnP-II se fait obligatoirement par des ions Mn^{2+} ce qui permet un retour de l'enzyme ferrique sous sa forme native et la génération d'ions Mn^{3+} (Wariishi *et al.*, 1988). Les ions Mn^{3+} et les radicaux phenoxy seront alors impliqués dans l'oxydation des polymères de lignine conduisant à leur fragmentation et modification.

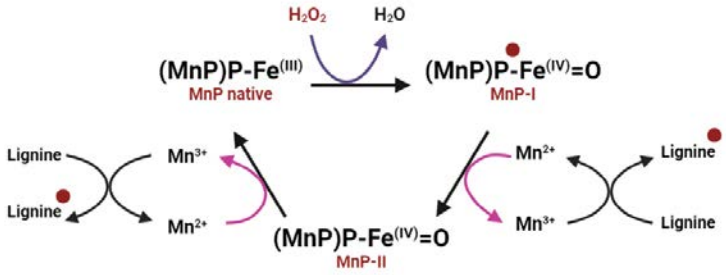


Figure 26. Cycle catalytique des manganèse peroxydases. Les MnPs contiennent une protoporphyrine (P) de Fe^{3+}. Une première étape d'oxydation de l'enzyme ferrique a lieu avec du peroxyde d'hydrogène suivie de deux étapes de réduction conduisant à un retour de l'enzyme sous sa forme native et la génération d'ions Mn^{3+} ou de radicaux phénoxy. Les ronds rouges correspondent à des réactions d'oxydation des composés.

Lors de la dégradation du bois, les champignons sécrètent des acides dicarboxyliques (ex : oxalate, malonate). Ces derniers permettent notamment de chélater et stabiliser les ions Mn^{3+} générés lors du cycle catalytique des MnPs (Wariishi *et al.*, 1992). Les complexes chélateur – Mn^{3+} agissent ainsi comme des oxydants diffusibles et sont capables d'oxyder divers substrats phénoliques, des acides carboxyliques et des lipides insaturés ce qui génère des radicaux organiques (Hofrichter, 2002). Les radicaux phénoxy issus de l'oxydation des composés phénoliques peuvent alors subir diverses réactions résultant en la formation de produits de clivage des noyaux aromatiques et ainsi la production de CO_2 et d'acides organiques (ex : formate) (Fig. 27).

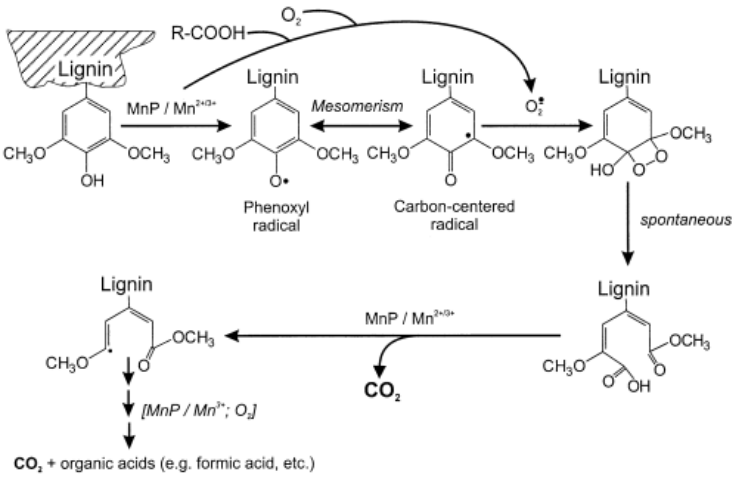


Figure 27. Mécanisme d'action des MnPs sur des composés phénoliques présents dans les polymères de lignine conduisant à la formation de CO_2. Les MnPs oxydent un groupement phénolique qui est converti en radical phénoxy. Ce dernier est présent sous différentes formes mésomèriques (radicaux centrés sur le carbone). Des acides organiques (ex : oxalate) sont oxydés en présence d'O_2 conduisant à la formation de radicaux qui peuvent libérer des ions superoxyde. Ces derniers réagissent avec des radicaux centrés sur le carbone conduisant à la formation d'un éther peroxyde instable qui subit de manière spontanée un clivage du noyau aromatique. Cela conduit à la formation d'une structure aliphatique contenant un groupe carboxylique. Ces derniers sont sujets à une nouvelle action des MnPs conduisant à la formation de CO_2 et d'acides organiques (Hofrichter, 2002).

Les MnPs sont également capables d'oxyder les structures non phénoliques de la lignine par des réactions de peroxydation lipidique. En effet, l'oxydation de lipides insaturés génère des radicaux peroxyl qui sont impliqués dans la dégradation des liaisons Cα – Cβ et β-aryl ether présentes dans les structures non phénoliques de la lignine (Bao *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1996; Kapich *et al.*, 1999).

2.1.3 Les versatile peroxydases

Les versatile peroxydases (AA2) sont des protéines hybrides présentant des similarités avec les LiPs et les MnPs. La première versatile peroxydase (PS1) a été décrite chez le champignon de pourriture blanche *Pleurotus eryngii* (Camarero *et al.*, 1999). Le modèle structural de cette enzyme a permis d'identifier une forte similarité structurale de PS1 avec les LiPs et un site de liaison aux ions Mn^{2+}. Cette étude a ainsi permis de montrer le double mécanisme de ces enzymes basé sur l'oxydation des ions Mn^{2+} en Mn^{3+} (caractéristique des manganèse peroxydases) et leur capacité à oxyder des composés aromatiques non phénoliques par un transfert d'électron intramoléculaire à longue distance (LRET) (caractéristique des lignine peroxydases) (Camarero *et al.*, 1999). Le cycle catalytique des versatile peroxydases constitue ainsi une combinaison des cycles catalytiques des LiPs et des MnPs. En effet, les donneurs d'électrons impliqués dans leur cycle catalytique peuvent être des ions Mn^{2+} et des composés aromatiques phénoliques ou non phénoliques (Fig. 28) (Camarero *et al.*, 1999). Ces peroxydases sont ainsi capables d'oxyder les structures phénoliques et non phénoliques des polymères de lignine résultant en leur dépolymérisation et modification.

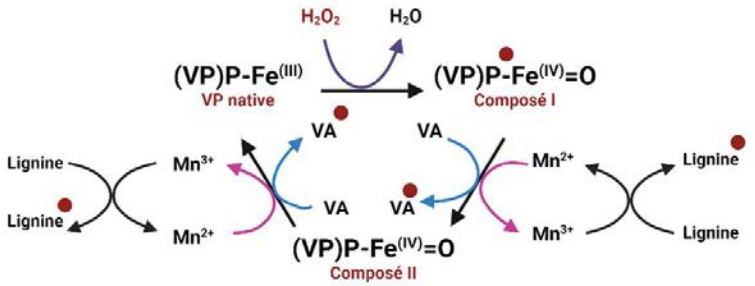


Figure 28. Cycle catalytique des versatile peroxydases. Les VPs contiennent une protoporphyrine (P) de Fe^{3+}. Une première étape d'oxydation de l'enzyme ferrique a lieu avec du peroxyde d'hydrogène suivie de deux étapes de réduction conduisant à un retour de l'enzyme sous sa forme native et la génération de radicaux. Les ronds rouges correspondent à des réactions d'oxydation des composés.

2.2 Les laccases

Les laccases (AA1_1) appartiennent à la famille des multi-copper oxydases. Elles sont impliquées dans différents processus tels que la sporulation, la production de pigments, la formation de l'appareil reproducteur et les interactions plantes - pathogènes (Alcalde, 2007). A la différence des peroxydases, les laccases catalysent des réactions d'oxydation à 1 électron en utilisant l'O_2 comme accepteur d'électron. Elles sont capables d'oxyder une variété de substrats aromatiques et phénoliques (ex : ortho

et para-diphénol, methoxy-substituted phenols, polyphénols) générant ainsi des radicaux phenoxy (Fig. 29) (Thurston, 1994). Ces radicaux entraînent le clivage de liaisons C-C, β-aryl éther et le clivage de noyaux aromatiques présents dans les structures des polymères de lignine. Les laccases sont également capables d'oxyder des composés non phénoliques avec la nécessité de médiateur redox. Cela a d'abord été démontré via l'utilisation de composés synthétiques tels que l'ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) et le HBT (1-hydroxybenzotriazole) (Bourbonnais et Paice, 1990; Hirai *et al.*, 2006). Des composés issus de la dégradation de la lignocellulose ont également été identifiés avec des propriétés de médiateur redox pour les laccases (Camarero *et al.*, 2005). C'est le cas par exemple de l'acétosyringone et du syringaldéhyde qui permettent la décoloration de colorants industriels, la transformation de fongicide et la dégradation d'hydrocarbures par le système laccase – médiateur (Campos *et al.*, 2001; Johannes et Majcherczyk, 2000; Kh *et al.*, 2002).

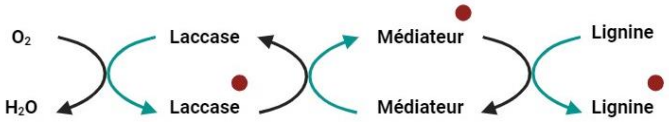


Figure 29. Cycle catalytique des laccases. Les laccases sont capables d'oxyder des composés phénoliques et non phénoliques avec la présence de médiateurs redox générant des radicaux. Les ronds rouges correspondent à des réactions d'oxydation des composés.

2.3 Enzymes impliquées dans la production extracellulaire de peroxyde d'hydrogène

La dégradation de la biomasse lignocellulosique et plus particulièrement de la lignine requièrent également la sécrétion d'oxydases impliquées dans la génération extracellulaire de H_2O_2. En effet, le peroxyde d'hydrogène initie le cycle catalytique des peroxydases à hème (champignons de pourriture blanche) et la réaction de Fenton (champignon de pourriture brune). Ces oxydases sont représentées par deux super-familles : les oxydoréductases glucose-choline-methanol (AA3) et les copper radical oxydases (AA5).

La superfamille des oxydoréductases glucose-choline-methanol comprend 4 grandes familles : les aryl alcohol oxydases (AAO), les méthanol oxydases (MOX), les pyranose oxydases (P2O) et les glucose oxydases (GOX). Parmi ces oxydoréductases, les AAO et P2O jouent un rôle important dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique chez les champignons de pourriture blanche (ex : *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus* species, *P. chrysosporium*) (Gutiérrez *et al.*, 1994; Romero *et al.*, 2009; Volc *et al.*, 1996). En revanche, elles ne semblent pas impliquées dans les mécanismes de dégradation utilisés par les champignons de pourriture brune (Martinez *et al.*, 2009).

La superfamille des copper radical oxydases est représentée principalement par les glyoxal oxydases. Elles oxydent des aldehydes simples (ex : glyoxal et methylglyoxal) en leur acides carboxyliques correspondants avec la réduction de O_2 en H_2O_2 (Whittaker *et al.*, 1996). Ces oxydoréductases ont un rôle important dans la formation de H_2O_2 chez les champignons de pourriture blanche (activité des

peroxydases) et brune (réaction de Fenton). Chez *P. chrysosporium*, une corrélation entre la production d'aldéhydes simples (glyoxal et méthylglyoxal) et l'activité ligninase a été démontrée (Kersten et Kirk, 1987). Chez *P. placenta*, deux gènes codant des copper radical oxydases (Ppl56703 and Ppl130305) sont potentiellement associés à la réaction de Fenton en présence de cellulose crystalline et d'extraits de peuplier (Martinez *et al.*, 2009). Bien que le rôle de ces enzymes ait été étudié dans les processus de dégradation de la lignine, une étude récente a mis en évidence le rôle d'une alcohol oxydase et de son partenaire redox dans la pathogénicité du champignon *Colletotrichum orbiculare* durant la pénétration de son hôte (Bissaro *et al.*, 2022).

3. Les extractibles : source de composés antifongiques

En complément des polymères de lignine, de nombreux composés aromatiques sont retrouvés au sein du bois. Ces composés sont nommés extractibles et peuvent être extraits par l'action de différents solvants comme leur nom l'indique. Ils sont produits en tant que métabolites spécialisés et ont un rôle dans la protection du bois face à des agressions biotiques (ex : attaques par des pathogènes) et abiotiques (ex : rayonnement UV) (Nascimento *et al.*, 2013). Les extractibles sont également impliqués dans diverses propriétés du bois telles que la couleur, l'odeur et les propriétés acoustiques. Ils constituent généralement 2 à 8 % de la biomasse du bois et davantage dans le cas d'espèces tropicales. Cependant, la composition des bois en extractibles peut varier en fonction du tissu, l'origine géographique, la saison de récolte et est spécifique à chaque espèce (Kebbi-Benkeder *et al.*, 2015). Par ailleurs, les concentrations en CO_2 et la température influent sur la quantité totale en extractibles d'un bois (Kilpeläinen *et al.*, 2005). Les principaux composants des extractibles de bois peuvent être répartis en trois grandes familles telles que les composés phénoliques, les terpènes et les composés aliphatiques (Jansson et Nilvebrant, 2009).

3.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés aromatiques caractérisés par la présence de groupements phénols et sont issus de la voie des phénylpropanoïdes (Tohge et Fernie, 2017). Au sein de cette famille, plusieurs classes d'extractibles ont été définies incluant des composés phénoliques non polymérisés (ex : flavonoïdes, stilbènes) et des composés phénoliques polymérisés (ex : lignanes, tannins) (Fig. 30).

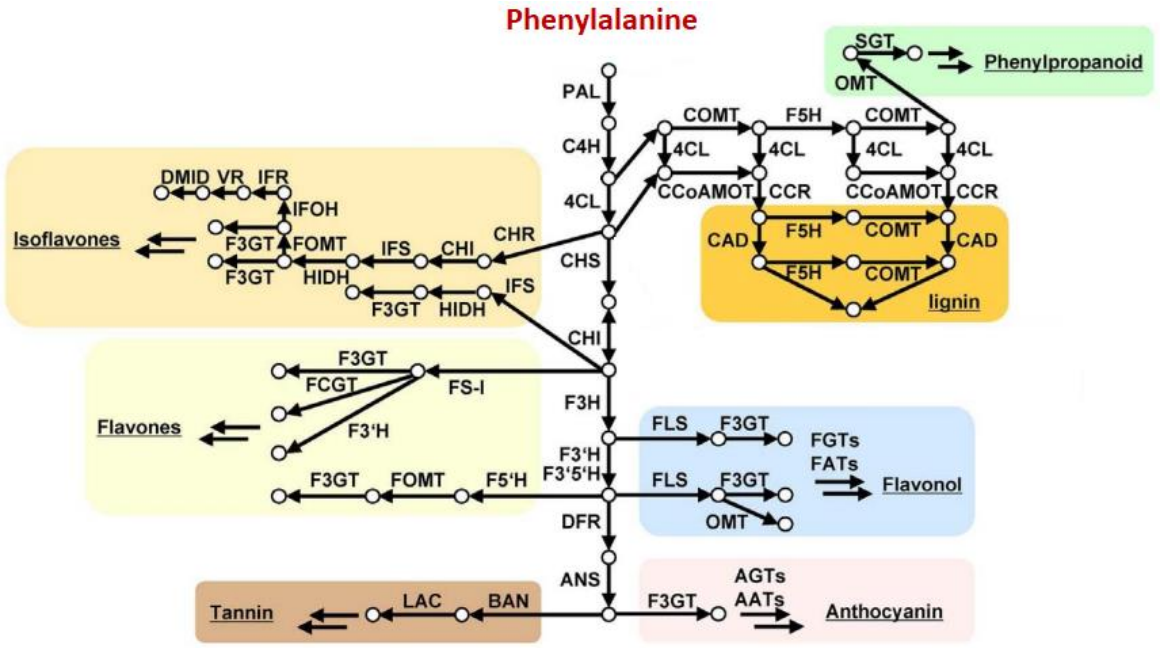


Figure 30. Voie de biosynthèse des composés phénoliques dérivés de la phénylalanine chez les végétaux. Ces composés phénoliques incluent différentes familles d'extractibles tels que les flavonoïdes (isoflavones, flavones, flavonols et anthocyanines), les tannins, les unités phénylpropanoïdes donnant lieu aux lignanes ainsi que les unités constitutives de la lignine. Les noms complets des abréviations sont les suivants : PAL (phenylalanine ammonia-lyase); C4H (cinnamate-4-hydroxylase); 4CL (4-coumarate CoA ligase); CAD (cinnamoyl-alcohol dehydrogenase); F5H (ferulate 5-hydroxylase); CCR (cinnamoyl-CoA reductase); CCoAOMT (caffeoyl/CoA-3-O-metheltransferase); CHS (chalcone synthese); CHI (chalcone isomerase); F3H (flavanone 3-hydroxylase); F3′H (flavonoid-3′-hydroxylase); F3GT (flavonoid-3-O-glycosyltransferase); FOMT (flavonoid O-methyltransferase); FCGT (flavone-C-glycosyltransferase); FLS (flavonol synthese); F3GT (flavonoid-3-O-glycosyltransferase); DFR (dihydroflavonol reductase); ANS (Anthocyanidin synthese); AGT (Flavonoid-O-glycosyltransferase); AAT (anthocyanin acyltransferase); BAN (oxidoreductase|dihydroflavonol reductase like) et LAC (laccase) (adapté de Tohge *et al.* 2013).

3.1.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal et sont retrouvés dans toutes les parties de la plante (ex : bois, écorce, fleurs, fruits, graines). La structure générale de ces composés est décrite avec un squelette de 15 carbones constitué de deux cycles phényles qui sont reliés entre eux par un hétérocycle à 3 carbones. En fonction de leur structure chimique, les flavonoïdes sont classés en six familles : les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones, les flavan-3-ols et les anthocyanines (Fig. 31) (Kawser Hossain *et al.*, 2016).

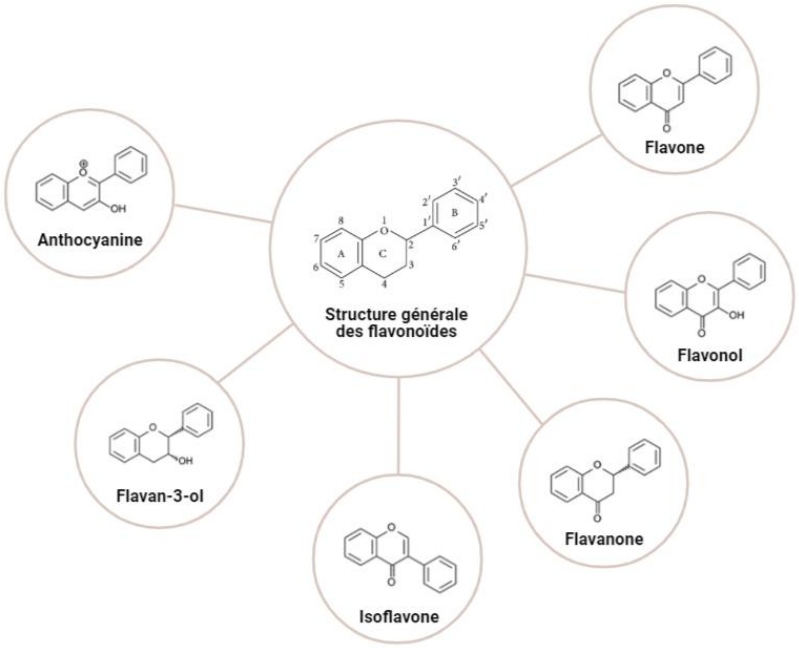
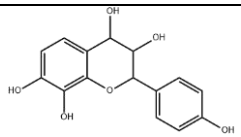
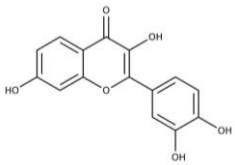
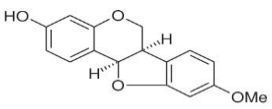


Figure 31. Représentation des familles de flavonoïdes en fonction de leur structure chimique.

Les flavonoïdes sont impliqués dans divers processus physiologiques chez les plantes tels que la protection contre les rayonnements UV, l'attraction des insectes pollinisateurs, la pigmentation des fleurs, le transport de l'auxine et la protection contre des agents pathogènes (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012). Concernant leurs propriétés antifongiques, différents composés ont la capacité d'inhiber la croissance de champignons pathogènes et de pourriture (Tableau 5) (Valette *et al.*, 2017).

Tableau 5. Exemples de flavonoïdes isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Valette *et al.* 2017).

Composé	Structure	Plante	Espèce fongique	Référence
Teracacidine		*Acacia auriculiformis*	*Phellinus badius*	(Mihara *et al.*, 2005)
Tetrahydroxyflavanone		*A. auriculiformis*	*P. badius*	(Mihara *et al.*, 2005)
Médicarpine		*Dalbergia congestiflora*	*T. versicolor*	(Martínez-Sotres *et al.*, 2012)

3.1.2 Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques constitués de deux noyaux benzéniques liés entre eux par un pont éthylène. Ce pont éthylène permet aux stilbènes d'avoir deux configurations possibles, cis et trans, bien que généralement les stilbènes sont retrouvés dans une configuration trans. Les stilbènes sont synthétisés en réponse à un stress, une blessure, une infection ou des irradiations par UV (Nascimento *et al.*, 2013). Le rôle des stilbènes en tant que phytoalexine (substance synthétisée en réponse à une attaque pathogène) a été mis en évidence principalement par le biais de quelques espèces végétales telles que la vigne ou le pin. Chez ces espèces, les stilbènes dérivent principalement du resvératrol (vigne) ou de la pinosylvine (pin) (Fig. 32) (Chong *et al.*, 2009; Jeandet *et al.*, 2010).

A **B**

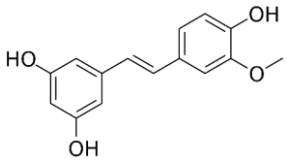
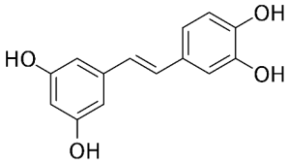
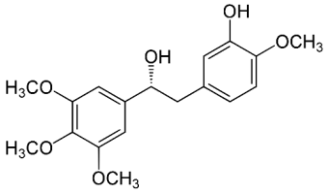


Resvératrol **Pinosylvine**

Figure 32. Structure du resvératrol (A) et de la pinosylvine (B).

Ces molécules peuvent subir un ensemble de réactions (glycosylations, méthylations, oligomérisations ou isomérisations) générant ainsi divers composés stilbéniques (Chong *et al.*, 2009). Par exemple, les conifères accumulent naturellement des molécules de pinosylvine et pinosylvine 3-O-methyl ether, qui ont de fortes propriétés antifongiques contre des champignons dégradeurs de bois (*Coriolus versicolor* et *Gloephyllum trabeum*) (Schultz *et al.*, 1992). Par ailleurs, la production de resvératrol et ε- et δ-viniférine chez la vigne a été associée à la résistance des cultivars au mildiou (Pezet *et al.*, 2004). D'autres composés stilbéniques ont été mis en évidence avec des propriétés antifongiques (Tableau 6).

Tableau 6. Exemples de stilbènes isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Valette *et al.* 2017).

Composé	Structure	Plante	Espèce fongique	Référence
Isorhapontigenin		*Picea abies*	*Coniophora puteana*; *Gloeophyllum sepiarium*; *Phlebiopsis gigantea*; *Serpula lacrymans*	(Hedenström *et al.*, 2016)
Picéatannol		*P. abies*	*C. puteana*; *G. sepiarium*; *P. gigantea*; *S. lacrymans*	(Hedenström *et al.*, 2016)
Combrétastatine		*Combretum caffrum*	*Pyricularia oryzae*	(Ma *et al.*, 2016)

3.1.3 Les lignanes

Les lignanes sont largement représentés dans le règne végétal avec plus de deux cents molécules identifiées (MacRae et Towers, 1984). Ce sont des dimères composés de deux unités phénylpropane (C6-C3) reliées par une liaison carbone-carbone à la position 8 (8-8'). Ils présentent des degrés d'oxydation variés sur la chaîne latérale ainsi que différents motifs de substitution sur le noyau phényl (Teponno *et al.*, 2016). Le terme « néolignane » a été introduit pour inclure les molécules composées de deux unités phénylpropane liées par un autre type de liaison que C8-C8' (Fig. 33).

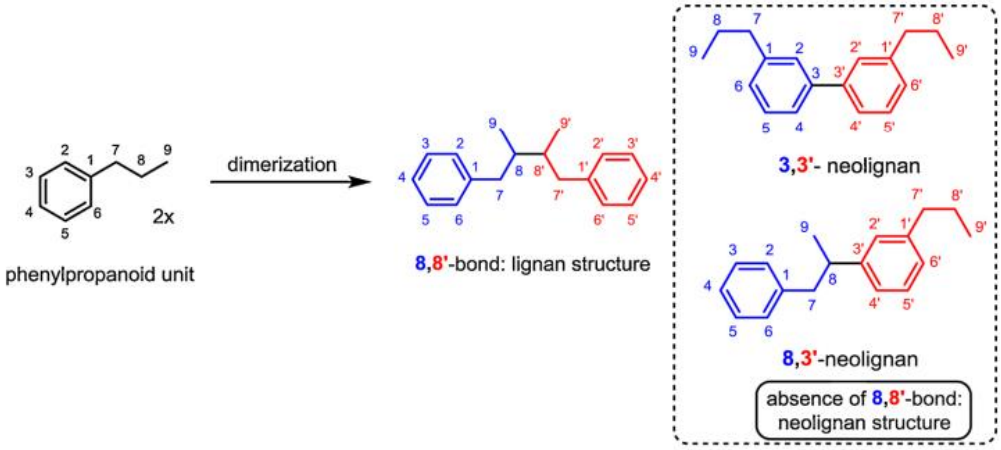
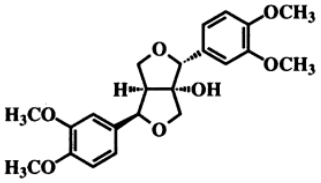
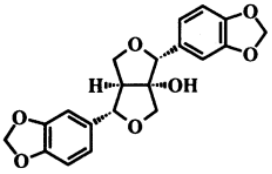
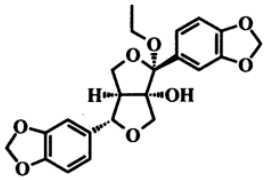


Figure 33. Biosynthèse des lignanes et néolignanes via la dimérisation d'unités phénylpropanoïdes (Zálešák *et al.*, 2019).

Les lignanes ont été décrits avec plusieurs rôles physiologiques chez les plantes tels que antioxydant (ex : acide nordihydroguaiarétique), biocide (ex : (+)-Haedoxan A) et antiappétent (ex : (-)-Yatein) (Lewis et Davin, 1999). Différents composés appartenant à la famille des lignanes ont été identifiés avec des propriétés antifongiques (Tableau 7).

Tableau 7. Exemples de lignanes isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Kawamura *et al.* 2004).

Composé	Structure	Plante	Espèce fongique	Référence
Gmelinol		*Gmelina arborea*	*T. versicolor*	(Kawamura *et al.* 2004)
Paulownin		*G. arborea*	*T. versicolor*	(Kawamura *et al.* 2004)
7'-O-ethyl arboreol		*G. arborea*	*T. versicolor*	(Kawamura *et al.* 2004)

3.1.4 Les tannins

Les tannins sont des polyphénols présentant une grande diversité structurale. Ces différences ont permis de classifier les tannins en 4 familles (Fig. 34) (Khanbabaee et van Ree, 2001) :

- Les gallotannins : ces molécules contiennent des unités galloyl ou des dérivés meta-depsidic qui sont liés à des unités polyol, catéchine ou triterpénoïde.
- Les ellagitannins : ces molécules contiennent au moins deux unités galloyl associées entre elles par des liaisons C-C.
- Les tannins complexes : ces molécules contiennent une unité catéchine liée de manière glycosidique à une unité ellagitannin ou gallotanin.
- Les tannins condensés : ce sont des proanthocyanidines oligomériques et polymériques qui sont composés par des unités catéchines liées entre elles à des positions spécifiques.

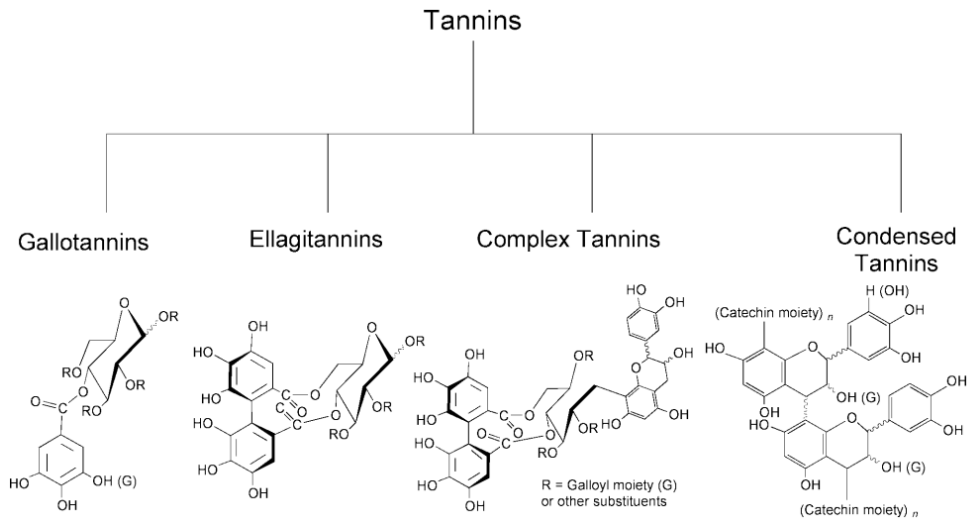
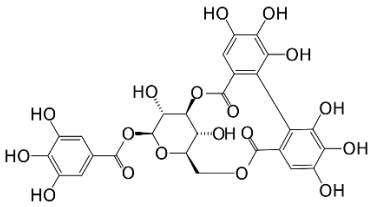
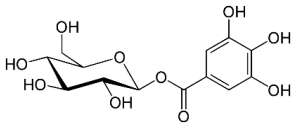


Figure 34. Classification des tannins (Khanbabaee et van Ree, 2001).

Ces composés sont retrouvés dans différentes parties de nombreuses plantes supérieures (ex : écorce, bois, racines, feuilles et graines). Traditionnellement, les tannins ont été utilisés pour la production de cuir (Falcão et Araújo, 2018) et de vin (McRae et Kennedy, 2011). Un intérêt anti-microbien émerge également pour ces molécules avec des propriétés inhibitrices démontrées principalement chez les bactéries et les levures (Tableau 8) (Latté et Kolodziej, 2000).

Tableau 8. Exemples de tannins isolés du bois d'espèces végétales présentant des activités antifongiques (adapté de Latté et Kolodziej 2000).

Composé	Structure	Plante	Espèce fongique	Référence
Corilagine		*Pelargonium reniforme ssp. reniforme*	*C. glabrata*; *C. krusei*; *C. neoformans*	(Latté et Kolodziej 2000)
Glucogalline		*P. reniforme ssp. reniforme*	*C. glabrata*; *C. krusei*; *C. neoformans*	(Latté et Kolodziej 2000)

3.2 Les terpènes

Les terpènes sont des molécules composées d'unités isoprènes (6 carbones) et sont classifiés en fonction de leur degré de polymérisation (Fig. 35). Le nombre d'unités isoprènes dans leur structure a ainsi conduit à la classification de 6 familles (Tableau 9).

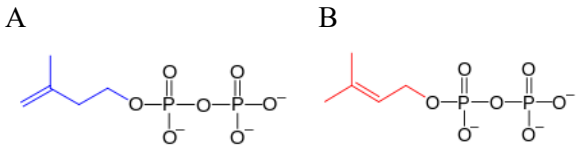
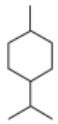
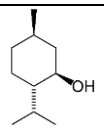
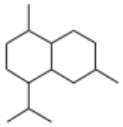
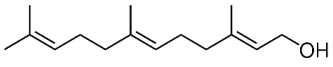
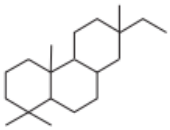
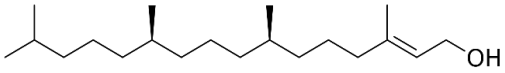
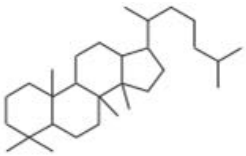
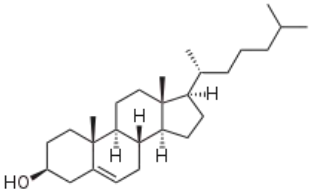
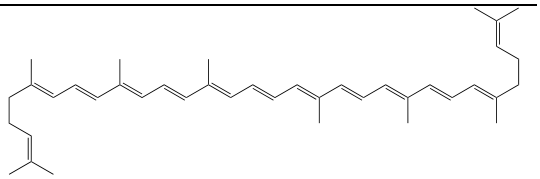


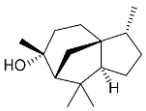
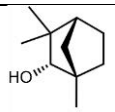
Figure 35. Structure d'une unité isoprène. (A) Structure de l'isopentényl pyrophosphate (IPP). (B) Structure du diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP).

Tableau 9. Classification des terpènes en fonction de leur degré de polymérisation (adapté de Jansson et Nilvebrant 2009).

Classification (n = nombre d'unités isoprènes)	Structure	Exemple
Monoterpènes (n = 2)		 Menthol
Sesquiterpènes (n = 3)		 Farnésol
Diterpènes (n = 4)		 Phytol
Triterpènes (n = 6)		 Stérol
Tétraterpènes (n = 8)	-	 Lycopène
Polyterpènes (n = 3000 à 6000)	-	Latex de l'hévéa

On peut retrouver également des terpènes contenant un ou plusieurs groupes fonctionnels contenant un atome d'oxygène (ex : groupe hydroxyle, carboxyle ou acide carboxylique) qui sont appelés terpénoïdes (Jansson et Nilvebrant, 2009). Ils constituent les principaux composants des huiles essentielles et peuvent être responsables de propriétés gustatives et odoriférantes comme par exemple le cinnamaldéhyde (saveur de la cannelle) et le menthol. Parmi ces composés, plusieurs terpènes ont été identifiés avec des propriétés antifongiques (Tableau 10) (Cheng *et al.*, 2011).

Tableau 10. Exemples de terpènes isolés du bois d'espèces végétales et répertoriés avec des activités antifongiques (adapté de Cheng *et al.* 2011).

Composé	Structure	Classification	Plante	Espèce fongique	Référence
Bornéol		Alcool monoterpénique	*Cunninghamia konishii*	*T. versicolor*	(Cheng *et al.*, 2011)
Cédrol		Alcool sesquiterpénique	*C. konishii*	*T. versicolor*; *Gloeophyllum trabeum*; *Lenzites betulina*	(Cheng *et al.*, 2011)
Endo fenchol		Alcool monoterpénique	*C. konishii*	*T. versicolor* ; *L. betulina*	(Cheng *et al.*, 2011)

3.3 Les composés aliphatiques

Les principaux composés aliphatiques du bois sont des acides gras, des alcools gras et des hydrocarbures (ex : n-alkanes). Les acides gras sont présents dans le bois sous la forme de graisses (esters avec un glycérol appelés mono-, di- et triglycérides), de cires (esters avec des alcools gras) et de stérols (esters stéryls) (Jansson et Nilvebrant, 2009). Les alcools gras peuvent être présents également sous la forme d'alcools libres. Les principaux acides gras retrouvés dans les essences de bois sont des acides gras insaturés (ex : acide oléique et linoléique) (Tableau 11 et Fig. 36). Ces derniers ont notamment été identifiés avec des propriétés antifongiques contre plusieurs champignons pathogènes (ex : *Pythium ultimum*, *Crinipellis perniciosa*) (Walters *et al.*, 2004).

Tableau 11. Composition en acides gras saturés et insaturés dans différents bois d'espèces végétales (*Pinus sylvestris*, *Picea abies* et *Betula pendula*) (Jansson et Nilvebrant, 2009).

Fatty acid	Pine wood (% of total fatty acids)	Spruce wood (% of total fatty acids)	Birch wood (% of total fatty acids)
Saturated:			
Palmitic (C16:0)	1.0	3.6	9.2
17:0ai	0.8	3.0	n.d.
Stearic (C18:0)	<0.2	0.6	4.9
Lignoceric (C24:0)	<0.2	<0.2	8.1
Other saturated*	0.9	2.8	5.3
Unsaturated:			
11-18:1	0.5	2.0	n.a.
Oleic	35.3	25.0	5.6
Linoleic	40.5	36.4	59.0
Linolenic	0.8	0.9	1.3
Pinolenic	10.6	14.9	0
20:1	<0.2	<0.2	4.7
5,11,14-20:3	4.6	3.4	n.d.
Other unsaturated	3.5	4.6	n.d.
Other minor < 0.2 % each	1.5	2.8	1.9

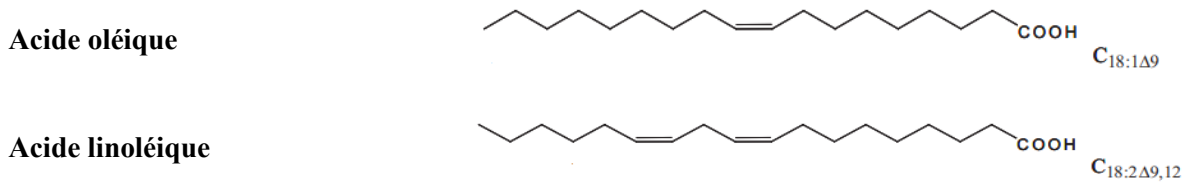


Figure 36. Structure des principaux acides gras insaturés retrouvés dans le bois (Jansson et Nilvebrant, 2009).

3.4 Importance et propriétés antifongiques des extractibles de bois

3.4.1 Fonctions et biotechnologies

Les métabolites spécialisés jouent un rôle primordial chez la plante, régissant les interactions entre la plante et son environnement (stress biotiques et abiotiques). En effet, ces composés remplissent de nombreuses fonctions incluant l'attraction des insectes pollinisateurs, la protection contre les rayonnements UV ou encore la protection contre les herbivores et les organismes pathogènes (Nascimento *et al.*, 2013). Ces différentes propriétés ont ainsi conduit à l'étude de ces composés pour diverses applications biotechnologiques. Cela inclut à la fois les secteurs pharmaceutique et cosmétique pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et odorantes, et également les secteurs agro-alimentaire et de préservation du bois pour lutter contre le développement de champignons nuisibles (Fig. 37) (Choudhari *et al.*, 2020; Goyal *et al.*, 2022; Monteiro *et al.*, 2019; Redondo-Blanco *et al.*, 2020; Woźniak, 2022).

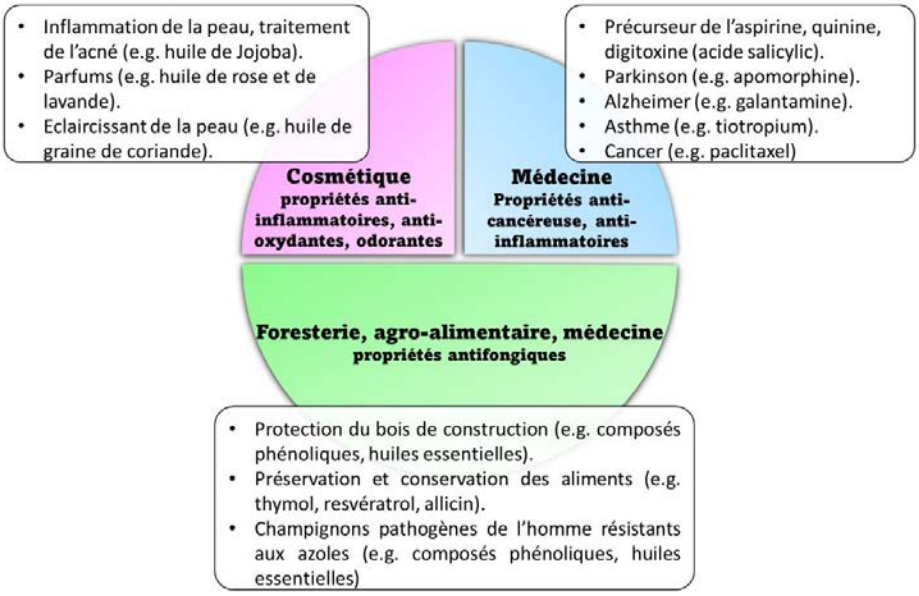


Figure 37. Utilisations et recherches de composés bioactifs issus de végétaux dans divers secteurs industriels (ex : cosmétique, médecine, agro-alimentaire, foresterie). Pour chaque secteur, des composés phytochimiques actuellement utilisés en industrie ou présentant des propriétés intéressantes sont proposés en exemple (adapté de Choudhari *et al.* 2020; Goyal *et al.* 2022; Monteiro *et al.* 2019; Redondo-Blanco *et al.* 2020; Woźniak 2022).

La composition et l'abondance en extractibles sont spécifiques des espèces et corrélée aux conditions environnementales (Kebbi-Benkeder *et al.*, 2015). Une corrélation entre les extractibles et la durabilité du bois a été démontrée notamment par des tests comparatifs de dégradation de bûchettes par champignons ligninolytiques et des termites. Des taux de dégradation plus importants ont été reportés pour les bûchettes dont les extractibles ont été extraits en comparaison à des bûchettes contrôles (Kirker *et al.*, 2013, Wu *et al.* 2012). Ces résultats ont ainsi permis de mettre en évidence le rôle protecteur de ces métabolites dans le bois face à des attaques fongiques.

3.4.2 Propriétés antifongiques et modes d'action

De par leur potentiel biotechnologique, l'identification de métabolites présentant des propriétés antifongiques suscite un intérêt grandissant. Une molécule définie comme un agent antifongique doit présenter deux propriétés qui sont : (1) l'inhibition de la croissance des espèces fongiques et (2) une toxicité minime pour l'organisme hôte (Dixon et Walsh, 1996). Depuis des décennies, plusieurs classes de composés antifongiques synthétiques (ex : benzimidazoles, inhibiteurs de la déméthylation) ont été utilisées pour lutter contre le développement de champignons pathogènes impliqués dans la dévastation de cultures agricoles et le développement de maladies chez l'homme (Bhetariya *et al.*, 2017; Lucas *et al.*, 2015). Cependant, ces molécules peuvent avoir un impact sur la santé humaine et l'environnement. Ainsi, pour utiliser à bon escient les métabolites spécialisés des végétaux comme composés antifongiques, il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'action de ces molécules, leurs potentiels effets secondaires et leur spécificité vis-à-vis des champignons. A l'heure actuelle, l'effet antifongique de ces molécules est dû à cinq mécanismes d'action qui sont : (1) une capacité de piégeage des métaux et des radicaux libres, (2) une interaction directe avec des enzymes impliquées dans la dégradation du bois, (3) une perturbation de la paroi et de la membrane plasmique, (4) une perturbation de l'homéostasie ionique et (5) une activité chaotropique (Valette *et al.*, 2017) (Tableau 12).

Tableau 12. Mode d'action des extractibles de bois expliquant leur propriétés antifongiques (adapté de Valette *et al.* 2017).

Mode d'action antifongique	Molécule	Famille d'extractibles	Espèce fongique	Référence
Piégeage de métaux	Tropolone	Terpènes	*Poria placenta*	(Diouf *et al.*, 2002)
	β-thujaplicin		Pourritures blanche, brune, molle et champignons pathogènes (15 espèces)	(Yen *et al.*, 2008)
Piégeage de radicaux libres	3,4' ,7,8-tetrahydroxyflavanone	Flavonoïdes	*Phellinus noxius*, *P. badius*	(Mihara *et al.*, 2005)
	Teracacidine			
Liaison directe à des enzymes impliquées dans la dégradation	Médicarpine	Flavonoïdes	*Trametes versicolor* (laccase)	(Martínez-Sotres *et al.*, 2015)
	Vanilline	Composés phénoliques	Cellulase (commercial solution)	(Li *et al.*, 2014)
	Acide tannique	Tannins	cellobiohydrolase 1 et β-glucosidase 1 (purification)	(Mhlongo *et al.*, 2015)
Altération de la paroi et de la membrane plasmique fongique	Acide poacic	Acides hydroxycinnamiques	*Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani*	(Piotrowski *et al.*, 2015)
	β-thujaplicin	Flavonoïdes	*Laetiporus sulphureus*	(Yen *et al.*, 2008)
Altération de l'homéostasie ionique	Carvacrol	Terpènes	*Trametes versicolor*, *Coniophora puteana*, *Saccharomyces cerevisiae*	(Rao *et al.*, 2010; Voda *et al.*, 2004)
	Cinnamaldéhyde	Aldéhydes cinnamiques	*Phytophthora capsici*	(Hu *et al.*, 2013)
Activité chaotropique	Phénols, vanilline	Composés phénoliques	*S. cerevisiae*	(Cray *et al.*, 2015)

Les mécanismes d'action des molécules antifongiques sont discutés dans la revue ci-dessous, qui propose une classification des molécules antifongiques en fonction de leur mode d'action ainsi qu'une présentation des techniques développées pour étudier les mécanismes d'action spécifiques de composés antifongiques chez les champignons filamenteux (cette revue a été publiée dans le journal Microbial Biotechnology).

Article n°2 : Modes-of-action of antifungal compounds: stressors and (target-site-specific) toxins, toxicants, or toxin-stressors.

Authors : Delphine Noel, John E. Hallsworth, Eric Gelhaye, Sylvain Darnet, Rodnay Sormani, and Mélanie Morel-Rouhier.

https://doi.org/10.1111/1751-7915.14242

Received: 9 January 2023 | Accepted: 16 February 2023

DOI: 10.1111/1751-7915.14242

MICROBIAL BIOTECHNOLOGY Applied Microbiology International

MINI REVIEW

Modes-of-action of antifungal compounds: Stressors and (target-site-specific) toxins, toxicants, or *toxin–stressors*

Delphine Noel[1] | **John E. Hallsworth**[2] | **Eric Gelhaye**[1] | **Sylvain Darnet**[1] | **Rodnay Sormani**[1] | **Mélanie Morel-Rouhier**[1]

[1]Université de Lorraine, INRAE, IAM, Nancy, France

[2]Institute for Global Food Security, School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK

Correspondence
Mélanie Morel-Rouhier, Université de Lorraine, INRAE, IAM, Nancy, France.
Email: melanie.morel@univ-lorraine.fr

Funding information
Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-11-LABX-0002-01 and ANR-18-CE04-0012

Abstract

Fungi and antifungal compounds are relevant to the United Nation's Sustainable Development Goals. However, the modes-of-action of antifungals—whether they are naturally occurring substances or anthropogenic fungicides—are often unknown or are misallocated in terms of their mechanistic category. Here, we consider the most effective approaches to identifying whether antifungal substances are cellular stressors, toxins/toxicants (that are target-site-specific), or have a hybrid mode-of-action as *toxin–stressors* (that induce cellular stress yet are target-site-specific). This newly described '*toxin–stressor*' category includes some photosensitisers that target the cell membrane and, once activated by light or ultraviolet radiation, cause oxidative damage. We provide a glossary of terms and a diagrammatic representation of diverse types of stressors, toxic substances, and *toxin–stressors*, a classification that is pertinent to inhibitory substances not only for fungi but for all types of cellular life. A decision-tree approach can also be used to help differentiate toxic substances from cellular stressors (*Curr Opin Biotechnol* 2015 33: 228–259). For compounds that target specific sites in the cell, we evaluate the relative merits of using metabolite analyses, chemical genetics, chemoproteomics, transcriptomics, and the target-based drug-discovery approach (based on that used in pharmaceutical research), focusing on both ascomycete models and the less-studied basidiomycete fungi. Chemical genetic methods to elucidate modes-of-action currently have limited application for fungi where molecular tools are not yet available; we discuss ways to circumvent this bottleneck. We also discuss ecologically commonplace scenarios in which multiple substances act to limit the functionality of the fungal cell and a number of as-yet-unresolved questions about the modes-of-action of antifungal compounds pertaining to the Sustainable Development Goals.

INTRODUCTION

Against the backdrop of deteriorating planetary health and the unsustainably large human population, fungi and fungicides are implicated in most of the 17 Sustainable Development Goals (SDG) of the United Nations (Sachs et al., 2022). This is because:

- poor regions need to become self-sufficient in terms of agricultural productivity and food security, including safeguarding fungi needed for soil and plant health (Timmis & Ramos, 2021) and effective control of plant-pathogenic and food-spoilage fungi (SDG 1 'No poverty');
- fungi can be used as a food source and effective control of pre- and post-harvest fungi is needed in

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Applied Microbiology International and John Wiley & Sons Ltd.

relation to crop plants, animal feeds, and human foods (SDG 2 'Zero hunger');
- control of fungal pathogens of humans is needed including *Candida albicans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, and fungi that are implicated in aspergillosis (Paulussen et al., 2017) and seborrhoeic dermatitis (Hay, 2011); fungi provide for bioprospecting (including new antibiotics, new fungicides, and new probiotics such as *Saccharomyces boulardii* var. *cerevisiae*); and fungi can be implicated in microbiome dysbiosis such as inflammatory bowel diseases (Ott et al., 2008; SDG 3 'Good health and well-being');
- microbes, including fungi, can be important as educational tools to increase microbial literacy (McGenity et al., 2020; Timmis et al., 2020; SDG 4 'Quality education');
- fungicides (and other pesticides) and fungal pathogens that can affect humans should be prevented from polluting bodies of water in the environment or otherwise contaminating water supplies (SDG 6 'Clean water and sanitation');
- *Saccharomyces cerevisiae* is useful for the production of bioethanol (SDG 7 'Affordable and clean energy');
- fungi for food and drinks—including alcoholic drinks—and for use in biotechnology (including white biotechnologies, production of fungi as inoculants of soils and plants and fungi as biocontrol agents of insect pests), as well as fungicide production, are economically important commercial sectors (SDGs 8 'Decent work and economic growth' and 9 'Industry, innovation and infrastructure');
- fungi that grow within the indoor environment need to be controlled to protect human health, and those that rot timber and damage other building materials should be controlled through the use of fungicides in paints or other antifungal treatments (SDG 11 'Sustainable cities and communities');
- fungi are a sustainable food source, a source of bioethanol (see above), and can be used to make sustainable construction materials (Jones et al., 2020; SDG 12 'Responsible consumption and production');
- fungi that provide essential services that contribute to soil and plant health are being impacted adversely by climate change and fungal pathogens that infect trees, crop plants, humans, and other animals are being advantaged by climate change (Kespohl et al., 2022; Smith & Casadevall, 2022; SDG 13 'Climate action');
- perturbations of underwater ecosystems due to pollution and/or climate change are damaging microbial communities and, in some cases, advantaging fungal pathogens that attach corals, fish, and other aquatic organisms (Landrigan et al., 2020; Moriarty et al., 2020; SDG 14 'Life below water'); and
- pollution and climate change are also damaging soils and other land-based ecosystems and in some cases favour fungal pathogens (Casadevall et al., 2019; Garcia-Solache & Casadevall, 2010; SDG 15 'Life on land'; see also Anand et al., 2023; Cavicchioli et al., 2019).

In the context of climate change, biodiversity loss, and the deterioration of environmental health, we advocate the development of fungicides that have negligible toxicity beyond their target group and are not environmentally persistent. Furthermore, the United Nations Biodiversity Conference Agreement (Montreal, Canada in December 2022 https://www.cbd.int/conferences/2021-2022/cop-15/documents) aims to reduce the use of chemical pesticides by 50% by 2030. It is therefore imperative to understand the modes-of-action of antifungals to make knowledge-based decisions about those that are safe to use and are environmentally sustainable. It is also necessary to understand modes-of-action to avoid or circumvent problems arising from the development of resistance to antifungals. Recent reviews of antifungal compounds have focused on those active against the Ascomycotina (Braga et al., 2022; Corkley et al., 2021; Zubrod et al., 2019). However, many of the fungi that are problematic in pre-harvest agriculture, feeds and foods, forestry, and in the built environment belong to the Basidiomycota. For example, members of the basidiomycete subdivisions Pucciniomycotina and Ustilaginomycotina are responsible for plant diseases and rot-fungi of the subdivision Agaricomycotina are responsible for wood decay.

Here, we evaluate the diverse approaches to identifying modes-of-action of antifungal compounds by determining whether they are stressors or target-site-specific toxins/toxicants or *toxin–stressors* (a term we use here to describe those inhibitors that have a hybrid mode-of-action) and, where applicable, to determine their target-specific mechanisms-of-action. We consider the use of metabolite analyses, chemical genetics, chemoproteomics, transcriptomics, and the target-based drug-discovery approach, focusing on both ascomycete models and the less-studied basidiomycete fungi. In addition, we discuss the ecophysiological complexity of antifungal substances in Nature, including those found in plants, and consider the implications for anthropogenic approaches to fungal control.

SIMULTANEOUS INHIBITION OF FUNGI BY MULTIPLE ANTIFUNGALS IN NATURAL HABITATS/ CONDITIONS

Even in simple microbial systems with relatively low diversity, such as some food and drink fermentations, microbial cells are subjected simultaneously to a mechanistically diverse array of antimicrobials including organic acids, biosurfactants, and alcohols and other chaotropic solutes (see Box 1), and hydrophobic

BOX 1 Glossary of terms.

Antifungal compounds: a generic term for substances—whether natural or anthropogenic—that inhibit or prevent cell division and growth of fungi (or a subset of fungi), and in some cases damage and kill fungal cells. See also 'Antimicrobial substances' and 'Fungicides'.

Antimicrobial substances: a catch-all term for substances—whether natural or anthropogenic—that inhibit or prevent cell division and growth of microbes (or a subset of microbes), and in some cases damage and kill microbial cells. See also 'Antifungal compounds', 'Biosurfactants', 'Cellular stressors', 'Chaotropic solutes', 'Fungicides', 'Hydrophobic stressors', 'Inhibitory substances', 'Toxic substances', 'Toxicants', '*Toxin–stressors*', and 'Toxins'.

Biosurfactants: microbial metabolites that have a hydrophilic moiety and a hydrophobic moiety, so reduce surface- and interfacial tension by acting as surfactants. Some biosurfactants have antimicrobial activity.

Cellular stress: a phenotypic condition that occurs when the cell is subjected to physical or physicochemical parameter(s)/forces (e.g., those related to stress parameters such as extreme temperature, pH, water activity, or chaotropicity and those related to cell turgor, shear damage or other mechanical forces, rehydration, freeze-thawing, and oxidative damage) that can reduce or prevent cell function(s), impair or damage cell membranes and macromolecules, elicit cellular responses including an increase in energy generation, and may be lethal (Hallsworth, 2018). Some cellular stressors exhibit multiple modes-of-action, such as ethanol, that is chaotropic and reduces water activity, and $MgCl_2$ that is chaotropic and causes osmotic stress (Alves et al., 2015; Cray et al., 2015; Hallsworth & Nomura, 1999). Arguably, all cells are perpetually stressed and there is no such thing as a stress-free condition (Hallsworth, 2018). See also 'Cellular stressors', 'Chaotropic solutes', 'Hydrophobic substances', 'Stress parameter' and '*Toxin–stressors*'.

Cellular stressors: substances that cause cellular stress, including those substances that reduce water activity, modify the cell's osmotic balance, exhibit chaotropic and/or hydrophobic properties, cause oxidative damage, and markedly increase ionic strength (e.g., Figure 1A–C). See also 'Biosurfactants', 'Cellular stress', 'Chaotropic solutes', 'Hydrophobic substances', and '*Toxin–stressors*'.

Chaotropic solutes: are those solutes that are typically less polar than water and increase the entropy of biomacromolecular systems thus increasing disorder in cell membranes and proteins (Figure 1A; Ball & Hallsworth, 2015).

Chaotropicity: the property of the phenomenon whereby biomacromolecules are disordered as described for 'Chaotropic solutes', see also 'Hydrophobic stressors' (Figure 1A,B).

Chemical genetics screening: the study of protein function and signal transduction pathways in cells by screening libraries of small molecules (Kubinyi, 2006).

Chemical proteomics (chemoproteomics): the proteome-wide study of protein targets of antifungal compounds or other biologically active molecules to identify modes-of-action of substances that damage, inhibit the functionality of and/or kill cells (Wright & Sieber, 2016).

Drug discovery: the process of finding new biologically active substances—whether natural or anthropogenic—that can be used as pharmaceuticals or for other purposes (including agricultural fungicides, and other pesticides).

Haploinsufficiency: a phenotypic condition where a dominant genetic trait is expressed in diploid organism that is heterozygous for a function/loss-of-function allele.

Hydrophobic stressors: those cellular stressors that partition into the hydrophobic domains of cell membranes and other biomacromolecular systems, typically increasing their entropic condition (via a chaotropicity-mediated mode-of-action: Figure 1B; Bhaganna et al., 2010; McCammick et al., 2010).

Kosmotropicity: the action of substances that are more polar than water and that entropically stabilise biomacromolecular structures (lower right inserts of Figure 1A,B; Ball & Hallsworth, 2015).

Fungicides: antifungal compounds, commonly of anthropogenic origin, produced to inhibit or prevent the growth of, or kill, fungal pathogens of crop plants and humans, or other animals or to prevent or limit control

fungal growth on surfaces or in materials including paints and construction materials. See also 'Antifungal compounds' and 'Antimicrobial substances'.

Mode-of-action (or mechanism-of-action): the biophysical, physicochemical, or biochemical mechanism via which a biologically active substance (such as a toxin, stressor, drug, or fungicide) exerts its biological effect (see Figure 1 of the current manuscript and Figure 1 of Cray et al., 2015).

Photosensitisers: substances that can be light-activated to produce reactive species via either electron or energy transfer; these reactive species will, in most cases, modify nearby biomacromolecules via oxidative damage (Braga et al., 2022). See also 'Antifungal compounds', 'Cellular stress', 'Cellular stressors', 'Fungicides', and '*Toxin–stressors*'.

Stress: see 'Cellular stress'.

Stress parameter: those thermodynamic, physical, or physicochemical parameters that can induce cellular stress, including. extremes of temperature, pH, water activity, chaotropicity, ionising radiation, and ultraviolet radiation. See also 'Cellular stress'.

Stressors: see 'Cellular stressors'.

Target-specific drug discovery: the process of finding new biologically active substances that interact with a specific molecular target (such as a gene, gene product, or molecular mechanism). See also 'Drug discovery'.

Toxic substances: those substances that poison the cell via a target-specific mode-of-action, usually with a minimum concentration to prevent microbial cell division in the nM or pM range; they include antibiotics, heavy metals, and many fungicides such as ergosterol biosynthesis inhibitors (Figure 1D of the current manuscript and Figure 1 of Cray et al., 2015). See also 'Toxicants' and 'Toxins'.

Toxicants: toxic substances of anthropogenic origin, including many fungicides and other pesticides. See also 'Toxic substances'.

Toxin–stressors: substances that act as site-specific cellular stressors because, like toxic substances, they target a specific site within the cell, but act as stressors (e.g., by causing oxidative damage). One example is hydrophobic photosensitisers that accumulate in the cell membrane and once activated by light or ultraviolet radiation release reactive oxygen species (Braga et al., 2022). The term *toxin–stressor* is not yet established, hence is shown in italics (Figure 1c). See also 'Cellular stress', 'Cellular stressors', 'Photosensitisers', and 'Toxic substances'.

Toxins: toxic substances that are of natural origin, including heavy metals and some plant and microbial metabolites (N.B., most of the antimicrobial compounds produced by microorganisms are stressors rather than toxins; see Cray, Bell, et al., 2013). See also 'Toxic substances'.

substances (Cray et al., 2015; Cray, Bell, et al., 2013; Randazzo et al., 2010). Heterogeneous and highly diverse habitats of fungi, such as soils, present an indeterminate number of challenges to the cell including stress parameters, stressors, and toxins that can vary spatially, temporally, and across different scales (Hallsworth et al., 2023). Individual stressors can also inhibit cells via multiple mechanisms (Alves et al., 2015; Benison et al., 2021; Cray et al., 2015; Hallsworth, 2018). Furthermore, stressors may induce so many cellular changes (including secondary stresses such as oxidative damage; Hallsworth et al., 2003) that these can mask their primary mode-of-action or are misallocated as inducing mechanical injury (e.g., Giannousi et al., 2015) albeit that mechanical injury can also act as a source of stress (e.g., Garduño-Rosales et al., 2022; Hallsworth, 2018; Villalobos-Escobedo et al., 2022).

As a result of the mechanistic diversity of the thermodynamic, biophysical, physicochemical, photochemical, and/or toxic assaults on cells in natural ecosystems (and the dynamic nature of the conditions to which cells can be subjected), the development of resistance to inhibition by a specific substance is somewhat rare. By comparison, the anthropogenic application of individual fungicides, like the clinical use of antibiotics, is a powerful way to select for resistant microbial phenotypes (Larsson & Flach, 2022; Mshana et al., 2021). Furthermore, there is no resistance *per se* to the ultimate failure of cell function at the high chaotropicity or low water activity that can be caused by cellular stressors (Cray et al., 2015; Hallsworth et al., 2007; Stevenson, Hamill, O'Kane, et al., 2017) or at extreme temperatures (Chin et al., 2010; Ferrer et al., 2003; Price & Sowers, 2004). Relatively few fungicide products are

formulated to expose fungi to multiple, mechanistically diverse modes-of-inhibition. One example is Phytex (Pharmasol Ltd), which is based on a formulation of antimicrobial organic acids and substances which are not usually considered active ingredients but are added to confer other properties on the formulation. These include methyl salicylate, ethyl acetate, and methylated spirits that are known to act as chaotropic and/or hydrophobic stressors and thus could contribute to the potency of Phytex (Cray et al., 2014).

Not only are many metabolites within the microbial cell chaotropic or hydrophobic–including antimicrobials produced by microbes themselves–but many naturally occurring and anthropogenic substances are too including some salts (see below), fertilisers such as urea and nitrates, substances within oil, many metabolites of plants, and substances within plant, animal and microbial necromass, faeces, etc. Availability of elements/compounds that are essential to the cell, such as metal cofactors, can also determine the efficacy of an antifungal. This has been demonstrated in *S. cerevisiae*, where iron deficiency increases the cell's susceptibility to terbinafine, a compound that inhibits squalene epoxidase Erg1 and so disrupts the ergosterol biosynthetic pathway. This has been attributed to both a decrease in Erg1 translation and the lanosterol-induced degradation of Erg1 under iron deprivation conditions (Jordá et al., 2022).

Although the current article considers the modes-of-action of individual antifungals, we advocate the use of more-complex antifungal strategies whenever possible that emulate the complexity of constraints that fungi can experience in Nature and minimise the risk of resistance.

ANTIFUNGAL COMPOUNDS ARE STRESSORS AND (TARGET-SITE-SPECIFIC) TOXINS, TOXICANTS, OR *TOXIN–STRESSORS*

The modes-of-action of antifungals can be misunderstood, sometimes for decades, if the nature of their activity is mis-diagnosed. For example, ethanol was long thought of as a toxic substance and its mode-of-action was not understood until it was identified as a cellular stressor with a chaotropicity-mediated stress mechanism (Cray et al., 2015; Hallsworth, 1998; Hallsworth et al., 2003, 2023). Other chaotropes as well as hydrophobic substances can have so many individual stress-induced impacts on the cell (e.g., Rao et al., 2010) that these can be mistaken for site-specific toxicity. Similarly, salts that act as stressors are sometimes mistaken for toxic substances (e.g., Bhargava & Srivastava, 2013). It is therefore important to be able to identify the mechanistic category to which an inhibitory compound belongs: toxin/toxicant or stressor (or whether it has a combination of traits; Box 1; Figure 1).

Toxic compounds have a target-specific mode-of-action and are inhibitory at low concentrations (see below), whereas stressors can impact many/diverse structures or sites in the cell and many are in most of the cases inhibitory in the mM or M concentration range. Some substances, such as some photosensitisers (Box 1), are target-specific in as much as they accumulate in the fungal cell membrane but act as stressors because, once activated, they damage the cell by releasing singlet oxygen that causes oxidative damage; we call these *toxin–stressors* (Figure 1C). It should be noted that chaotropic and hydrophobic stressors (as do osmotic stressors) can inhibit/damage any type of cellular system, whereas toxic substances (including *toxin–stressors*) are typically more taxon-specific. A classification of antimicrobials, according to their modes-of-action, was devised by Cray, Bell, et al. (2013).

A large number of naturally occurring antifungal compounds are not toxins but stressors that exist in the aqueous phase of cells (chaotropic stressors) or the hydrophobic domains of the membranes and other biomacromolecules (hydrophobic stressors) and entropically disorder macromolecular systems (Figure 1A,B; Ball & Hallsworth, 2015; Cray et al., 2015). A decision tree has been constructed to aid the identification of toxins versus chaotropic and hydrophobic stressors (Cray et al., 2015) based in part on the degree of hydrophobicity expressed as the partition coefficient of the compound in a two-phase octanol : water system (log $P_{octanol–water}$) and based in part on the concentration at which the compound is inhibitory to growth because toxins typically prevent growth in the nM or pM concentration range, hydrophobic stressors in the low-mM or the nM range, and chaotropic solutes in the M to mM range (Bhaganna et al., 2010).

Well-known examples of toxic compounds are inhibitors of ergosterol biosynthesis such as clotrimazole and other azoles which act on lanosterol-14α-demethylase (the CYP51/ERG11 protein; Figure 1D). The inhibition of this enzyme affects membrane integrity through the disruption of ergosterol synthesis (Sagatova et al., 2015). Other cell components can be affected by toxic compounds such as the cytoskeleton, which is destabilised by benzimidazoles that target β-tubulin (Albertini et al., 1999), or mitochondria, where the respiration can be altered by succinate dehydrogenase inhibitors and quinone outside inhibitors that target the cytochrome b (Bartlett et al., 2002; Sierotzki & Scalliet, 2013).

One effect of chaotropes such as $MgCl_2$, ethanol, butanol, and the secondary metabolites vanillin and guaiacol or the hydrophobic secondary metabolite cinnamaldehyde is cellular leakage due to an increase of cell membrane permeability, alteration of Ca^{2+} homeostasis, and oxidative stress (Cray et al., 2015; Gao et al., 2021; Huang et al., 2019; Santos et al., 2015; Yang et al., 2021). Both chaotropes and hydrophobic stressors are characterised by lower polarity than water (Bhaganna et al., 2010; Cray, Russell, et al., 2013; McCammick et al., 2010;

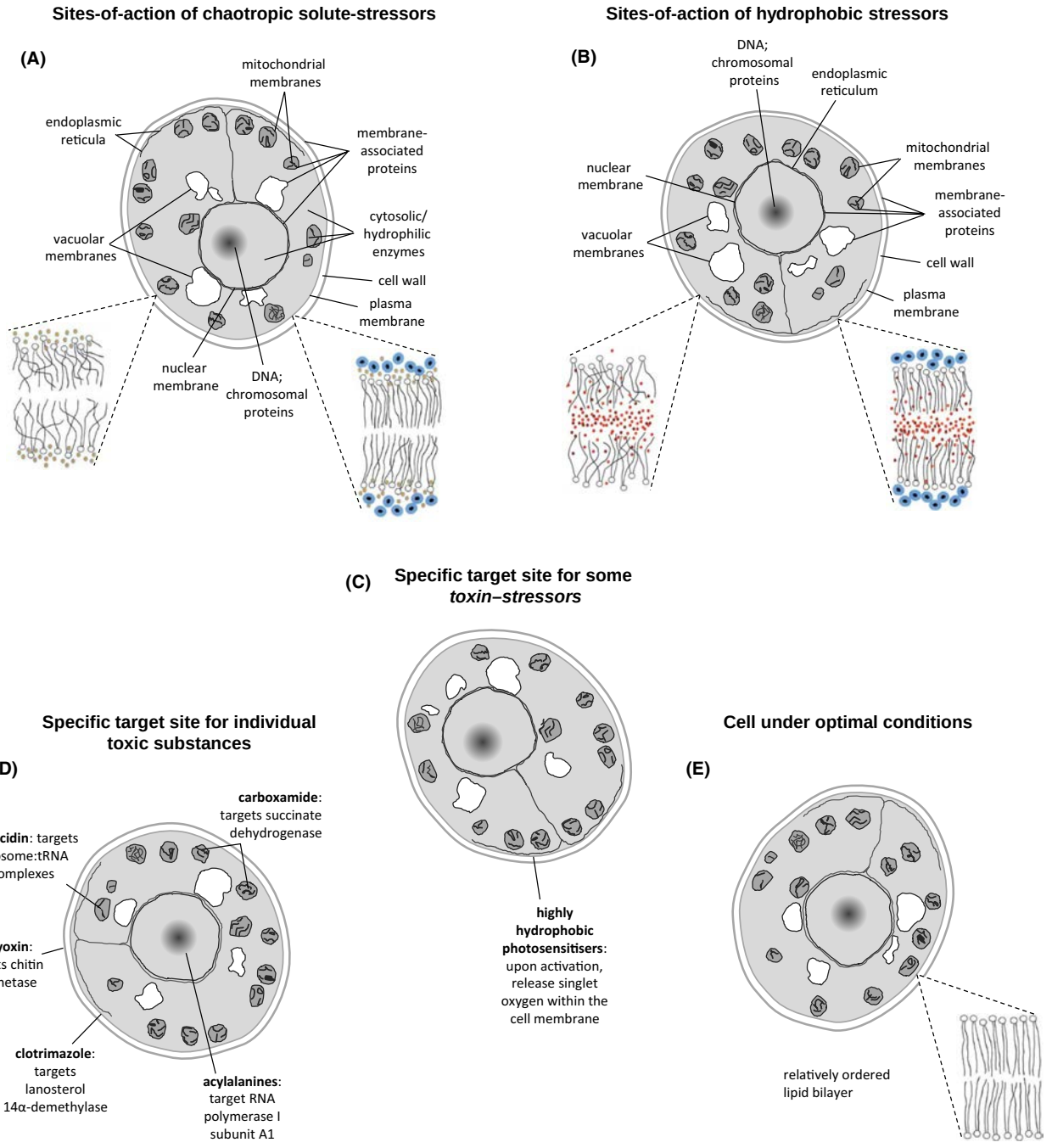


FIGURE 1 Cross-sectional representations of the *Saccharomyces cerevisiae* cell, illustrating sites-of-action for inhibitory substances: (A) soluble chaotropes that enter the cell, such as ethanol; (B) hydrophobic substances (log P > 1.95), such as benzene; (C) some photosensitisers, such as highly hydrophobic phenothiazines and polyacetylenes, that act as *toxin–stressors* with a site-specific location and target-specific activity (within the cell membrane) but a stressor mode-of-action (release of reactive oxygen species that cause oxidative stress; Braga et al., 2022); and (D) named, toxic substances (each with a target-specific mode-of-action), compared with (E) an uninhibited cell. Inserted are cartoons of the lipid bilayer indicating (A, left) structural disorder induced by a chaotropic solute; (A, right) the protective activity of a kosmotropic compatible solute such as trehalose; (B, left) structural disorder induced by a hydrophobic stressor; (B, right) the protective activity of a kosmotropic compatible solute such as trehalose; and (E, right) a relatively unstressed membrane. These lipid-bilayer representations are simplified for clarity; chaotropic solute molecules may enter the hydration shell of kosmotropic compatible solutes (though this has yet to be experimentally determined). This display was modified with permission from the publisher: a version of the figure was published in *Current Opinion in Biotechnology*, volume 33, by Cray et al. 'Chaotropicity: A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms', pp. 228–259, Copyright Elsevier (2015). The inserts originally came from 'Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells' by Bhaganna et al. (2010) *Microbial Biotechnology* volume 3 issue 6 pp. 701–716.

Suryawanshi et al., 2017). They induce similar cellular responses such as the production of proteins involved in protein stabilisation, the production of compatible solutes (e.g., trehalose), or an alteration of lipid-bilayer composition (Bhaganna et al., 2010; Hallsworth et al., 2003). Although these compounds do not act on specific protein

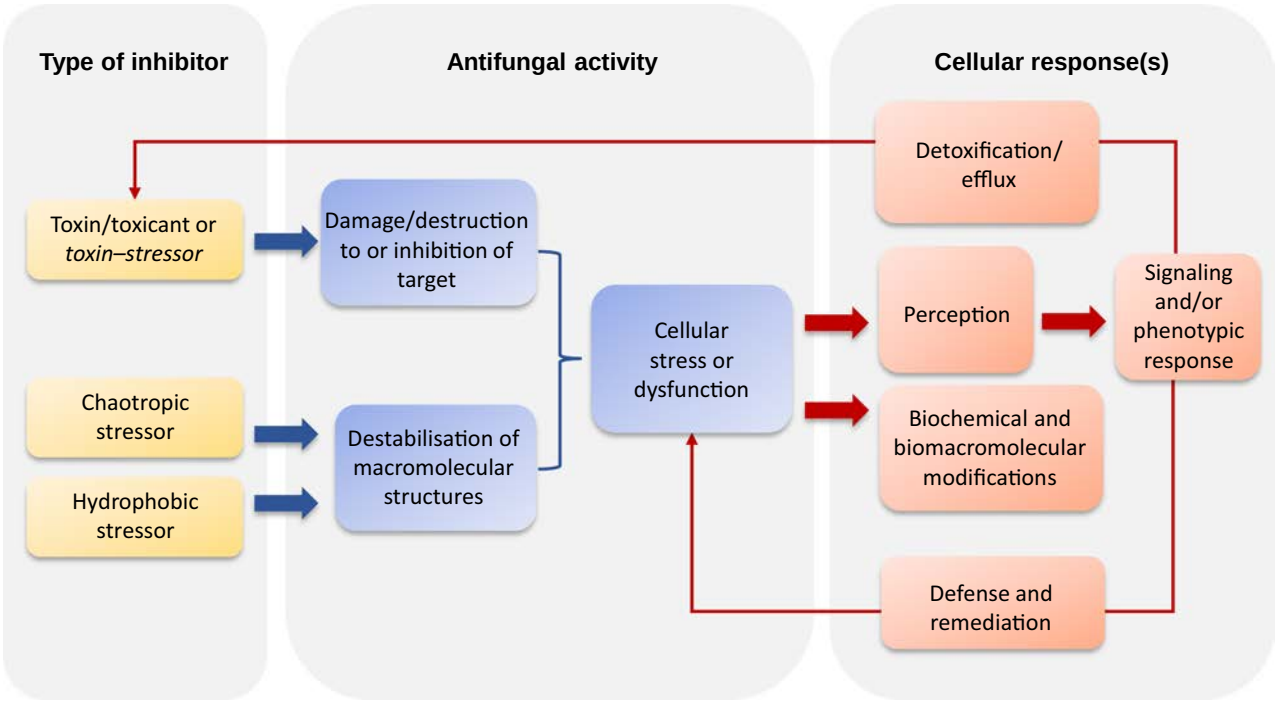


FIGURE 2 Antifungal compounds and cellular responses, assuming that cell death does not occur. Molecules with antifungal activity can be classified according to their modes-of-action. Toxicants act on a specific target so, for example, their interaction may alter protein function via allosteric changes or other inhibitory mechanisms (Figure 1D). Chaotropic or hydrophobic molecules act as stressors that exert adverse impacts on diverse types of biomacromolecules so can inhibit cell functions (Figure 1A,B). In all cases, these activities lead to cellular dysfunctions including inhibition of growth which, if not lethal, induce cellular responses. Remediation consists in limiting the damages in cells and detoxification aims at eliminating the compound.

targets within cells, interactions with different enzymes are reported due to their chaotropic and hydrophobic properties. For example, chaotropic compounds such as ethanol and $MgCl_2$ are able to inhibit β-galactosidase activity and the addition of protective agents (e.g., betaine) can reverse this inhibition depending on the stressor (Bhaganna et al., 2010), a principle confirmed using agar gel-point assays (Alves et al., 2015) and whole-cell systems (Hallsworth et al., 2007; Stevenson et al., 2015; Stevenson, Hamill, Medina, et al., 2017; Williams & Hallsworth, 2009).

Unlike chaotropic solutes, hydrophobic compounds do not seem to exert inhibitory activity on hydrophilic biomacromolecules due to their low solubility and limited interactions with hydrophilic domains (Bhaganna et al., 2010). For example, the hydrophobic compounds benzene, toluene, octanol, xylene, and hexane inhibit the activity of the hexokinase of *S. cerevisiae* by interacting with its hydrophobic domain. Similarly, hydrophobic cinnamaldehyde interacts with various enzymes such as squalene epoxidase, thymidylate synthase, β-1,3-glucan synthase, and chitin synthase 1 (Bang et al., 2000; da Nóbrega Alves et al., 2020). These activities likely result from the generic hydrophobic properties/behaviour of the compound and not from the inhibition of a specific target *per se*.

Whatever the properties of inhibitory substances (toxins/toxicants, chaotropes or hydrophobic compounds), they may secondarily induce oxidative stress and can trigger global responses to cellular dysfunctions, both to limit the cell damages and to mitigate against damage to the cell and its functions and to catabolise/detoxify or expel the compound (Figure 2; Hallsworth et al., 2003). If toxins and toxicants exert their toxicity by causing oxidative damage, then their mode-of-action is best characterised as a *toxin–stressor*. The same is true for those photosensitisers (whether they are plant metabolites or anthropogenic compounds) that preferentially accumulate in the fungal cell membrane but, once activated by light or ultraviolet radiation, release singlet oxygen and other reactive species thus causing oxidative stress/damage that can be lethal (Figure 1C; Braga et al., 2022). Collectively, such factors can complicate determinations of the precise modes-of-action of antifungal compounds.

ANALYSIS OF FUNGAL METABOLITES

Ergosterol biosynthesis is specific to the fungi and some algae (Darnet et al., 2021). This sterol is not only needed for cell membrane fluidity but may also play an important role in glycerol efflux and survival of *S. cerevisiae* cells during osmotic downshock and acts as a fungal hormone that stimulates growth and proliferation (Figure 1D; Jorda & Puig, 2020; Mohid et al., 2022; Szomek et al., 2022; Toh et al., 2001). Sterol profiling has been one of the methods used to identify the targets of azole-based compounds

and other types of ergosterol biosynthesis inhibitors (Müller et al., 2017). By quantifying the amounts of each intermediate in the ergosterol biosynthetic pathway, it is possible to deduce which enzyme has been targeted by a given inhibitory compound that had added to the growth medium. However, this approach requires that the whole pathway is well known in the cultured organism and that the analytic method is sufficiently sensitive to extract and detect all intermediates.

To better understand the sterol biosynthetic pathway in the *Leishmania* protozoan parasite and elucidate the mechanism underlying the differential efficacy of antifungal azoles, a new liquid chromatography coupled to tandem mass-spectrometry (LC–MS/MS) method was recently developed and allowed detection of 16 sterols including intermediates between lanosterol and ergosterol (Feng et al., 2022). One category of ergosterol-biosynthesis intermediates acting as precursors of ergosterol in fungi is the 4-methylsterols (Darnet & Schaller, 2019). By metabolites analysis, it was shown that the resistance of *C. albicans* to fluconazole is due to the synthesis of 14-α methylsterol intermediates that maintain the functionally of the cell membrane (Lu et al., 2022). A synergistic treatment, based on fluconazole and CZ66, a small compound identified from a series of 3-(benzo[1,3]dioxol-5-yl)-N-(substituted benzyl) propanamides, was able to deplete 14-α methylsterols by inhibiting the activity of Erg251, which is the enzyme involved in C4-position demethylation (Lu et al., 2022).

However, this method is suitable for azoles and other ergosterol biosynthesis inhibitors, which exhibit a specific mode-of-action on a given enzyme within the ergosterol biosynthesis pathway. This is not the case for all types of antifungal compounds. To explore the molecular mechanisms of the antifungal compound phenazine-1-carboxamide that inhibits *Rhizoctonia solani*, and discover potential targets-of-action, an integrated analysis of transcriptome and metabolome was performed (Zhang et al., 2022). The study identified a total of 466 metabolites that were unique to either the phenazine-1-carboxamide-supplemented culture or the control (no-phenazine-1-carboxamide-added) culture. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-enrichment revealed that the phenylpropanoid-biosynthesis pathway and those pathways involved in metabolism of purine and arachidonic acid were adversely impacted.

CHEMICAL GENETIC SCREENING TO IDENTIFY MODES-OF-ACTION

Screening libraries of haploinsufficient strains and other mutant strains to identify the targets of toxic compounds

Identifying the modes-of-action and molecular targets of antifungal compounds has been possible in *S. cerevisiae* via chemical genetic screening (Box 1). The use of collections of homozygous diploid deletion strains or haploid deletion strains allows the identification of cellular targets processes that are altered by/in response to an antifungal compound depending on the susceptibility of the cells to that antifungal (Xue et al., 2020; Zimmermann et al., 2018). Using a collection of haploid mutants deleted for cell-wall components, it was shown that jervine, a jerveratrum-type steroidal alkaloid that impairs cell-wall biosynthesis in *S. cerevisiae*, acts on the type II membrane proteins Kre6 and Skn1, which are involved in β-1,6-glucan biosynthesis (Kubo et al., 2022). Screening of haploid mutant strains that are susceptible to inhibition by poacic acid, a diferulate commonly found in lignocellulosic hydrolysates, revealed that the Protein Kinase C (PKC) pathway (which is involved in cell-wall-integrity signalling) was the pathway that was the most-vulnerable to inhibition by this compound (Piotrowski et al., 2015). By coupling this screening approach with morphological analyses, the authors found that poacic acid localises to the cell wall where it binds to glucan fibrils that are usually implicated in the extracellular part of β-1,3-glucan synthesis, thus inhibiting this synthesis (Piotrowski et al., 2015).

Working with haploid deletion strains or homozygous diploid deletion strains is only possible for non-lethal mutants whereas working instead with heterozygous diploid deletion strains can bypass that problem. Indeed, in this case, heterozygous diploid deletion strains have had one copy of a gene deleted but the other copy remains present and functional, which facilitates production of the protein (albeit that less is produced than in the wild-type strain) (Figure 3; Giaever et al., 1999, 2004). The haploinsufficiency profiling compares the growth of heterozygous diploid deletion strains and wild-type strain of heterozygous diploid deletion strains that are grown in the presence of an antifungal compound (Figure 3). It allowed the identification of chitin-synthase-1 and chitin-synthase-2 enzymes as the targets of the antifungal plant metabolite 4-cyclopentene-1,3-dione (Mokhtari et al., 2018). Another study identified glutamate dehydrogenase (GDH) and the resistance-to-rapamycin-deletion-2 protein (RRD2) as targets of antofine, a phenanthroindolizidine alkaloid isolated from milkweed (*Asclepias syriaca*), leading to alteration of the target-of-rapamycin (TOR) signalling pathway (Mogg et al., 2019).

Chemical genetic screening for identifying modes-of-action of stressors

Haploinsufficiency screenings with thousands of small molecules (Box 1) that have inhibitory activity against *S. cerevisiae* have also shown that the majority of these molecules do not target a single site because they are stressors that act on multiple sites, bind DNA, or chelate metal ions (Hoepfner et al., 2014). For

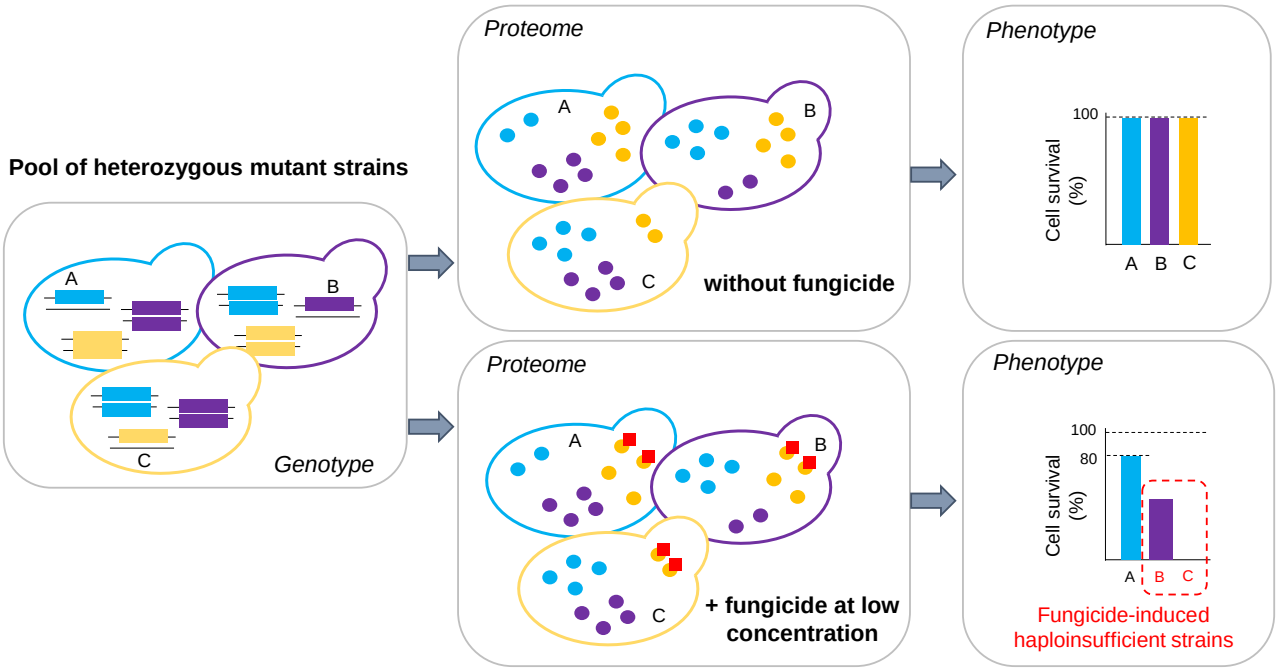


FIGURE 3 Principle of haploinsufficiency profiling. To determine the protein target(s) of an antifungal molecule, a pool of *S. cerevisiae* heterozygous mutant strains is incubated in the absence and presence of a fungicide/antifungal compound. The concentration of this antifungal is determined in advance, such that it causes some lethality but allows a 70-80% survival rate for the wild-type strain (Piotrowski et al., 2015). Since heterozygous mutant strains have been deleted for one copy of a given gene, this results in a decrease in the amount of protein produced by that gene compared to the wild-type strains that each have two copies of that gene, If this specific protein is not a/the target of the antifungal, the same phenotype as the wild type is observable in cells of mutant strains grown in the presence of the antifungal compound (Strain A). By contrast if the protein is a target of the fungicide, the amount of this protein that is produced is not enough to compensate for the toxicity of the fungicide, inducing hypersensitivity of the strain that cannot survive (Strain C). For some mutants, a decrease in cell survival occurs because the antifungal targets more than one protein, or the concomitant decrease in the amount of two proteins is responsible for growth inhibition. This is the case for Strain B, for example, where the amount of the purple-coded protein is reduced because one allele of the gene is deleted and the amount of the yellow-coded protein that are functional is reduced because of the antifungal. Symbols indicate budding cells of S. cerevisiae (coloured, irregular-shaped outlines), three genes (coloured, horizontal bars), the proteins that are coded for by these genes (coloured dots), and percentage survival for each strain (vertical columns on the histograms). In each case, colour coding indicates S. cerevisiae Strain A (blue), Strain B (purple), or Strain C (yellow). Red squares represent the location of the antifungal compound.

example, three *S. cerevisiae* strains that are susceptible to inhibition by α-hederin, a saponin found in the leaves of common ivy (*Hedera helix*), have deletions in genes encoding proteins involved in transcription processes; proteins including a component of the chromatin structure-remodelling complex SWI/SNF (ARP7), a subunit B16 of RNA polymerase II (RPB7), and a component of the remodelling-the-structure-of-chromatin complex RSC58. Moreover, the growth inhibition due to α-hederin was similar to the one observed for several compounds inhibiting β-glucan synthesis such as caspofungin, ergokonin A, ascosteroside, and an echinocandin C derivative (Prescott, Rigby, et al., 2014). This suggests that α-hederin has other modes-of-action in addition to the inhibition of cell-wall synthesis. The growth of *S. cerevisiae* strains deleted for iron permease FTR1, iron oxidoreductase FET3, copper transporting ATPase CC2, and the voltage-gated chloride channel GEF1 was inhibited in presence of gossypol, a phenolic compound. The growth of these strains was also inhibited by the two iron chelators deferasirox and desferricoprogen, and interestingly, the combined presence of Fe^{2+} and gossypol in culture media prevented growth inhibition of these deletion strains by the iron chelators. Thus, gossypol appears to inhibit growth of *S. cerevisiae* through its Fe^{2+}-chelating properties rather than through any direct interaction with a specific protein target (Prescott et al., 2018).

A core collection of 24 homozygous and heterozygous diploid strains, referred to as *signature strains*, was assembled to determine whether each antifungal acts as a stressor or a toxin/toxicant prior to undertaking a large-scale genetic screening from the deletion-strain collections. The antifungal effect of the organosulphur compound allicin, obtained from garlic (*Allium sativum*), was assayed using these signature strains. This facilitated the identification of a mode-of-action of this antifungal via impacts on Cu^{2+} and Zn^{2+} import and homeostasis (Prescott & Panaretou, 2017). The mode-of-action of allicin was then confirmed by haploinsufficiency screening on a library of *S. cerevisiae* deletion mutants (Sarfraz et al., 2020).This screen revealed that growth of three of the mutant strains was inhibited by allicin. These three strains were deletion

mutants that lacked genes coding for proteins involved in DNA replication, chromatid cohesion, or mitochondrial translation. These processes are essential for cell division of *S. cerevisiae* and may thus reflect allicin-induced stress responses rather than a targeted interaction with one of the three proteins identified in the screen. Similarly, a collection of 4786 *S. cerevisiae* haploid deletion mutants were screened for their hypersensitivity to the cell wall-destabilising agents caspofungin, zymolyase, and Congo Red. Forty-three mutants exhibited reduced growth compared to the wild-type, in presence of these compounds and the deleted genes code for proteins involved in cell-wall morphogenesis, transcription, chromatin remodelling, signal transduction and stress response, RNA metabolism, ergosterol biosynthesis, and vesicular trafficking and transport. This set of genes was designated as a 'signature of cell-wall maintenance' (García et al., 2015).

The chemical genetics approach is also used to identify whether an antifungal exhibits modes-of-action other than, or in addition to, the intended target. Calcineurin is a serine/threonine phosphatase which modulates gene expression via the calcineurin pathway (Crabtree, 2001). In *S. cerevisiae*, calcineurin-dependent gene expression is involved in various aspects of the cell's physiology and homeostasis, including maintenance of cell-wall integrity (Stie & Fox, 2008). To determine whether the calcineurin inhibitor 3,4,5-trimethoxybenzyl isothiocyanate has additional antifungal activities, the haploinsufficiency method was employed. Seven deletion strains of *S. cerevisiae* that were sensitive to 3,4,5-trimethoxybenzyl isothiocyanate compared to the wild-type strain were identified. The three deletion strains that were the most-susceptible to growth inhibition by this antifungal were found to have deletions for two genes encoding subunits of RNA polymerase III (RET1 and RPC53) and one gene encoding actin nucleation protein (ARP3; Prescott, Panaretou, et al., 2014).

Limits of chemical genetic methods and alternative strategies to determine modes-of-action of antifungals for non-model filamentous fungi

Although chemical genetics is effective for determining the mechanisms-of-action and/or the molecular target(s) of antifungals molecules, this methodology is primarily used for those Ascomycota, especially *S. cerevisiae*, for which genetic manipulation is relatively easy and the systemic deletion of individual genes is possible. Whereas *S. cerevisiae* has been widely used as a model organism, studies suggest that *S. cerevisiae* data cannot reliably predict targets in *C. albicans* or other fungi (Kelly et al., 2000; Nagahashi et al., 1998). This practice has limited our ability to study pathogenesis and treat fungal diseases of plants and animals, including humans. Thus, multiple types of gene-mutant libraries have been constructed in the diploid ascomycete *C. albicans*, including gene-knockout libraries, transposon-insertion libraries, and the conditional expression libraries, such as the gene replacement and conditional expression (GRACE™) mutant library (Roemer et al., 2003; Wang et al., 2022).

For filamentous basidiomycetes, no mutant library is currently available. This is mainly because genetic transformation has been achieved in only few species such as *Coprinus* sp., *Schizophyllum commune* (Fincham, 1989), *Phanerochaete sordida* (Yamagishi et al., 2007), and *Pleurotus ostreatus* (Xu, Nakazawa, et al., 2022). Whereas random mutagenesis by ultraviolet radiation and/or ethyl methanesulfonate represents an efficient alternative method to chemical genetics that can be used for non-model organisms. Random mutagenesis was originally developed in *S. cerevisiae* to obtain auxotrophic strains (Brandriss, 1979; Little & Haynes, 1979), this method is now mainly used to generate strains with increased/optimal fitness or higher/optimal productivity of compounds of biotechnological interest than a wild-type strain for biotechnological purposes (Ho & Ho, 2015; Zhao, Ma, et al., 2018). This classical genetic strategy, also called a forward genetics approach, was used in the ligninolytic basidiomycete *P. ostreatus*. Combining these mutagenesis methods and whole-genome resequencing revealed that the mutations responsible for impaired lignolysis were located in the putative chromatin modifier CHD1-coding gene and the agaricomycete-specific protein WTR1-coding gene (Nakazawa et al., 2017). Similarly, for the plant-pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, 32 mutants were identified that have a slower growth rate than the wild-type on control media (with no antifungal added) and either do not produce sclerotia or produce sclerotia that are discoloured or malformed (Xu, Ao, et al., 2022). Two of the three mutants that were discoloured were analysed morphologically and genetically and their mutations were found to be localised in the same gene. This gene is an orthologue of the Botrytis cinerea BcSMR1 that codes for a master transcription factor controlling the melanisation of sclerotia.

TRANSCRIPTOMICS FOR ASSESSING CELLULAR DAMAGE AND CELLULAR RESPONSES

The analysis of whole-genome expression in presence of antifungals can be used to determine modes-of-action of these compounds. However, transcriptomics approaches have only on occasion identified the targets of antifungal compounds because it is difficult to know whether the genes regulated in the presence of the antifungal are those which code for the proteins

targeted by the compound, or whether they are regulated as a consequence of the resulting cellular dysfunction. This is the case for a transcriptomic study of *C. albicans* in response to tomatidine, an alkaloid found in tomato (*Solanum lycopersicum*; Dorsaz et al., 2017). The presence of tomatidine results in upregulation of genes involved in ergosterol biosynthesis. Sterol analysis identified an accumulation of zymosterol and ergosta-5,7,24(28)-tetraenol indicating that tomatidine inhibited both C24 sterol methyltransferase (ERG6) and Δ5-sterol-Δ24-reductase (ERG4), respectively. These targets were further validated using a forward genetic approach in *S. cerevisiae* that revealed two non-synonymous mutations in the *ERG6* gene in mutant strains that are resistant to tomatidine (Dorsaz et al., 2017). A study carried out in the ascomycete *Magnaporthe oryzae* identified the pyruvate dehydrogenase E1 (PDHE1) as a target of isobavachalcone, an antifungal compound present in the seed extract of babchi (*Psoralea corylifolia*). A three-dimensional structural model of PDHE1 was used to predict the physical interaction between PDHE1 and isobavachalcone (by performing molecular docking and molecular dynamics simulations) (Li et al., 2021).

Most of the time, the gene regulation pattern, revealed using transcriptomic analysis, is a consequence of both mix between the direct effect of the antifungal compound on gene expression and the secondary effects caused by proteins produced by the former that in some way trigger the expression of other genes. Moreover, determining whether an antifungal acts through (target-specific) toxicity or as cellular stressor can be difficult because cellular damage/dysfunctions can lead to similar cellular responses in both cases (Figure 2). These responses correspond to remediation/mitigation strategies such as metabolic modifications and involvement of the detoxification system (Morel et al., 2013), overexpression of the targeted protein in the case of toxicity, overexpression of many proteins in the case of chaotropicity-induced stress (Hallsworth et al., 2003), oxidative stress responses that can be triggered by both toxicity and stress, and synthesis of specific molecules (e.g., chaperones, kosmotropic molecules—see Box 1) in the case of stress generated by chaotropic or hydrophobic molecules (Cray et al., 2015). This is all the more complicated in the case of plant extracts that can contain both cellular stressors and toxic substances. Transcriptomic analyses of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* revealed the induction of genes coding for proteins belonging to several functional Clusters of Orthologous Groups (COG) categories in response to acetonic extracts of the heartwood of sessile oak, *Quercus petraea*. These oak extractives were a set of molecules mainly composed of hydrolysable tannin-derived molecules and flavanone derivatives and the COG categories of the induced genes were: energy production and conversion, secondary metabolism, post-translational modification, and protein turnover (Fernández-González et al., 2018). Similar types of cellular responses, attributed to the COG category 'energy production and conversion', were observed in P. chrysosporium grown in the presence of the chaotropes vanillic acid or benzoic acid (Matsuzaki et al., 2008; Shimizu et al., 2005). Global gene expression analysis also highlighted that modulation of the secondary metabolism is part of the response of various pathogenic fungi (including *Alternaria alternata* and aspergilli) to diverse substances such as eugenol, magnolol, gallic acid, resveratrol, and other (chaotropic/hydrophobic) compounds such as ethanol and cinnamaldehyde (Lv et al., 2018; Ren et al., 2020; Wang et al., 2015, 2019, 2020; Zhao, Zhi, et al., 2018). However, it is difficult to decipher whether this pathway is specifically targeted by these antifungal compounds or modified/regulated as a consequence of stress. Transcriptomics is thus a useful approach to study the physiological responses of a fungus to antifungal compounds. This said, identifying molecular (intracellular) targets of antifungals is difficult using gene expression regulation alone.

CHEMOPROTEOMICS TO IDENTIFY WHICH PROTEINS ARE TARGETTED BY AN ANTIFUNGAL COMPOUND

Chemoproteomics has emerged as a key type of approach for the determination of the modes-of-action of antifungal compounds by identifying their cellular targets (Box 1; Figure 4; Conway et al., 2021; Drewes & Knapp, 2018; Lenz et al., 2011). Chemoproteomics is an umbrella term to describe techniques that analyse protein-small molecule interactions on a proteome-wide scale. These techniques include affinity-based target identification, that is used to probe structural aspects of protein-small molecule interactions, and activity-based protein profiling that uses specially designed probes (that form a covalent bond with an enzyme's active site) and was developed to monitor the availability of active sites to their endogenous ligands (Adam et al., 2002; Geoghegan & Johnson, 2010; Meux et al., 2013; Tsuboi et al., 2011) (Figure 4). Affinity-based target identification, techniques such as limited proteolysis, thermal proteome profiling, or photoaffinity labelling are used—in conjunction with mass spectrometry—as high-throughput methods to provide low-resolution structural information of non-covalent natural product-protein complexes (Figure 4A) (Cheng et al., 2010). Chemoproteomics was developed for (and has thus-far been primarily used for) drug discovery against cancer cells, with few examples of its use to determine the modes-of-action of antifungals. One of them concerns the ascomycete *Paracoccidioides brasiliensis* that is a human pathogen (Campos et al., 2008; Ferreira

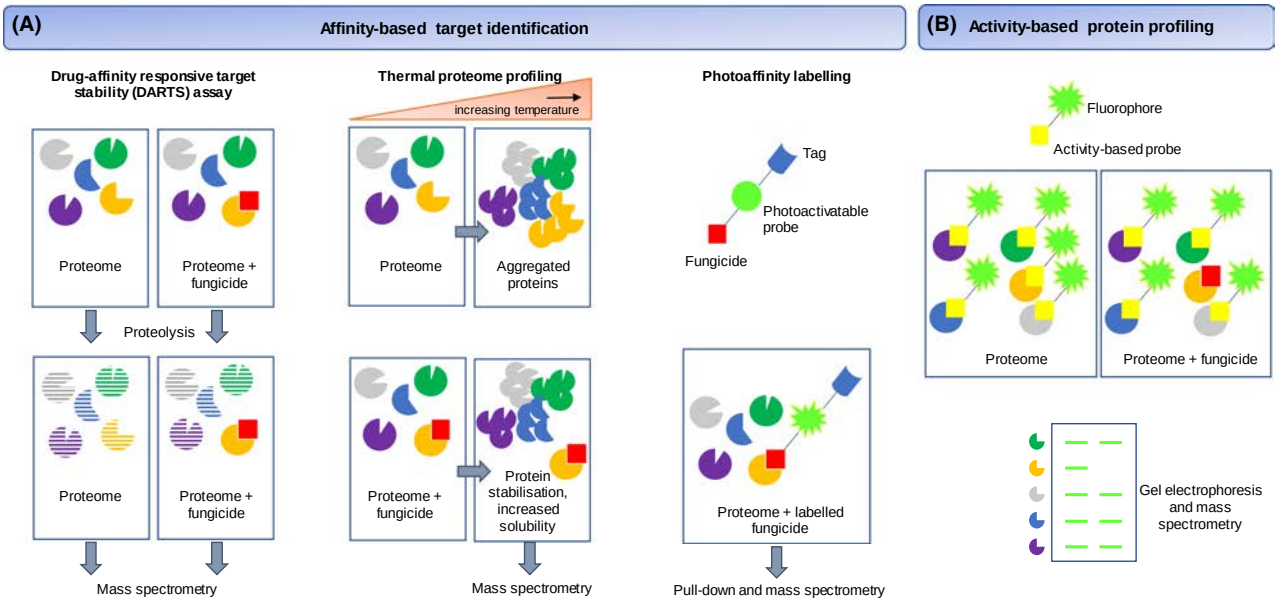


FIGURE 4 Examples of methods used for chemoproteomics. (A) The affinity-based target identification methods are used to compare the stability of proteins upon binding by a ligand (drug-affinity responsive target stability (DARTS) assay) or increased solubility (thermal proteome profiling) and identifying the stabilised proteins by mass spectrometry. In the photoaffinity labelling method, the ligand contains a cross-linking group, which is activated, often with light, labelling the target protein. The presence of a tag allows the labelled (target) protein to be isolated from within proteome by pull-down assay for a definitive identification using mass spectrometry. (B) Activity-based protein profiling uses fluorescent chemical probes to covalently label functional sites of proteins, thus labelling the proteins. Any ligand that physically interacts with a protein could prevent the binding of the probe so, in such cases, no fluorescence is detected. For coloured circles (grey, blue, dark green, yellow, and purple), each colour represents a different protein of the proteome, and the segments that are missing from each circle reflect that each protein has a unique three-dimensional structure. The faded versions of the coloured circles correspond to proteins that have been digested via proteolysis.

et al., 2016). The chemoproteomics approach via affinity chromatography was used to explore the interactions between *P. brasiliensis* proteins and argentilactone, a plant metabolite isolated from Brazilian savannah bushmint *Hyptis ovalifolia* (do Carmo Silva et al., 2020). Most of the proteins that interact with argentilactone are involved in amino-acid metabolism, energy generation, or detoxification.

THE TARGET-BASED DRUG-DISCOVERY STRATEGY

Another way to identify inhibition of a target by a plant-derived compound is to select molecular candidates to be inhibited. The advantage of this (target-based) approach is that it focuses on molecular targets that are unique to fungi (targets not found in other organisms). The target-based drug-discovery strategy has been carried out on azole-resistant strains. Some pathogenic fungi overexpress efflux-pump genes of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily and major facilitator superfamily (MFS) resulting in a decrease in intracellular azole concentration and thus conferring resistance to azole fungicides. This has enabled the development of antifungal treatments that combine the use of azole fungicides and plant metabolites (such as thymol, carvacrol, vanillin, tetrandrine, and geraniol) able to inhibit the activity of these efflux pumps and/or causing their mislocalisation within the fungal cell (Ahmad et al., 2013; Saibabu et al., 2020; Singh et al., 2018; Zhang et al., 2009).

Tyrosinases have also been considered potential targets in fungi because they play roles in melanin biosynthesis and pathogenesis (Halaouli et al., 2006). By combining kinetic analysis, molecular docking, and statistical modelling for 44 molecules from the flavonoid family, the characteristics of flavonoid structures that inhibit the catalytic activity of tyrosinase were identified. These characteristics were the presence of hydroxyls at C3 and C7 positions of flavonoids, and the *O*- and *C*-glycosylation, methylation, and acetylation of OH groups (Jakimiuk et al., 2022). This target-based drug discovery strategy was also used to identify compounds that inhibit proteins of the ergosterol biosynthesis pathway, proteins involved in cell-wall construction, or those involved in signalling systems (Ahmad et al., 2010; Yoshimi et al., 2022).

A number of methods are available to study ligand binding onto a known protein target. These include thermal shift assay and affinity-based techniques. The thermal shift assay has been used for large-scale screening of interactions of hundreds of compounds and plant extracts with glutathione transferases, which are part

of the detoxification system of the cell (Barbier et al., 2020; Perrot et al., 2018). The 'ligand fishing' strategy, which is an umbrella term to describe affinity-based techniques, allows a ligand to be isolated from within an extract, using proteins as the bait. Affinity crystallography is an approach to isolate and elucidate the complete three-dimensional structures of low-abundance but high-affinity target ligands from partially fractionated natural product extracts. Solving the three-dimensional structure of the protein/compound complex allows both the identification of the compound and the localisation of its binding site on the protein (Aguda et al., 2016). For example, affinity crystallography revealed that among a partially purified wild-cherry (*Prunus avium*) extract, the flavonoid dihydrowogonin was retained at the substrate binding site (H-site) of the glutathione transferase GSTO3S of the basidiomycete *Trametes versicolor* (Schwartz et al., 2018). Affinity crystallography is an approach that isolates and elucidates the complete three-dimensional structures of high-affinity but low-abundance target ligands from partially fractionated natural product extracts. This method is not suitable for working with several proteins at the same time and requires the empirical determination of optimal conditions to induce the crystallisation of proteins. However, advances in robotics and automation systems have made the processes of crystallisation and X-ray data collection more efficient.

We believe that the target-based drug discovery strategy has the advantages of being easier to execute and faster than other phenotypic approaches. However, antifungals may act on more than one target protein and a recombinant approach carried out in vitro may not represent the situation in vivo where so many proteins and other substances exist and so many interactions/reactions between them can occur.

CONCLUDING REMARKS

Deciphering the modes-of-action of antifungals is in some cases straightforward, but in other cases complex, sometimes due to the diversity of the cellular damage caused and the diversity of responses implemented by fungi to detoxify or expel the compound and/or limit stress-induced damage. This is even more challenging in non-model fungi, for which genetic tools and mutant libraries are not yet available. The use of random mutagenesis combined with next-generation sequencing, or the development of new bioinformatic approaches to predict protein-ligand binding sites, are two promising ways to try to surmount this challenge (Lin et al., 2020; Nakazawa et al., 2017; Piazza et al., 2020; Xu, Ao, et al., 2022). To validate the results of each of these methodologies, effective means of genetic manipulation to make mutant libraries in filamentous fungi must be available to the research community. This will help speed up the discovery and subsequent use of new natural compounds as antifungal agents and benefit to the development of combinatory therapy, as already demonstrated for the antitumour drug ponatinib[1] and the antifungal fluconazole that exhibit synergetic activities against fungal pathogens of humans (Liu et al., 2022).

A number of key scientific questions remain outstanding in relation to the modes-of-action of antifungal compounds. Importantly, how can knowledge of antifungal modes-of-action be most effectively applied towards the United Nations Sustainable Development Goals? For example, how to produce inexpensive, safe, effective antifungal treatments for pre- and post-harvest use and timber preservation in relation to SDGs 1, 2, 6, and 11; what fungicides can be developed with a high specificity to target taxa (negligible activity against non-target organisms) and a short half-life to avoid residues that remain in foods (so do not impact human health—SDG 3) (e.g., MagalhÃes et al., 2023), if antifungals destabilise the dynamics of resource sharing within microbial communities (Timmis et al., 2023) how does this impact fermented foods, biofuel fermentations, soil health, etc (SDGs 2, 9, 12, and 13); feedstock for use in biofuel fermentations (so do not inhibit yeast used for ethanol production—SDGs 7 and 12) or soils (so do not impact soil health—SDG 15); and how can policy-makers minimise the risk of fungicide-induced emergence of human pathogens (SDGs 3, 6, and 13)?

Finally, we believe that further research is also needed to determine what types of antifungals belong to the *toxin-stressors* category other than photosensitisers, and how determinations of modes-of-action can be made more-efficient for basidiomycete fungi or other taxa for which genetic screenings are not applicable.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Mélanie Morel-Rouhier: Conceptualization (equal); investigation (equal); supervision (equal); validation (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Delphine Noel:** Investigation (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **John E. Hallsworth:** Conceptualization (equal); Investigation (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Eric Gelhaye:** Investigation (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Sylvain Darnet:** Investigation (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Rodnay Sormani:** Investigation (equal); supervision (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal).

ACKNOWLEDGEMENTS

Useful discussion was provided by Gilberto Ú.L. Braga and Guilherme T.P. Brancini (Universidade de São Paulo, Brazil) and Kenneth Timmis (Technical

[1]The systematic name of ponatinib is 3-(2-imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methyl-N-[4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl] benzamide.

University Braunschweig, Germany). We thank the French National Research Agency (ANR) for funding: ANR-18-CE04-0012 and ANR-11-LABX-0002-01 (Lab. of Excellence ARBRE).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Delphine Noel https://orcid.org/0009-0000-7266-0217
John E. Hallsworth https://orcid.org/0000-0001-6797-9362
Eric Gelhaye https://orcid.org/0000-0002-0699-9113
Sylvain Darnet https://orcid.org/0000-0001-6351-0903
Rodnay Sormani https://orcid.org/0000-0002-0939-8639
Mélanie Morel-Rouhier https://orcid.org/0000-0001-5149-0474

REFERENCES

Adam, G.C., Sorensen, E.J. & Cravatt, B.F. (2002) Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype. *Nature Biotechnology*, 20, 805–809.

Aguda, A.H., Lavallee, V., Cheng, P., Bott, T.M., Meimetis, L.G., Law, S. et al. (2016) Affinity crystallography: A new approach to extracting high-affinity enzyme inhibitors from natural extracts. *Journal of Natural Products*, 79, 1962–1970.

Ahmad, A., Khan, A. & Manzoor, N. (2013) Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 80–86.

Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N. & Khan, L.A. (2010) Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, 48, 35–41.

Albertini, C., Gredt, M. & Leroux, P. (1999) Mutations of the β-tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64, 17–31.

Alves, F.L., Stevenson, A., Baxter, E., Gillion, J.L.M., Hejazi, F., Morrison, I.E. et al. (2015) Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: Compatible solutes determine the biotic window. *Current Genetics*, 61, 457–477.

Anand, S., Hallsworth, J.E., Timmis, J., Verstraete, W., Casadevall, A., Ramos, J.L. et al. (2023) Weaponising microbes for peace. *Microbial Biotechnology* (in press).

Ball, P. & Hallsworth, J.E. (2015) Water structure and chaotropicity: Their uses, abuses and biological implications. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17, 8297–8305.

Bang, K.H., Lee, D.W., Park, H.M. & Rhee, Y.H. (2000) Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by *trans*-cinnamaldehyde. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 1061–1063.

Barbier, M., Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Dumarçay, S., Gérardin, P. et al. (2020) Glutathione transferases: Surrogate targets for discovering biologically active compounds. *Journal of Natural Products*, 83, 2960–2966.

Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M. & Parr-Dobrzanski, B. (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58, 649–662.

Benison, K.C., O'Neill, W.K., Blain, D. & Hallsworth, J.E. (2021) Water activities of acid brine lakes approach the limit for life. *Astrobiology*, 21, 729–740.

Bhaganna, P., Volkers, R.J.M., Bell, A.N.W., Kluge, K., Timson, D.J., McGrath, J.W. et al. (2010) Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. *Microbial Biotechnology*, 3, 701–716.

Bhargava, P. & Srivastava, A. (2013) Salt toxicity and survival strategies of cyanobacteria. In: Srivastava, A.K., Rai, A.N. & Neilan, B.A. (Eds.) *Stress biology of cyanobacteria*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 171–182.

Braga, G.Ú.L., Silva-Junior, G.J., Brancini, G.T.P., Hallsworth, J.E. & Wainwright, M. (2022) Photoantimicrobials in agriculture. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 235, 112548.

Brandriss, M.C. (1979) Isolation and preliminary characterization of *Saccharomyces cerevisiae* proline auxotrophs. *Journal of Bacteriology*, 138, 816–822.

Campos, C.B., Di Benedette, J.P., Morais, F.V., Ovalle, R. & Nobrega, M.P. (2008) Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryotic Cell*, 7, 1856–1864.

Casadevall, A., Kontoyiannis, D.P. & Robert, V. (2019) On the emergence of *Candida auris*: Climate change, azoles, swamps, and birds. *MBio*, 10, e01397-19.

Cavicchioli, R., Ripple, W.J., Timmis, K.N., Azam, F., Bakken, L.R., Baylis, M. et al. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 569–586.

Cheng, K.W., Wong, C.C., Wang, M., He, Q.Y. & Chen, F. (2010) Identification and characterization of molecular targets of natural products by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 126–155.

Chin, J.P., Megaw, J., Magill, C.L., Nowotarski, K., Williams, J.P., Bhaganna, P. et al. (2010) Solutes determine the temperature windows for microbial survival and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 7835–7840.

Conway, L.P., Li, W. & Parker, C.G. (2021) Chemoproteomic-enabled phenotypic screening. *Cell Chemical Biology*, 28, 371–393.

Corkley, I., Fraaije, B.A. & Hawkins, N.J. (2021) Fungicide resistance management: maximising the effective life of plant protection products. *Plant Pathology*, 71, 150–169.

Crabtree, G.R. (2001) Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 2313–2316.

Cray, J.A., Bell, A.N.W., Bhaganna, P., Mswaka, A.Y., Timson, D.J. & Hallsworth, J.E. (2013) The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microbial Biotechnology*, 6, 453–492.

Cray, J.A., Bhaganna, P., Singhal, R.S., Patil, S.V., Saha, D., Chakraborty, R. et al. (2014) Chaotropic and hydrophobic stress mechanisms of antifungal substances. In: Dehne, H.W., Deising, H.B., Fraaije, B., Gisi, U., Hermann, D., Mehl, A. et al. (Eds.) *Modern fungicides and antifungal compounds*, Vol. 7. Braunschweig: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, pp. 73–80.

Cray, J.A., Russell, J.T., Timson, D.J., Singhal, R.S. & Hallsworth, J.E. (2013) A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environmental Microbiology*, 15, 287–296.

Cray, J.A., Stevenson, A., Ball, P., Bankar, S.B., Eleutherio, E.C., Ezeji, T.C. et al. (2015) Chaotropicity: A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 228–259.

da Nóbrega Alves, D., Monteiro, A.F.M., Andrade, P.N., Lazarini, J.G., Abílio, G.M.F., Guerra, F.Q.S. et al. (2020) Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. *Molecules*, 25, 5969.

Darnet, S., Blary, A., Chevalier, Q. & Schaller, H. (2021) Phytosterol profiles, genomes and enzymes – An overview. *Frontiers in Plant Science*, 12, 665206.

Darnet, S. & Schaller, H. (2019) Metabolism and biological activities of 4-methyl-sterols. *Molecules*, 24, 451.

do Carmo Silva, L., de Oliveira, A.A., de Souza, D.R., Barbosa, K.L.B., Freitas e Silva, K.S., Carvalho Júnior, M.A.B. et al. (2020) Overview of antifungal drugs against Paracoccidioidomycosis: How do we start, where are we, and where are we going? *Journal of Fungi*, 6, 300.

Dorsaz, S., Snäkä, T., Favre-Godal, Q., Maudens, P., Boulens, N., Furrer, P. et al. (2017) Identification and mode of action of a plant natural product targeting human fungal pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e00829-17.

Drewes, G. & Knapp, S. (2018) Chemoproteomics and chemical probes for target discovery. *Trends in Biotechnology*, 36, 1275–1286.

Feng, M., Jin, Y., Yang, S., Joachim, A.M., Ning, Y., Mori-Quiroz, L.M. et al. (2022) Sterol profiling of *Leishmania* parasites using a new HPLC-tandem mass spectrometry-based method and antifungal azoles as chemical probes reveals a key intermediate sterol that supports a branched ergosterol biosynthetic pathway. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 20, 27–42.

Fernández-González, A.J., Valette, N., Kohler, A., Dumarçay, S., Sormani, R., Gelhaye, E. et al. (2018) Oak extractive-induced stress reveals the involvement of new enzymes in the early detoxification response of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Microbiology*, 20, 3890–3901.

Ferreira, I., Ferreira-Strixino, J., Castilho, M.L., Campos, C.B., Tellez, C. & Raniero, L. (2016) Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 397–403.

Ferrer, M., Chernikova, T.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N. & Timmis, K.N. (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology*, 21, 1266–1267.

Fincham, J.R. (1989) Transformation in fungi. *Microbiological Reviews*, 53, 148–170.

Gao, T., Zhang, Y., Shi, J., Mohamed, S.R., Xu, J. & Liu, X. (2021) The antioxidant guaiacol exerts fungicidal activity against fungal growth and deoxynivalenol production in *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 762844.

García, R., Botet, J., Rodríguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Ribas, J.C., Revuelta, J.L. et al. (2015) Genomic profiling of fungal cell wall-interfering compounds: Identification of a common gene signature. *BMC Genomics*, 16, 683.

Garcia-Solache, M.A. & Casadevall, A. (2010) Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *MBio*, 1, e00061-10.

Garduño-Rosales, M., Callejas-Negrete, O.A., Medina-Castellanos, E., Bartnicki-García, S., Herrera-Estrella, A. & Mouriño-Pérez, R.R. (2022) F-actin dynamics following mechanical injury of *Trichoderma atroviride* and *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology*, 159, 103672.

Geoghegan, K.F. & Johnson, D.S. (2010) Chapter 21—Chemical proteomic technologies for drug target identification. In: Macor, J.E. (Ed.) *Annual reports in medicinal chemistry*, Vol. 45. Cambridge, MA: Academic Press, pp. 345–360.

Giaever, G., Flaherty, P., Kumm, J., Proctor, M., Nislow, C., Jaramillo, D.F. et al. (2004) Chemogenomic profiling: Identifying the functional interactions of small molecules in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 793–798.

Giaever, G., Shoemaker, D.D., Jones, T.W., Liang, H., Winzeler, E.A., Astromoff, A. et al. (1999) Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nature Genetics*, 21, 278–283.

Giannousi, K., Menelaou, M., Arvanitidis, J., Angelakeris, M., Pantazakic, A. & Dendrinou-Samara, C. (2015) Hetero-nanocomposites of magnetic and antifungal nanoparticles as a platform for magnetomechanical stress induction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 5341–5351.

Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M. & Lomascolo, A. (2006) Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 219–232.

Hallsworth, J.E. (1998) Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85, 125–137.

Hallsworth, J.E. (2018) Stress-free microbes lack vitality. *Fungal Biology*, 122, 379–385.

Hallsworth, J.E., Heim, S. & Timmis, K.N. (2003) Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 5, 1270–1280.

Hallsworth, J. E. & Nomura, Y. (1999) A simple method to determine the water activity of ethanol-containing samples. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(2), 242–245.

Hallsworth, J.E., Udaondo, Z., Pedrós-Alió, C., Höfer, J., Benison, K.C., Lloyd, K.G. et al. (2023) Scientific novelty beyond the experiment. *Microbial Biotechnology* (in press). https://doi.org/10.1111/1751-7915.14222"10.1111/1751-7915.14222

Hallsworth, J.E., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Gillion, J.L.M., D'Auria, G., Alves, F.L. et al. (2007) Limits of life in $MgCl_2$-containing environments: Chaotropicity defines the window. *Environmental Microbiology*, 9, 803–813.

Hay, R.J. (2011) Malassezia, dandruff and seborrhoeic dermatitis: an overview. *The British Journal of Dermatology*, 165, 2–8.

Ho, H.L. & Ho, K.F. (2015) Fungal strain improvement of *Aspergillus brasiliensis* for overproduction of xylanase in submerged fermentation through UV irradiation and chemicals mutagenesis. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 3, 117–131.

Hoepfner, D., Helliwell, S.B., Sadlish, H., Schuierer, S., Filipuzzi, I., Brachat, S. et al. (2014) High-resolution chemical dissection of a model eukaryote reveals targets, pathways and gene functions. *Microbiological Research*, 169, 107–120.

Huang, F., Kong, J., Ju, J., Zhang, Y., Guo, Y., Cheng, Y. et al. (2019) Membrane damage mechanism contributes to inhibition of trans-cinnamaldehyde on *Penicillium italicum* using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). *Scientific Reports*, 9, 490.

Jakimiuk, K., Sari, S., Milewski, R., Supuran, C.T., Şöhretoğlu, D. & Tomczyk, M. (2022) Flavonoids as tyrosinase inhibitors in *in silico* and *in vitro* models: basic framework of SAR using a statistical modelling approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37, 421–430.

Jones, M., Mautner, A., Luenco, S., Bismarck, B. & John, S. (2020) Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review. *Materials and Design*, 187, 108397.

Jordá, T., Martínez-Martín, A., Martínez-Pastor, M.T. & Puig, S. (2022) Modulation of yeast Erg1 expression and terbinafine susceptibility by iron bioavailability. *Microbial Biotechnology*, 15, 2705–2716.

Jorda, T. & Puig, S. (2020) Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel)*, 11, 795.

Kelly, R., Card, D., Register, E., Mazur, P., Kelly, T., Tanaka, K.I. et al. (2000) Geranylgeranyltransferase I of *Candida albicans*: Null mutants or enzyme inhibitors produce unexpected phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 182, 704–713.

Kespohl, S., Riebesehl, J., Grüner, J. & Raulf, M. (2022) Impact of climate change on wood and woodworkers–*Cryptostroma corticale* (sooty bark disease): A risk factor for trees and exposed employees. *Frontiers in Public Health*, 10, 973686.

Kubinyi, H. (2006) Chemogenomics in drug discovery. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 58, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37635-4_1

Kubo, K., Itto-Nakama, K., Ohnuki, S., Yashiroda, Y., Li, S.C., Kimura, H. et al. (2022) Jerveratrum-type steroidal alkaloids inhibit

β-1,6-glucan biosynthesis in fungal cell walls. *Microbiology Spectrum*, 10, e0087321.
Landrigan, P.J., Stegeman, J.J., Fleming, L.E., Allemand, D., Anderson, D.M., Backer, L.C. et al. (2020) Human health and ocean pollution. *Annals of Global Health*, 86, 151.
Larsson, D.G.J. & Flach, C.F. (2022) Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews. Microbiology*, 20, 257–269.
Lenz, T., Fischer, J.J. & Dreger, M. (2011) Probing small molecule–protein interactions: A new perspective for functional proteomics. *Journal of Proteomics*, 75, 100–115.
Li, Y., Hu, B., Wang, Z., He, J., Zhang, Y., Wang, J. et al. (2021) Identification of pyruvate dehydrogenase E1 as a potential target against *Magnaporthe oryzae* through experimental and theoretical investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 5163.
Lin, X., Li, X. & Lin, X. (2020) A Review on applications of computational methods in drug screening and design. *Molecules*, 25, 1375.
Little, J.G. & Haynes, R.H. (1979) Isolation and characterization of yeast mutants auxotrophic for 2′-deoxythymidine 5′-monophosphate. *Molecular & General Genetics*, 168, 141–151.
Liu, L., Jiang, T., Zhou, J., Mei, Y., Li, J., Tan, J. et al. (2022) Repurposing the FDA-approved anticancer agent ponatinib as a fluconazole potentiator by suppression of multidrug efflux and Pma1 expression in a broad spectrum of yeast species. *Microbial Biotechnology*, 15, 482–498.
Lu, H., Li, W., Whiteway, M., Wang, H., Zhu, S., Ji, Z. et al. (2022) A small molecule inhibitor of Erg251 makes fluconazole fungicidal by inhibiting the synthesis of the 14α-methylsterols. *mBio*, e0263922.
Lv, C., Wang, P., Ma, L., Zheng, M., Liu, Y. & Xing, F. (2018) Large-scale comparative analysis of eugenol-induced/repressed genes expression in *Aspergillus flavus* using RNA-seq. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1116.
MagalhÃes, R.S.S., dos Santos, R.M., and Eleutherio, E.C.A. (2023) Trehalose biosynthesis: Neutralizing fungal menace by attacking its Achilles heel. In: *The Book of Fungal Pathogens* (Eds. - André Luis Souza dos Santos, Marta Helena Branquinha, Lucimar Ferreira Kneipp, and Maryam Roudbary). Editora Nova Science Publishers: New York.
Matsuzaki, F., Shimizu, M. & Wariishi, H. (2008) Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid. *Journal of Proteome Research*, 7, 2342–2350.
McCammick, E.M., Gomase, V.S., McGenity, T.J., Timson, D.J. & Hallsworth, J.E. (2010) Water-hydrophobic compound interactions with the microbial cell. In: Timmis, K.N. (Ed.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 1451–1466.
McGenity, T.J., Gessesse, A., Hallsworth, J.E., Garcia Cela, E., Verheecke-Vaessen, C., Wang, F. et al. (2020) Visualizing the invisible: class excursions to ignite children's enthusiasm for microbes. *Microbial Biotechnology*, 13, 844–887.
Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gérardin, P., Jacquot, J.-P., Dumarçay, S. et al. (2013) New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. *Biochimie*, 95, 336–346.
Mogg, C., Bonner, C., Wang, L., Schernthaner, J., Smith, M., Desveaux, D. et al. (2019) Genomic identification of the TOR signaling pathway as a target of the plant alkaloid antofine in the phytopathogen *Fusarium graminearum*. *MBio*, 10, e00792-19.
Mohid, S.A., Biswas, K., Won, T., Mallela, L.S., Gucchait, A., Butzke, L. et al. (2022) Structural insights into the interaction of antifungal peptides and ergosterol containing fungal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1864, 183996.
Mokhtari, M., Jackson, M.D., Brown, A.S., Ackerley, D.F., Ritson, N.J., Keyzers, R.A. et al. (2018) Bioactivity-guided metabolite profiling of feijoa (*Acca sellowiana*) cultivars identifies 4-cyclopentene-1,3-dione as a potent antifungal inhibitor of chitin synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 5531–5539.
Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L. et al. (2013) Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microbial Biotechnology*, 6, 248–263.
Moriarty, T., Leggat, W., Hugett, M.J. & Ainsworth, T.D. (2020) Coral disease causes, consequences, and risk within coral restoration. *Trends in Microbiology*, 28, 793–807.
Mshana, S.E., Sindato, C., Matee, M.I. & Mboera, L.E.G. (2021) Antimicrobial use and resistance in agriculture and food production systems in Africa: A systematic review. *Antibiotics (Basel)*, 10, 976.
Müller, C., Binder, U., Bracher, F. & Giera, M. (2017) Antifungal drug testing by combining minimal inhibitory concentration testing with target identification by gas chromatography—mass spectrometry. *Nature Protocols*, 12, 947–963.
Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H. et al. (1998) Isolation of *CaSLN1* and *CaNIK1*, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*, 144, 425–432.
Nakazawa, T., Izuno, A., Kodera, R., Miyazaki, Y., Sakamoto, M., Isagi, Y. et al. (2017) Identification of two mutations that cause defects in the ligninolytic system through an efficient forward genetics in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Environmental Microbiology*, 19, 261–272.
Ott, S.J., Kühbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A. et al. (2008) Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43, 831–841.
Paulussen, C., Hallsworth, J.E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W.C., Hamill, P.G., Blain, D. et al. (2017) Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 10, 296–322.
Perrot, T., Schwartz, M., Saiag, F., Salzet, G., Dumarçay, S., Favier, F. et al. (2018) Fungal glutathione transferases as tools to explore the chemical diversity of Amazonian wood extractives. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6, 13078–13085.
Piazza, I., Beaton, N., Bruderer, R., Knobloch, T., Barbisan, C., Chandat, L. et al. (2020) A machine learning-based chemoproteomic approach to identify drug targets and binding sites in complex proteomes. *Nature Communications*, 11, 4200.
Piotrowski, J.S., Okada, H., Lu, F., Li, S.C., Hinchman, L., Ranjan, A. et al. (2015) Plant-derived antifungal agent poacic acid targets β-1,3-glucan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 1490–1497.
Prescott, T.A.K., Jaeg, T. & Hoepfner, D. (2018) Yeast chemogenomic profiling reveals iron chelation to be the principle cell inhibitory mode of action of gossypol. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 7381–7386.
Prescott, T.A.K. & Panaretou, B. (2017) A mini HIP HOP assay uncovers a central role for copper and zinc in the antifungal mode of action of allicin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 3659–3664.
Prescott, T.A.K., Panaretou, B., Veitch, N.C. & Simmonds, M.S.J. (2014) A yeast chemical genetics approach identifies the compound 3,4,5-trimethoxybenzyl isothiocyanate as a calcineurin inhibitor. *FEBS Letters*, 588, 455–458.
Prescott, T.A.K., Rigby, L.P., Veitch, N.C. & Simmonds, M.S.J. (2014) The haploinsufficiency profile of α-hederin suggests a caspofungin-like antifungal mode of action. *Phytochemistry*, 101, 116–120.

Price, P.B. & Sowers, T. (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4631–4636.

Randazzo, C.L., Pitino, I., Ribbera, A. & Caggia, C. (2010) Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiology*, 27, 363–374.

Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. & Rao, R. (2010) Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 5062–5069.

Ren, Y., Jin, J., Zheng, M., Yang, Q. & Xing, F. (2020) Ethanol inhibits aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* by up-regulating oxidative stress-related genes. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2946.

Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A. et al. (2003) Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology*, 50, 167–181.

Sachs, J., Lafortune, G., Kroll, C., Fuller, G. & Woelm, F. (2022) *From crisis to sustainable development: the SDGs as roadmap to 2030 and beyond. Sustainable development report 2022*. Cambridge: Cambridge University Press.

Sagatova, A.A., Keniya, M.V., Wilson, R.K., Monk, B.C. & Tyndall, J.D.A. (2015) Structural insights into binding of the antifungal drug fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14α-demethylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 4982–4989.

Saibabu, V., Fatima, Z., Singh, S., Khan, L.A. & Hameed, S. (2020) Vanillin confers antifungal drug synergism in *Candida albicans* by impeding CaCdr2p driven efflux. *The Journal de Mycologie Médicale*, 30, 100921.

Santos, R., Stevenson, A., de Carvalho, C.C.C.R., Grant, I.R. & Hallsworth, J.E. (2015) Extraordinary solute-stress tolerance contributes to the environmental tenacity of mycobacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 7, 746–764.

Sarfraz, M., Nasim, M.J., Jacob, C. & Gruhlke, M.C.H. (2020) Efficacy of allicin against plant pathogenic fungi and unveiling the underlying mode of action employing yeast based chemogenetic profiling approach. *Applied Sciences*, 10, 7.

Schwartz, M., Perrot, T., Aubert, E., Dumarçay, S., Favier, F., Gérardin, P. et al. (2018) Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot *Trametes versicolor*. *Scientific Reports*, 8, 8472.

Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H. & Wariishi, H. (2005) Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. *Proteomics*, 5, 3919–3931.

Sierotzki, H. & Scalliet, G. (2013) A Review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, 103, 880–887.

Singh, S., Fatima, Z., Ahmad, K. & Hameed, S. (2018) Fungicidal action of geraniol against *Candida albicans* is potentiated by abrogated CaCdr1p drug efflux and fluconazole synergism. *PLoS ONE*, 13, e0203079.

Smith, D.F.Q. & Casadevall, A. (2022) Disaster microbiology—a new field of study. *MBio*, 13, e0168022.

Stevenson, A., Cray, J.A., Williams, J.P., Santos, R., Sahay, R., Neuenkirchen, N. et al. (2015) Is there a common water activity limit for the three domains of life? *The ISME Journal*, 9, 1333–1351.

Stevenson, A., Hamill, P.G., Medina, A., Kminek, G., Rummel, J.D., Dijksterhuis, J. et al. (2017) Glycerol enhances fungal germination at the water-activity limit for life. *Environmental Microbiology*, 19, 947–967.

Stevenson, A., Hamill, P.G., O'Kane, C.J., Kminek, G., Rummel, J.D., Voytek, M.A. et al. (2017) *Aspergillus penicillioides* differentiation and cell division at 0.585 water activity. *Environmental Microbiology*, 19, 687–697.

Stie, J. & Fox, D. (2008) Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryotic Cell*, 7, 177–186.

Suryawanshi, R.K., Patil, C.D., Koli, S.H., Hallsworth, J.E. & Patil, S.V. (2017) Antimicrobial activity of prodigiosin is attributable to plasma-membrane damage. *Natural Product Research*, 31, 572–577.

Szomek, M., Reinholdt, P., Walther, H.L., Scheidt, H.A., Müller, P., Obermaier, S. et al. (2022) Natamycin sequesters ergosterol and interferes with substrate transport by the lysine transporter Lyp1 from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1864, 184012.

Timmis, K. & Ramos, J.L. (2021) The soil crisis: the need to treat as a global health problem and the pivotal role of microbes in prophylaxis and therapy. *Microbial Biotechnology*, 14, 769–797.

Timmis, K., Timmis, J. & Jebok, F. (2020) The urgent need for microbiology literacy in society: children as educators. *Microbial Biotechnology*, 13, 1300–1303.

Timmis, K., Verstraete, W.H., Regina, V.R. & Hallsworth, J.E. (2023) The Pareto Principle: to what extent does it apply to the geno-/ecotype composition and functionality of stable microbial communities? *Environmental Microbiology* (in press).

Toh, T.H., Kayingo, G., van der Merwe, M.J., Kilian, S.G., Hallsworth, J.E., Hohmann, S. et al. (2001) Implications of *FPS1* deletion and membrane ergosterol content for glycerol efflux from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 1, 205–211.

Tsuboi, K., Bachovchin, D.A., Speers, A.E., Spicer, T.P., Fernandez-Vega, V., Hodder, P. et al. (2011) Potent and selective inhibitors of glutathione S-transferase omega 1 that impair cancer drug resistance. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 16605–16616.

Villalobos-Escobedo, J.M., Martínez-Hernández, J.P., Pelagio-Flores, R., González-De la Rosa, P.M., Carreras-Villaseñor, N., Abreu-Goodger, C. et al. (2022) *Trichoderma atroviride* hyphal regeneration and conidiation depend on cell-signaling processes regulated by a microRNA-like RNA. *Microbial Genomics*, 8, mgen000869.

Wang, H., Lei, Y., Yan, L., Cheng, K., Dai, X., Wan, L. et al. (2015) Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus flavus* in response to resveratrol. *BMC Microbiology*, 15, 182.

Wang, L., Wang, D., Yuan, S., Feng, X. & Wang, M. (2020) Transcriptomic insights into the antifungal effects of magnolol on the growth and mycotoxin production of *Alternaria alternata*. *Toxins*, 12, 665.

Wang, P., Ma, L., Jin, J., Zheng, M., Pan, L., Zhao, Y. et al. (2019) The anti-aflatoxigenic mechanism of cinnamaldehyde in *Aspergillus flavus*. *Scientific Reports*, 9, 10499.

Wang, R., Liu, J., Liu, Y., Lv, Q. & Yan, L. (2022) Application of the mutant libraries for *Candida albicans* functional genomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 12307.

Williams, J.P. & Hallsworth, J.E. (2009) Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? *Environmental Microbiology*, 11, 3292–3308.

Wright, M. H. & Sieber, S. A. (2016) Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. *Natural Product Reports*, 33(5), 681–708.

Xu, H., Nakazawa, T., Zhang, Y., Oh, M., Bao, D., Kawauchi, M. et al. (2022) Introducing multiple-gene mutations in *Pleurotus ostreatus* using a polycistronic tRNA and CRISPR guide RNA strategy. *FEMS Microbiology Letters*, 369, fnac102.

Xu, Y., Ao, K., Tian, L., Qiu, Y., Huang, X., Liu, X. et al. (2022) A forward genetic screen in *Sclerotinia sclerotiorum* revealed the transcriptional regulation of its sclerotial melanization pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35, 244–256.

Xue, A., Robbins, N. & Cowen, L.E. (2020) Advances in fungal chemical genomics for the discovery of new antifungal agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1496, 5–22.

Yamagishi, K., Kimura, T., Oita, S., Sugiura, T. & Hirai, H. (2007) Transformation by complementation of a uracil auxotroph of the hyper lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1079–1091.

Yang, J., Chen, Y.-Z., Yu-Xuan, W., Tao, L., Zhang, Y.-D., Wang, S.-R. et al. (2021) Inhibitory effects and mechanisms of vanillin on gray mold and black rot of cherry tomatoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 175, 104859.

Yoshimi, A., Miyazawa, K., Kawauchi, M. & Abe, K. (2022) Cell wall integrity and its industrial applications in filamentous fungi. *Journal of Fungi*, 8, 435.

Zhang, H., Gao, A., Li, F., Zhang, G., Ho, H.I. & Liao, W. (2009) Mechanism of action of tetrandrine, a natural inhibitor of *Candida albicans* drug efflux pumps. *Yakugaku Zasshi*, 129, 623–630.

Zhang, Y., Li, Q., Wang, C. & Liu, S. (2022) Transcriptomic and metabolomic analyses reveal the antifungal mechanism of the compound phenazine-1-carboxamide on *Rhizoctonia solani* AG1IA. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1041733.

Zhao, L.H., Ma, Q.Q., Nie, F., Chen, W. & Sun, H.J. (2018) Increasing laccase activity of white rot fungi by mutagenesis and treating papermaking wastewater. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 191, 012053.

Zhao, X., Zhi, Q.Q., Li, J.Y., Keller, N.P. & He, Z.M. (2018) The antioxidant gallic acid inhibits aflatoxin formation in *Aspergillus flavus* by modulating transcription factors FarB and CreA. *Toxins*, 10, 270.

Zimmermann, A., Hofer, S., Pendl, T., Kainz, K., Madeo, F. & Carmona-Gutierrez, D. (2018) Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. *FEMS Yeast Research*, 18, foy020.

Zubrod, J.P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C.A., Imfeld, G., Knäbel, A. et al. (2019) Fungicides: An overlooked pesticide class? *Environmental Science & Technology*, 53, 3347–3365.

How to cite this article: Noel, D., Hallsworth, J.E., Gelhaye, E., Darnet, S., Sormani, R. & Morel-Rouhier, M. (2023) Modes-of-action of antifungal compounds: Stressors and (target-site-specific) toxins, toxicants, or *toxin–stressors*. *Microbial Biotechnology*, 16, 1438–1455. Available from: https://doi.org/10.1111/1751-7915.14242

4. Détoxication des composés antifongiques issus du bois

Lors de la dégradation du bois, les champignons sont exposés à une variété de composés aromatiques, incluant des produits issus de la dégradation de la lignocellulose et des extractibles. La libération de ces composés aromatiques altère la croissance des champignons et requiert ainsi la mise en place d'un système de détoxication. Ce système permet de convertir les composés aromatiques toxiques en composés moins toxiques et a été défini comme le « Xénome ». Il comprend notamment trois phases : (1) une activation de la molécule par un processus d'oxydation, (2) une étape de conjugaison et (3) le stockage ou l'excrétion du composé conjugué (Fig. 38) (Morel *et al.*, 2013).

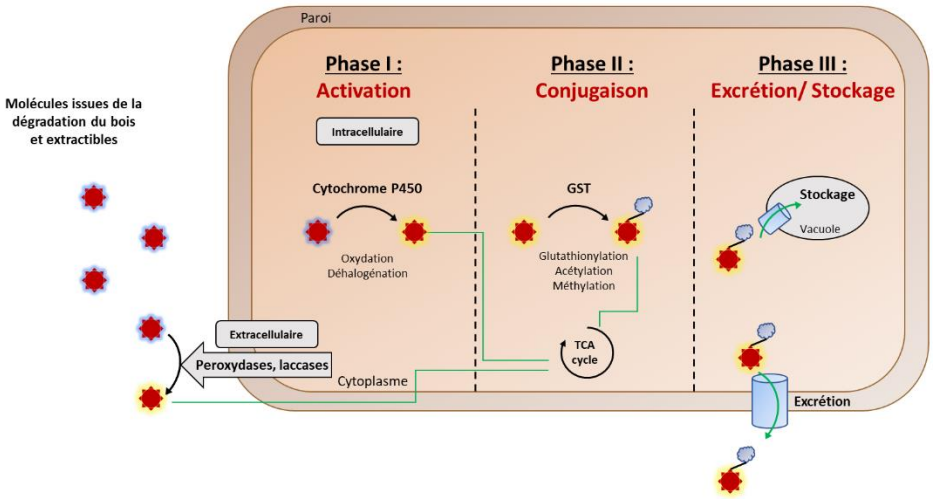


Figure 38. Système de détoxication chez les champignons : le Xénome. Ce système se compose de 3 phases telles que (1) Une phase d'activation de la molécule par l'action de peroxydase et laccase dans le milieu extracellulaire ou par l'action de cytochrome P450 dans le milieu intracellulaire, (2) Une phase de conjugaison où un groupement est ajouté à la molécule (ex : ajout d'un groupement glutathion par l'action de GST), et (3) La phase d'excrétion ou de stockage des composés médiée par l'action de transporteurs ABC et MFS. Ces composés peuvent également être catabolisés davantage et apparaissent incorporés dans le cycle de l'acide tricarboxylique à plusieurs points d'entrée (acetyl-CoA, succinyl-CoA et pyruvate) (adapté de Del Cerro *et al.* 2021; Morel *et al.* 2013).

La phase d'activation peut se dérouler par le biais de deux systèmes, système extracellulaire ou intracellulaire, et est impliquée dans la conversion des composés aromatiques via différentes réactions (ex : oxydation, hydroxylation, époxydation).

Système extracellulaire

Les systèmes extracellulaires responsables de la modification des composés aromatiques du bois impliquent un ensemble d'enzymes oxydatives (peroxydases de type II et laccases) et des radicaux hydroxyles issus de la réaction de Fenton. Ces différents systèmes permettent la libération d'une variété

de composés aromatiques. La modification de ces composés a été observée avec des laccases et des peroxydases. Par exemple, ces enzymes sont capables d'oxyder les acides hydroxycinnamiques et les dérivés d'alcool hydroxycinnamyl (Takahama, 1995). De plus, les laccases catalysent l'oxydation de nombreux composés tels que la catéchine, le guaïacol, l'acide férulique et le catéchol (Martínková *et al.*, 2016).

Système intracellulaire

Le système intracellulaire est principalement représenté par la famille des cytochromes P450 monooxygénases (CytP450). Ces enzymes sont des monooxygénases à hème qui catalysent de nombreuses réactions impliquées dans la conversion de molécules aromatiques, alicycliques et aliphatiques (ex : hydroxylation, époxydation, dealkylation) (Sono *et al.*, 1996). Chez les Basidiomycètes, le nombre d'isoformes inclus dans la famille des cytochromes P450 varie largement (de 4 à 250) et a été corrélé à la capacité des champignons à métaboliser et minéraliser les composés aromatiques provenant de la dégradation du bois (Morel *et al.*, 2013). Par exemple, 154 gènes codant pour des cytochromes P450 ont été identifiés chez *P. chrysosporium*, représentant 1 % de la partie codante de son génome (Doddapaneni *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2004). Chez *P. chrysosporium*, plusieurs cytochromes P450 sont impliqués dans l'oxydation des composés aromatiques issus de la dégradation du bois et des composés polyaromatiques. Par exemple, les cytochromes P450 PcCYP50c et PcCYP142c catalysent des réactions d'hydroxylation et de O-deethylation sur des molécules de flavone et 7-ethoxycoumarin respectivement (Kasai *et al.*, 2010). Egalement, la protéine PcCYP65a2 catalyse une réaction d'hydroxylation sur la molécule naringénine résultant en ériodictyol et métabolise des composés polyaromatiques tels que le dibenzo-p-dioxin (DD), 2-monochloroDD, biphényle, et le naphthalène (Kasai *et al.*, 2009). Chez plusieurs Basidiomycètes (ex : *P. chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *P. placenta*, *Serpula lacrymans*), des cytochromes P450 sont capables d'oxyder différents substrats aromatiques (extractibles, hydrocarbures, composés pharmaceutiques et stéroïdes) (Fig. 39) (Syed *et al.*, 2014).

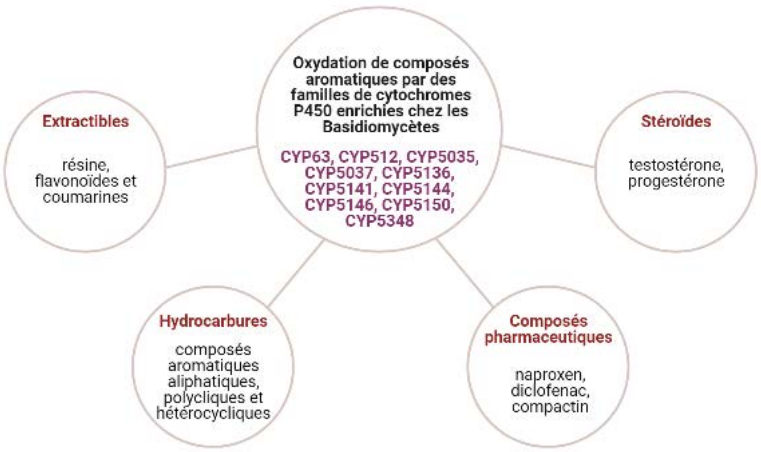


Figure 39. Enrichissement de plusieurs familles de cytochromes p450 chez des champignons Basidiomycètes dégradeurs de bois (ex : *P. chrysosporium*, *Ganoderma lucidum*, *Postia placenta*, *Serpula lacrymans*) et spécificités d'oxydation associées à des composés aromatiques (adapté de Syed *et al.* 2014).

La phase de conjugaison

Après la phase d'activation, des enzymes de conjugaison interviennent pour catalyser l'ajout de groupements sur ces composés ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de diminuer leur réactivité et toxicité (Morel *et al.*, 2013). Différents types de conjugués peuvent être ajoutés à ces molécules comme par un exemple un sucre (glucoside, xyloside ou glucuronide), un groupement sulfate, glutathion, acétyl ou encore méthyl via l'action de différentes enzymes (Morel *et al.*, 2013).

Des réactions de glycosylation ont été observées chez plusieurs champignons. Cette étape est catalysée par des enzymes appartenant à la famille des glycosyl transférases. Ces réactions ont été mises en évidence avec différents composés appartenant à la famille des flavonoïdes (Sordon *et al.*, 2016). Par exemple, le composé xanthohumol est converti en xanthohumol 4'-*O*-β-D-glucopyranoside par les souches *Absidia coerulea AM93* et *Rhizopus nigricans UPF701* (Sordon *et al.*, 2016). Le flavonoïde quercétine est converti également en quercétine 4'-*O*-méthyl-7-*O*-β-D-glucopyranoside par la souche *Beauveria bassiana ATCC 7159* (Zhan et Leslie Gunatilaka, 2006).

Les enzymes de la superfamille des glutathion transférases (GST) catalyseraient, elles, l'ajout de glutathion au composé aromatique. Différents résultats soutiennent cette hypothèse. Le nombre de gènes codant des GST est particulièrement important chez les champignons dégradeurs de bois par rapport aux champignons pathogènes et symbiotiques. Parmi ces GST, 3 classes sont particulièrement enrichies : les Ure2p, les GSTO et les GSTFuA. Par exemple, *P. chrysosporium* présente 5 isoformes dans la classe GSTFuA, 9 isoformes dans la classe Ure2p et 6 dans la classe GSTO, en comparaison à l'espèce *Melampsora larici-populina* qui contient uniquement 4 isoformes dans la classe Ure2p (Morel *et al.*,

2013). Ces GST interagissent avec de nombreux extractibles et ces interactions sont spécifiques à la fois du type de GST et de la composition chimique des extractibles (Fig. 40) (Deroy *et al.*, 2015; Perrot *et al.*, 2020). Par exemple, 6 GSTOs de *T. versicolor* et 5 Ure2ps de *P. chrysosporium* interagissent avec l'acide gallique, l'épicathéchine et la quercétine (Deroy *et al.*, 2015). Par ailleurs, plusieurs GSTFuA de *P. chrysosporium* interagissent avec des composés aromatiques tels que le coniféraldehyde, la vanilline, le syringaldéhyde et la catéchine hydrate (Mathieu *et al.*, 2012, 2013).

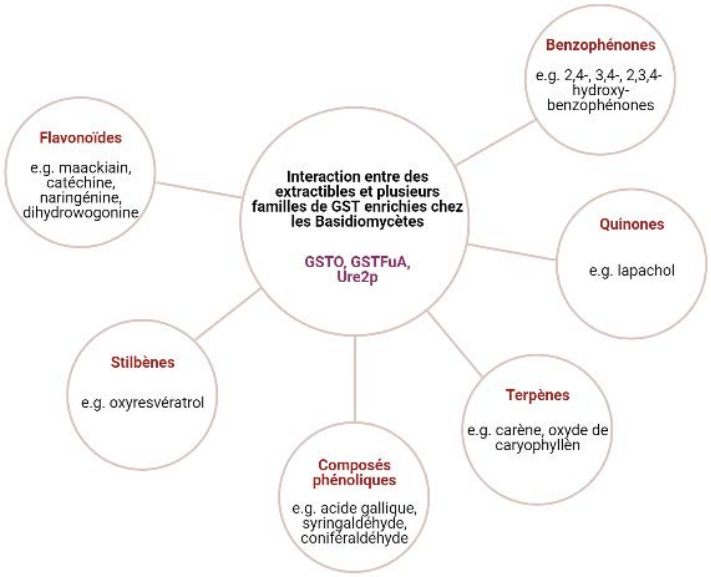


Figure 40. Propriétés ligandines des GSTs aux extractibles de bois. Les classes GSTO, GSTFuA et Ure2p sont étendues chez certains Basidiomycètes (ex : *P. chrysosporium*, *T. versicolor*) et interagissent spécifiquement avec des molécules de différentes familles (adapté de Barbier *et al.* 2020; Mathieu *et al.* 2012, 2013; Meux *et al.* 2013; Perrot *et al.* 2018; Schwartz *et al.* 2018).

La phase de stockage ou d'excrétion

La dernière phase du système de détoxication correspond au stockage ou à l'excrétion du composé. Cette étape implique deux familles de transporteurs : les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et MFS (Major Facilitator Superfamily). Ces familles de transporteurs diffèrent vis-à-vis de la source d'énergie utilisée, avec l'hydrolyse de l'ATP pour les transporteurs ABC et l'énergie d'un gradient de protons pour les transporteurs MFS.

Chez les champignons, les transporteurs ABC et MFS sont impliqués dans les phénomènes d'acquisition de résistance à des composés toxiques qui peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Dans le cas de molécules issues de végétaux, les transporteurs ABC présentent une large gamme de spécificités de substrats incluant des alcaloïdes, terpénoïdes, flavonoïdes et stilbènes (Stergiopoulos *et al.*, 2002). Par exemple, chez *A. nidulans*, l'induction de l'expression de plusieurs gènes codant pour des transporteurs ABC (*atrA* et *atrB*) a été démontrée en présence de pisatine (flavonoïdes) (Del Sorbo *et al.*, 1997). Par

ailleurs, chez *A. nidulans*, le mutant Δ*atrB* est plus sensible à différents composés phytochimiques tels que la camptothécine (alcaloïde) et le resvératrol (stilbène) (Andrade *et al.*, 2000). Chez le champignon nécrotrophe *Gibberella pulicaris*, l'induction de l'expression d'un gène codant pour un transporteur ABC (*Gpabc1*) a été démontrée en présence de rishitine (terpénoïde) et lubimine (sesquiterpenoïde). Chez *G. pulicaris*, les mutants Δ*abc1* sont hypersensibles à ces composés (Fleissner *et al.*, 2002).

Chez plusieurs champignons de pourriture blanche (ex : *Polyporus brumalis*, *Dichomitus squalens*, *P. chrysosporium*), des analyses transcriptomiques ont permis de mettre en avant l'induction de l'expression des gènes impliqués dans les étapes de détoxication du Xénome (Cytochrome P450, GST et transporteurs ABC) en réponse à un substrat contenant de la biomasse lignocellulosique, des composés aromatiques ou des extractibles (Daly *et al.*, 2020; Fernández-González *et al.*, 2018; Kowalczyk *et al.*, 2019; Miyauchi *et al.*, 2018). De plus, des analyses phylogénomiques ont mis en évidence une extension des familles d'enzymes impliquées dans la dégradation de la paroi végétale et dans le transport et la détoxication de produits de dégradation et de métabolites spécialisés chez les champignons de pourriture blanche (Nagy *et al.*, 2017). Ces résultats démontrent ainsi l'importance des systèmes de dégradation et de détoxication chez les champignons ligninolytiques durant les processus de dégradation du bois.

5. Modèle fongique pour la dégradation du bois : *Phanerochaete chrysosporium*

P. chrysosporium est un champignon de pourriture blanche appartenant à l'ordre des Polyporales. Les membres de cet ordre sont caractérisés notamment par leur mode de vie saprotrophe et leur capacité de dégradation du bois incluant les polysaccharides et les polymères de lignine. Les premières études portant sur la dégradation des polymères de lignine ont été initiées avec *P. chrysosporium* et ont permis d'identifier les enzymes majeures impliquées dans sa dégradation. C'est la cas notamment des lignine peroxydases, des manganèse peroxydases et des cellobiose dehydrogénases (Bao *et al.*, 1993; Glenn *et al.*, 1983; Glenn et Gold, 1985; Tien et Kirk, 1983). Le génome de *P. chrysosporium* a été le premier à être séquencé dans le phylum des Basidiomycètes (Martinez *et al.*, 2004). Il constitue ainsi un champignon modèle pour étudier les mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois. De plus, il présente un intérêt particulier dans les domaines de la bioremédiation car il est capable de dégrader divers polluants persistants dans l'environnement tels que des composés aromatiques chlorés, des munitions, des pesticides et des colorants (Cameron *et al.*, 2000).

Les Ascomycètes et les Basidiomycètes sont des champignons dicaryotiques ce qui signifie qu'ils contiennent deux noyaux différents au sein des cellules. Cette propriété a rendu compliqué l'analyse de familles multigéniques (Stewart *et al.*, 2000). En effet, en plus de la variabilité des séquences entre des

paralogues souvent proches physiquement s'ajoute la variabilité naturelle existant entre les deux noyaux. Ces familles multigéniques incluent notamment les gènes codant pour des protéines impliquées dans la dégradation du bois (ex : lignine peroxydase, manganèse peroxydase) et la détoxication de molécules qui en sont issues (ex : cytochromes P450, glutathion transférases). Pour faciliter la différentiation des membres de familles multigéniques complexes et l'utilisation d'approches de génétique directe chez ce champignon, un dérivé homocaryotique nommé RP78 a été isolé à partir de la souche dicaryotique BKM-F-1767 de *P. chrysosporium* (Stewart *et al.*, 2000). Etant considéré comme un champignon modèle pour la dégradation du bois, les activités ligninolytiques (lignine peroxydase, manganèse peroxydase et glyoxal oxydase) de la souche homocaryotique ont été contrôlées et sont similaires à celles de la souche parentale hétérocaryotique dans des conditions de culture standard carencée en azote (Stewart *et al.*, 2000). Cette étude a ainsi permis l'obtention d'une souche modèle homocaryotique de *P. chrysosporium* faisant l'objet du premier séquençage du génome d'un champignon Basidiomycète (Martinez *et al.*, 2004).

Le séquençage du génome de la souche RP78 de *P. chrysosporium* a permis d'estimer une taille de 29,9 Mbp et de prédire un total de 11 777 gènes (Martinez *et al.*, 2004). Les analyses du séquençage de son génome ont permis d'évaluer un répertoire de 431 CAZymes composé de 181 glycoside hydrolases, 70 glycosyl transferases, 89 enzymes avec des activités auxiliaires, 65 carbohydrate-binding modules, 20 carbohydrate esterases et 6 polysaccharide lyases (Kameshwar et Qin, 2017). Son système d'oxydation extracellulaire se compose de 10 lignine peroxydases, 5 manganèse peroxydases, 6 copper radical oxydases et 1 cellobiose dehydrogenase (Kersten et Cullen, 2007). Son système de détoxication intracellulaire est représenté par deux grandes familles multigéniques (les cytochromes P450 et les glutathion transférases) avec 149 gènes codant des cytochromes P450 (Syed et Yadav, 2012) et 27 gènes codant pour des glutathion transférases (Morel-Rouhier *et al.*, 2009).

Contexte et objectifs du projet de thèse

Les extractibles représentent une source majeure de molécules bioactives protégeant le bois des attaques fongiques (Perrot *et al.*, 2020). Bien que des milliers de molécules antifongiques aient été identifiées, leur mécanisme d'action reste encore très peu décrit et nécessite une meilleure compréhension pour une utilisation future. Cependant, un manque d'outils génétiques a limité les possibilités d'étudier ce processus *in vivo* chez les Basidiomycètes, restreignant nos connaissances majoritairement à des Ascomycètes. Pour contourner ces limites, une approche de génétique directe a été développée précédemment au laboratoire et a permis de générer des collections de mutants de *P. chrysosporium* par mutagénèse par UV (Nguyen, 2020). Des cribles génétiques ont été réalisés avec des molécules antifongiques d'intérêt telles que des composés pharmaceutiques (itraconazole et rapamycine) et des extractibles de bois (*Bagassa guianensis*, *Prunus avium* et Saint Martin rouge) (Nguyen, 2020; Perrot *et al.*, 2018). Les mutants présentant un phénotype de résistance en comparaison à la souche sauvage ont ainsi été sélectionnés et ont permis d'obtenir des banques de mutants pour chacun de ces composés. Cette approche sans a priori a pour objectif d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans les processus de détoxication de molécules antifongiques et/ ou d'identifier leurs potentielles cibles moléculaires chez les champignons de pourriture blanche par l'utilisation du champignon modèle *P. chrysosporium*.

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux par la caractérisation des banques de mutants de *P. chrysosporium* générées précédemment. Les objectifs de ce projet sont de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux molécules antifongiques chez *P. chrysosporium*. Durant ce projet, deux collections de mutants ont été considérées : (1) l'une résistante à un composé pharmaceutique, la rapamycine, et (2) l'autre résistante à des extractibles de bois provenant de l'espèce tropicale *B. guianensis*. Pour chacune de ces collections, les mutations causales putatives responsables du phénotype de résistance ont été identifiées en amont du commencement de cette thèse (Nguyen, 2020). (1) La molécule de rapamycine a été utilisée comme preuve de concept dans cette étude. En effet, le mécanisme d'action et les cibles moléculaires de cette molécule étant connus, un séquençage ciblé de ces acteurs a été réalisé pour confirmer la fiabilité et la robustesse de cette stratégie. (2) Pour identifier la mutation causale putative impliquée dans la résistance aux extractibles de bois de *B. guianensis*, la stratégie a été de rechercher un gène muté commun au sein de la collection de mutants. Pour cela, un re-séquençage entier du génome de deux mutants exposant un phénotype de résistance important aux molécules antifongiques a été réalisé.

Pour comprendre comment ces mutants résistent aux molécules antifongiques utilisées, une caractérisation globale des collections de mutants a été réalisée en répondant à 3 trois sous-objectifs majeurs (Fig. 41) :

1. **Valider l'implication du gène portant la mutation causale putative dans le phénotype de résistance des mutants**. Pour cela, des approches de complémentation et/ou de gain de fonction ont été réalisées chez *S. cerevisiae* et *P. chrysosporium*.

2. **Déterminer si l'acquisition de résistance aux extractibles confère un avantage à *P. chrysosporium* dans l'efficacité de dégradation et minéralisation du bois.** Pour cela, des essais de minéralisation de bois de *B. guianensis* ont été réalisés avec la souche sauvage de *P. chrysosporium* et un mutant résistant aux extractibles de *B. guianensis*.

3. **Caractériser l'activité des protéines sauvages et mutantes et leur capacité à interagir avec la molécule antifongique**. Pour cela, les protéines recombinantes correspondantes ont été produites en système hétérologue chez *Escherichia coli*, purifiées par chromatographie d'affinité et analysées pour leurs propriétés biochimiques.

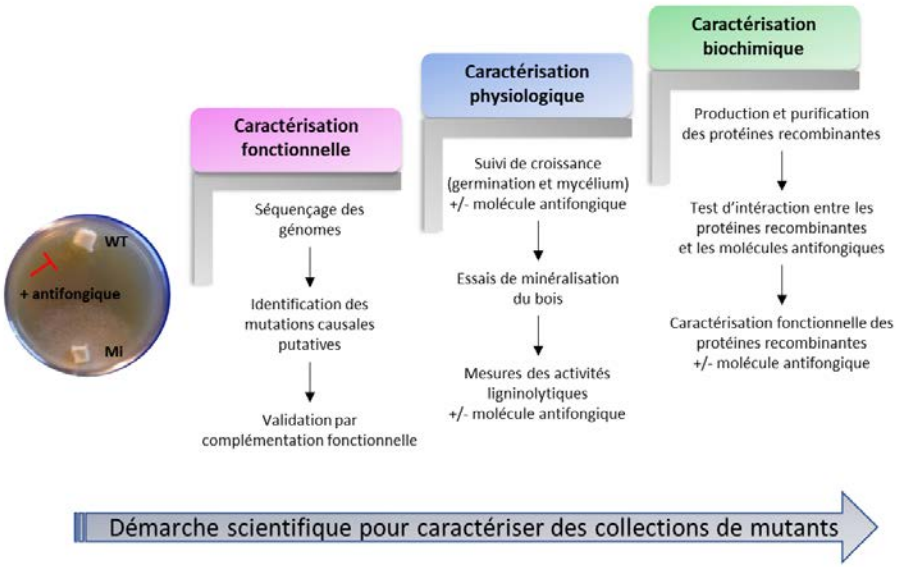


Figure 41. Démarche scientifique pour caractériser des collections de mutants résistants à des molécules antifongiques.

RÉSULTATS

Chapitre I : Caractérisation de mutants de *P. chrysosporium* résistants à la rapamycine

La rapamycine, toxine avec un mode d'action antifongique à site spécifique, constitue un outil puissant pour étudier la voie de TOR chez les organismes eucaryotes (Heitman *et al.*, 1991). Cette molécule cible la protéine FKBP12 et se lie aux domaines FRB des protéines TOR1 et TOR2, aboutissant à l'inhibition de la croissance cellulaire. Dans le but d'étudier le rôle de la voie de TOR durant les processus de dégradation du bois, nous avons étudié dans un premier temps le mécanisme d'action de la rapamycine chez le champignon modèle *P. chysosporium*. Pour cela, des mutants de ce champignon ont été générés par mutagénèse par UV et ont été criblés sur un milieu sélectif contenant une concentration inhibitrice de rapamycine. Le mode d'action spécifique de la rapamycine a permis de réaliser un séquençage ciblé des gènes codant la protéine FKBP12 et les domaines FRB des protéines TOR1 et TOR2 au sein de la collection de mutants résistants à la rapamycine. L'analyse de mutations au sein de ces gènes a ainsi permis de mettre en évidence la conservation des cibles protéiques de la rapamycine chez *P. chrysosporium* et de démontrer le succès de cette stratégie avec une toxine comme preuve de concept.

Dans le but d'utiliser ces mutants comme outil pour étudier la voie de TOR chez ce champignon, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à un mutant contenant un codon stop au sein du gène codant pour la protéine FKBP12. Des analyses phylogénétiques ont d'abord permis de confirmer que la protéine codée par ce gène est la protéine orthologue de FKBP12/*Sc*FPR1 chez *P. chrysosporium* et la caractérisation biochimique de cette protéine a été réalisée. La protéine FKBP12 de *P. chrysosporium* est fonctionnelle et possède une activité peptidyl-prolyl cis trans isomerase (PPIase). La rapamycine est capable de se lier à la protéine *Pc*FKBP12 et conduit à l'inhibition de son activité PPIase. Enfin, une approche de complémentation fonctionnelle chez une souche de levure de *S. cerevisiae* résistante à la rapamycine a permis de confirmer la présence d'une mutation causale au sein du gène codant pour FKBP12 chez un mutant de la collection. Cette étude permet ainsi de démontrer la conservation du mode d'action antifongique de la rapamycine chez *P. chrysosporium* et discute de l'utilisation future des mutants résistants à la rapamycine pour étudier la voie de TOR chez ce champignon.

Article n°3 : Characterisation of the rapamycin target FKBP12 in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.

Auteurs : Nguyen Duy Vuong*, Noel Delphine*, Fernandez-Gonzalez Antonio, Roret Thomas, Morel-Rouhier Mélanie, Gelhaye Eric, Sormani Rodnay.

* co-first authors

Article en cours de préparation.

Characterization of the rapamycin target FKBP12 in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Authors

Nguyen Duy Vuong[a*], Noel Delphine[a*], Fernandez-Gonzalez Antonio[a], Roret Thomas[a1], Morel-Rouhier Mélanie[a], Gelhaye Eric[a], Sormani Rodnay[a]

* co-first authors

[a] Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000, Nancy, France

[1] Present address: CNRS, LBI2M, Sorbonne Universités, Roscoff, France

Corresponding author: Rodnay Sormani

Unité Mixte de Recherches 1136 Université de Lorraine/INRAE

Interactions Arbres / Micro-organismes

Faculté des sciences, entrée 1B, 3éme étage

Bd des aiguillettes

54500 VANDOEUVRE-Lès-NANCY

France

Mail: rodnay.sormani@univ-lorraine.fr

Tel: + 33 3 72 74 51 59

Abstract

The TOR signaling pathway is central to cellular and metabolic processes regulating growth in response to nutrients and environmental stresses. In the present study, we have investigated the toxicity mechanism of rapamycin in the wood decaying fungus *Phanerochaete chrysosporium*. UV mutagenesis on conidia and screening for mutants resistant to rapamycin led to the identification of mutations in the two *TOR* genes and one mutation in a gene coding for FPR1/FKBP12 orthologue. Rapamycin binds onto *P. chrysosporium* FKBP12 and this leads to the inhibition of its peptidyl-prolyl isomerase activity. Expression of *PcFKBP12* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae Δfpr1* restored sensitivity to rapamycin in contrast to the mutated allele of *PcFKBP12*. These results confirm that *P. chrysosporium* FKBP12 protein is responsible for the sensitivity phenotype to rapamycin of the yeast Δ*fpr1* strain, and that the mutation identified in the *PcFKBP12* mutant is a causative mutation responsible for the rapamycin resistance phenotype. Altogether, these results indicate that UV mutagenesis combined with chemical screening is an efficient strategy to investigate the mode-of-action of antifungal molecules in *P. chrysosporium*, and that mutants resistant to rapamycin could be promising tools to analyze the TOR signaling pathway in this fungus in the context of wood degradation.

Keywords

Phanerochaete chrysosporium; Target Of Rapamycin; rapamycin, FPR1, FKBP12

1. Introduction

Wood decaying fungi play an important role in the carbon cycle in forest ecosystems, but they are also responsible for damages to wood material. Indeed, these fungi, and in particular white-rot basidiomycetes, are efficient organisms for the degradation and use of cellulose, hemicelluloses and lignin as carbon and energy sources. However, the oxidative processes used by these fungi to decompose wood generate a myriad of potential antifungal molecules, such as extractives, which are specialized metabolites produced by the plant during wood formation, and molecules released from lignin degradation. In addition, nitrogen and phosphorus are limiting nutrients in wood. To adapt to this specific ecological niche, white-rot fungi secrete a large set of enzymes involved in the degradation of wood polymers (cellulose, hemicelluloses and lignin) and possess an extended intracellular detoxification network (Eastwood *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2017). These two complex machineries require a fine and coordinated regulatory system that is to date largely unknown especially due to the lack of genetic tools for white-rot basidiomycetes.

The Target Of Rapamycin (TOR) signaling pathway is highly conserved among eukaryotes and regulates essential cellular processes including protein synthesis, ribosome biogenesis, autophagy, and cytoskeleton organization (Wullschleger *et al.*, 2006). In fungi, the TOR pathway is regulated in response to nutrient availability, as for example sugar and nitrogen (Bertram *et al.*, 2002b; Stracka *et al.*, 2014), and stresses such as osmotic and oxidative stress (Crespo *et al.*, 2001; Niles *et al.*, 2014; Weisman and Choder, 2001).

To date, deciphering the TOR signaling pathway has been facilitated by the use of rapamycin. Rapamycin is an antifungal toxin naturally produced by *Streptomyces hygroscopicus* and was first isolated in 1975 (Vézina *et al.*, 1975). Isolation of rapamycin-resistant *Saccharomyces cerevisiae* yeasts revealed mutations in the genes encoding TOR1 and TOR2, which are the central components of two multiprotein complexes known as TORC1 and TORC2 (Heitman *et al.*, 1991; Helliwell *et al.*, 1994; Kunz *et al.*, 1993). The TORC1 complex is sensitive to rapamycin and regulates numerous cellular processes (e.g. translation machinery), whereas the TORC2 complex regulates actin cytoskeleton polarization (Loewith *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 1995). Interestingly, analysis of rapamycin-resistant *S. cerevisiae* yeasts also revealed mutations in FK506 Binding Protein 12 (FKBP12) (Heitman *et al.*, 1991). The rapamycin macrolide binds to FKBP12 and this complex interacts with the FK506 Rapamycin Binding (FRB) domain of TOR, resulting in inhibition of TOR kinase activity and cell growth arrest (Choi *et al.*, 1996; Lorenz et Heitman, 1995). Because of its specific mechanism of action, rapamycin has been an efficient tool for studying the TOR signaling pathway in rapamycin-sensitive organisms. The antifungal activity of rapamycin was first demonstrated in the human pathogenic fungus *Candida albicans* (Sehgal *et al.*, 1975)*, and* was subsequently studied *in* the yeast models *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Since, sensitivity to rapamycin has been demonstrated in many fungal species containing genes encoding rapamycin targets such as *Cryptococcus neoformans*, *Botrytis*

cinerea, *Mucor circinelloides* and *Fusarium graminearum* (Bastidas *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 1999; Meléndez *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2014)

In a previous study, the fungus *P. chrysosporium* was shown to be sensitive to rapamycin and genes encoding rapamycin targets were identified by sequence homology to *S. cerevisiae* TOR1, TOR2 and FKBP12 (Nguyen *et al.*, 2020). Interestingly, rapamycin was also shown to alter the secretome composition of this fungus (Nguyen *et al.*, 2020). To evaluate the possibility of using rapamycin to study the TOR signaling pathway in the context of wood degradation in ligninolytic fungi, rapamycin-resistant mutants of *P. chrysosporium* were generated by UV mutagenesis. Mutations were identified in the genes coding for *Pc*TOR1, *Pc*TOR2 and *Pc*FKPB12. The characterization of *Pc*FKBP12 revealed that this protein is the ortholog of *S. cerevisiae* FPR1, binds rapamycin and that this toxin inhibits its peptidyl-prolyl isomerase activity. Using functional complementation in a rapamycin-resistant strain of *S. cerevisiae*, we confirmed that the toxic mechanism of rapamycin occurs through its binding to *Pc*FKBP12 and that one mutant of the collection possesses a causative mutation in *Pc*FKBP12 responsible for rapamycin resistance.

2. Materials and methods

Fungal growth conditions

The homokaryotic strain *Phanerochaete chrysosporium* RP78 was used in this study. Genomic resources for this strain are available within the Mycocosm web portal of the Joint Genome Institute database (Martinez *et al.*, 2004; Ohm *et al.*, 2014). Wild-type and mutated strains were maintained on solid malt agar medium (MA) (malt extract (20 $g.L^{-1}$) agar (30 $g.L^{-1}$)) for storage.

Mutagenesis of *P. chrysosporium* conidia and screening for rapamycin resistant strains

Conidia of *P. chrysosporium* RP78 were obtained after 5 days of fungal culture at 37 °C on solid sporulation medium (10 $g.L^{-1}$ glucose, 10 $g.L^{-1}$ malt extract, 2 $g.L^{-1}$ peptone from potato, 2 $g.L^{-1}$ yeast extract, 1 $g.L^{-1}$ asparagine, 2 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$.7H2O, 1 $mg.L^{-1}$ thiamine HCl, 30 $g.L^{-1}$ agar). Conidia were directly irradiated on plates with UV light for 30 seconds. They were resuspended in sterile water and filtered with Miracloth. The conidia concentration was determined by measuring the optical density at 650 nm as previously described (Tien and Kirk, 1983b). 10,000 conidia were then plated on MA medium supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ of rapamycin (LC laboratories, R-5000) and incubated at 37 °C until growth of individual mycelia. Mycelia were cultivated again on sporulation medium supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ of rapamycin and 10,000 conidia were inoculated in 10 mL of malt extract medium (10 $g.L^{-1}$) supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ of rapamycin. Single conidia progenies were then fished and cultivated on sporulation medium supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ of rapamycin. Conidia from this medium were used as mutant lines called *rap* mutants for further experiments.

Measurements of conidia germination by nephelometry

Conidia germination of *P. chrysosporium* WT and *rap* mutant strains was followed using a nephelometric reader (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany). Conidia were obtained from 8 days-old mycelia grown on sporulation medium by a gentle scraping of the agar plates and filtration through Miracloth. 10,000 conidia were resuspended in 200 µL of malt extract (10 $g.L^{-1}$) in presence of rapamycin (2 $\mu g.mL^{-1}$) or DMSO as control, and incubated in the nephelometric reader at 37 °C for 70 h. Relative nephelometric unit (RNU) values were calculated as previously described (Joubert *et al.*, 2010).

Analysis of mutations in *Pc*TOR1, *Pc*TOR2 and *Pc*FKBP12 alleles

Genomic DNA extractions were performed from 3-day old liquid cultures of WT and *rap* mutant strains using QIAGEN DNeasy plant kit according to manufacturer's instruction. Sequences coding for the FRB domains of protein TOR1 and TOR2, and *Pc*FKBP12 sequence were amplified by PCR with Gotaq G2 Flexi DNA polymerase from the genomic DNAs of the wild-type *P. chrysosporium* strain and the *rap* mutant collection. Reactions were performed in a final volume of 20 µL including 1X green Gotaq Flexi Buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.16 mM dNTP, 0.1 µM forward and reverse primers, 50 ng of gDNA and 0.01 U/µl Gotaq G2 Flexi. The following primers were used to amplify *Pc*FKBP12 sequence (for: 5'ACTCAGTCCAACCGTACCTG3' and rev: 5'GCTTACTGGGCAGCTGTTAG3') and sequences coding for the FRB domain of TOR1 and TOR2 (for: 5'TCAGTCGAGAGCTCATCAGG3' and rev: 5'TGCCGGTTGACTTCTAAGC3'). PCR products were visualized on agarose gel and purified using PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, UK). Purified PCR products were cloned in pGEM-T vector according to manufacturer instructions (Promega A1360, USA). Purified recombinant plasmids were sequenced using T7P and SP6 universal primers (GENEWIZ, UK).

3D modeling of the FKBP12-rapamycin-TOR complex of *P. chrysosporium*

The 3D models of *P. chrysosporium* FKBP12 protein and FRB domains of TOR proteins were generated by homology modeling. The FK506-binding protein 1A from *Aspergillus fumigatus* (73% identity with *Pc*FKBP12; pdb entry: 5hwb) was used as model for *Pc*FKBP12 and the serine/threonine-protein kinase TOR from human (63% identity with *Pc*TOR1 and 2; pdb entry: 4jsp) for *Pc*TOR1 and 2. Then, the *Pc*FKBP12-rapamycin-*Pc*TOR complexes were built by superimposition with the crystal structure of the human complex (pdb entry: 1fap). The side chain and rotamers were optimized using YASARA's refinement protocol (Krieger *et al.*, 2009).

Genome resequencing of the *rap8* mutant

DNAseq was performed at the GeT-PlaGe core facility, INRAE Toulouse. DNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols using the Illumina TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit. Briefly, DNA was fragmented by sonication and adaptators were ligated to the fragments to be

sequenced. 8 cycles of PCR were applied to amplify libraries. Library quality was assessed using an Advanced Analytical Fragment Analyzer and libraries were quantified by qPCR using the Kapa Library Quantification Kit. DNA-seq experiments were performed on an Illumina Miseq using a paired-end read length of 2x250 pb with the Illumina MiSeq Reagent Kits v2.

Phylogenetic analysis of FPR proteins in the fungal Ascomycota and Basidiomycota phyla

FPR protein sequences (*Sc*FPR1, *Sc*FPR2, *Sc*FPR3 and *Sc*FPR4) were retrieved in *S. cerevisiae* from the yeast genome database (Cherry *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2014). Orthologous protein sequences were retrieved from Ascomycota (*Brettanomyces naardenensis*, *Kazachstania naganishii CBS 8797*, *Lachancea thermotolerans CBS 6340*, *Pichia membranifaciens NRRL Y-2026*, *Tetrapisispora phaffii CBS 4417*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Metschnikowia bicuspidata var. bicuspidata NRRL YB-4993*, *Candida glabrata*, *Cyberlindnera jadinii NRRL Y-1542*, *Trichoderma harzianum, Morchella conica*, *Aspergillus fumigatus A1163, Penicillium rubens Wisconsin 54-1255*, *Schizosaccharomyces pombe*) and Basidiomycota (*Pleurotus ostreatus PC15*, *Coniophora puteana RWD-64-598 SS2*, *Serpula lacrymans var. lacrymans S7.9*, *Sparassis crispa*, *Armillaria ostoyae*, *Rhizopogon vinicolor AM-OR11-026*, *Cryptococcus gattii VGIV IND107*, *Apiotrichum porosum*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Meira miltonrushii*, *Ceraceosorus bombacis, Phanerochaete chrysosporium RP-78*, *Coprinopsis cinerea okayama7#130*) species using BlastP on NCBI and Fungidb databases (Altschul *et al.*, 1990; Basenko *et al.*, 2018; Stajich *et al.*, 2012). Sequences with E-value > 10^{-5} or similarity percentage < 30 % to *Sc*FPR were excluded from the analysis. The peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) domain of *Sc*FPR sequences were identified using Uniprot software (The UniProt Consortium, 2023). The PPIase domain sequences were identified by multiple alignment with the PPIase domain of the 4 *S. cerevisiae* FPR sequences, using Clustal Omega software (Madeira *et al.*, 2022). The phylogenetic analysis was conducted from PPIase domain sequences using MEGA 7.0.26 software (Kumar *et al.*, 2016).

Heterologous expression of *Pc*FKBP12 in *Escherichia coli* and purification of the recombinant proteins

Sequence coding for the wild-type *Pc*FKBP12 protein was amplified by PCR using the following primers (for: 5'CCCGAGCTCATGGGTGTCACTGTCGAGG3', rev: 5'GGGGGGGATCCCTAGTTGATGCTCAGAAGCTCGACCTCGAACTTGAGCGTCGA3') and cloned into the pET15b plasmid between SacI and BamHI restriction sites (underlined in primers). Recombinant *Pc*FKBP12 protein was produced fused to an N-terminal poly-histidine tag in *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 strain. At OD_{600} of 0.6, bacterial cultures were supplemented with 0.5 % ethanol and incubated for 3 h at 4 °C. Expression of the recombinant proteins was then induced by the addition of 0.1 mM Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) for 20 hours at 20 °C. Bacterial cells were centrifuged for 25 minutes at 6,380 g and pellets were resuspended in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing

200 mM NaCl and 20 mM Imidazole. Cells were lysed by sonication and centrifuged at 20,000 rpm for 30 minutes at 4 °C. Purification of the His-tag recombinant proteins was performed by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The soluble fraction was loaded on a Ni-NTA agarose resin (Qiagen), previously equilibrated with 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM NaCl and 20 mM Imidazole. A washing step was performed with 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM NaCl and 20 mM Imidazole, and recombinant proteins were eluted in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM NaCl and 250 mM Imidazole. Proteins were concentrated, subjected to size exclusion chromatography on a Superdex200 16/600 column coupled to an Aktä Purifier automated system (GE Healthcare), and eluted in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM NaCl.

Peptidyl-prolyl isomerase activity

The PPIase activity of recombinant *Pc*FKBP12 protein was measured as previously described (Selles *et al.*, 2021). Reactions were performed at 5 °C in presence of *Pc*FKBP12 protein (0.5 and 1 µM), rapamycin (5µM) or DMSO, and chymotrypsin (12.5 µg) in a final volume of 500 µL of 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM NaCl. After 0.4 min of incubation, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitrolamine peptides (100 µM) were added to the reaction and release of p-nitrolamine was followed at 390 nm.

Size exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering

300 µg of recombinant *Pc*FKBP12 protein were incubated with 12.4 µL of rapamycin (87 µM) or DMSO for 30 min in 300 µL of 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM NaCl. Samples were subjected to Superdex200 10/300 column (GE Healthcare) coupled to an Aktä Purifier automated system (GE Healthcare), a multiangle light scattering detector (miniDAWN TREOS II, Wyatt Technology) and a differential refractometer (Optilab T-rEX; Wyatt Technology). Data were analyzed using ASTRA software to determine molar masses of the recombinant protein.

Functional complementation of Δ*fpr*1 *S. cerevisiae* strain by WT and *rap8 Pc*FKBP12 alleles

Sequences coding for the wild-type and K99Stop *Pc*FKBP12 proteins were amplified by PCR using the following primers (for : 5'CCCGAGCTCATGGGTGTCACTGTCGAGG3', rev_WT: 5'GGGGGGGATCCCTAGTTGATGCTCAGAAGCTCGACCTCGAACTTGAGCGTCGA3', rev_*rap8* : 5'CCCGGATCCCTAGAGCGTCGAGTTCGGCG3') and cloned into the pYES2 plasmid between SacI and BamHI restriction sites (underlined in primers). BY4741 control strain (BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0) and Δ*fpr*1 strain (BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YNL135c::kanMX4) of *S. cerevisiae* were purchased from Euroscarf (SRD GmbH). Yeast strains were transformed with pYES2 plasmid constructs and selected on Yeast Nitrogen Base (YNB) glucose medium (7 $g.L^{-1}$ yeast extract w/o amino acids, 20 $g.L^{-1}$ glucose) supplemented with histidine, leucine, and methionine amino acids. Cells were cultivated at 30 °C overnight in YNB glucose

medium and incubated in YNB galactose medium (7 $g.L^{-1}$ yeast extract w/o amino acids, 20 $g.L^{-1}$ galactose) for 5 hours. 5 µL of five-fold serial dilution of yeast strains were spotted on YNB galactose agar medium (7 $g.L^{-1}$ yeast extract w/o amino acids, 20 $g.L^{-1}$ galactose, 20 $g.L^{-1}$ agar). All media were supplemented with histidine, leucine, and methionine amino acids. Cells were incubated at 30 °C for 3 days.

3. Results

Isolation of *P. chrysosporium* mutants resistant to rapamycin (*rap* mutants)

P. chrysosporium was previously shown to be sensitive to the rapamycin macrolide antibiotic (Nguyen *et al.*, 2020). To check whether this phenotype is related to the TOR signaling pathway in *P. chrysosporium*, and whether rapamycin can be used to further study the putative role of this pathway in the wood degradation process, we produced *P. chrysosporium* mutants resistant to rapamycin by UV mutagenesis. This strategy combining UV mutagenesis and screening for resistance to rapamycin was shown to be successful to identify the molecular targets of this molecule in *S. cerevisiae* (Heitman *et al.*, 1991) and *Fusarium graminearum* (Yu *et al.*, 2014). UV mutagenesis was performed on *P. chrysosporium* conidia and mutants were screened on solid medium containing an inhibitory concentration of rapamycin (2 $µg.mL^{-1}$). 20 mutants resistant to rapamycin were isolated and among them, only 10 were able to produce conidia in rapamycin supplemented solid medium (2 $µg.mL^{-1}$).

Rapamycin resistance phenotypes of these 10 *rap* mutants were evaluated by following both conidia germination in liquid medium by nephelometry and radial growth in solid medium (Fig. 1). Conidia germination of *P. chrysosporium* wild-type strain is completely inhibited in presence of 1 $µg.mL^{-1}$ of rapamycin (Nguyen *et al.*, 2020). In presence of a lethal concentration of 2 $µg.mL^{-1}$ of rapamycin, all *rap* mutants were able to germinate, with the exception of the two mutants *rap2* and *rap12* (Fig. 1A). Among these 10 mutants, 3 of them (*rap6, rap1* and *rap16*) showed a longer lag phase of 15, 45 and 65 hours, respectively compared to the others. Hyphal growth of the 10 *rap* mutants was then analyzed in solid medium supplemented with rapamycin (2 $µg.mL^{-1}$). Growth experiments were designed by the inoculation of the *rap* mutant and the WT strain on the same plate (Fig. 1B). In these conditions, 7 *rap* mutants (*rap1*, *rap6*, *rap8*, *rap11*, *rap12*, *rap16*, *rap17)* were able to colonize the entire plate within 3 days, whereas 3 mutants (*rap2*, *rap14* and *rap15)* grew slowly, similarly to the wild-type strain. These experiments suggest variability among the mutants for rapamycin resistance showing *rap1*, *rap8*, *rap11* and *rap17* mutants as the most resistant since they are able to both germinate and grow efficiently in presence of rapamycin.

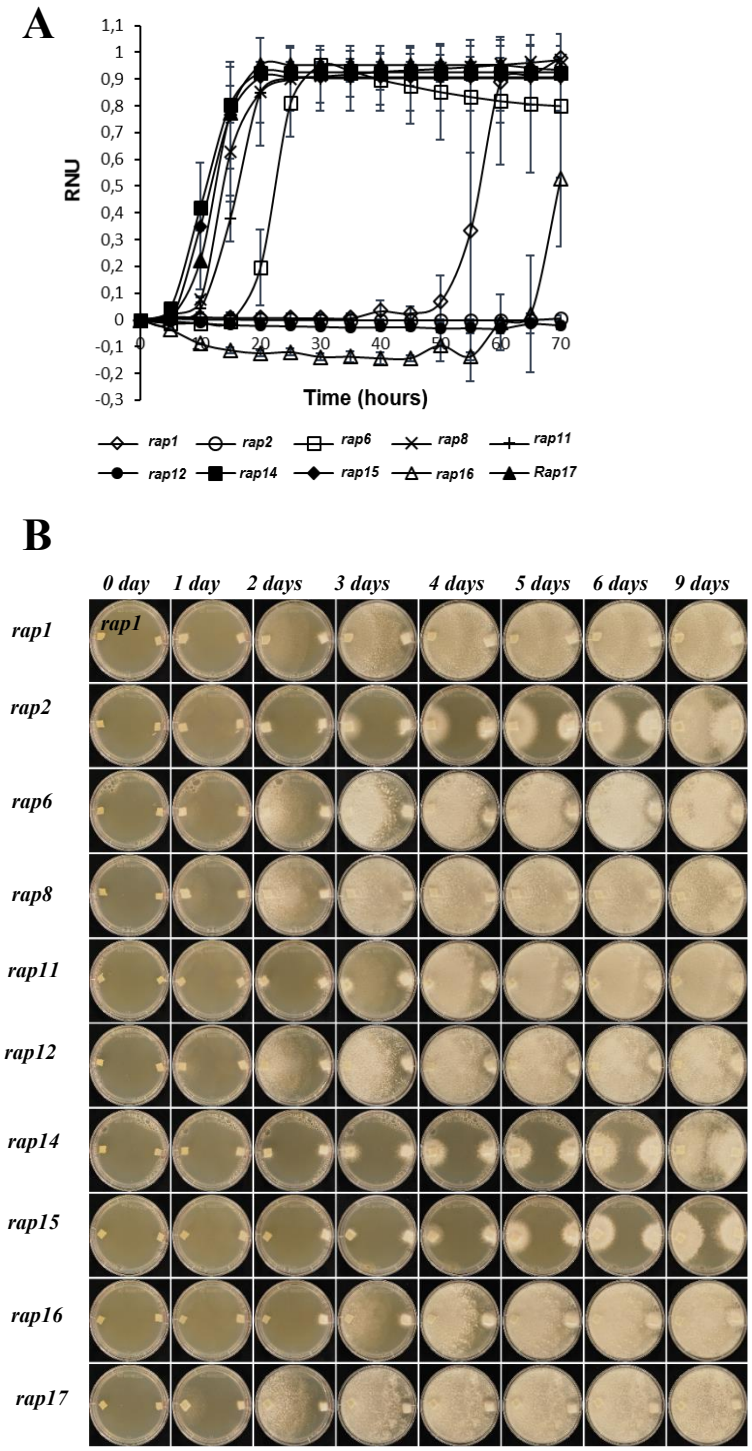


Figure 1. Resistance phenotype of *rap* mutants to rapamycin.

A. Conidial germination of *rap* mutants was followed during 70 h at 37 °C in MA medium supplemented with 2 µg.mL^{-1} of rapamycin. Fungal growth was measured in RNU for Relative Nephelometric Unit and standard deviations were calculated from 3 technical replicates.

B. Hyphal growth of the *rap* mutants in comparison to the WT strain on MA medium supplemented with 2 µg.mL^{-1} of rapamycin. For each growth experiment, the mutants are located at the left of the plate and the WT at the right. Phenotypes of *rap* mutants and the WT strain were followed for 9 days at 37 °C and pictures were taken every day.

Identification of the causative mutations for rapamycin resistance in *rap* mutants

To identify the causative mutation for rapamycin resistance of the *rap* mutants, a gene candidate strategy was performed by sequencing *P. chrysosporium* FKBP12 gene and FRB domains of TOR1 and TOR2 genes of the mutant strains. The detected mutations are listed in table 1.

Table 1. Summary of the mutations identified in *Pc*FKBP12 and *Pc*FRB domains in *rap* mutants. The *PcFKBP12* gene is localized at Scaffold 8: 545501-546137, the data are provided according to this position. *PcFRB* sequences are part of *PcTOR* genes which are localized on Scaffold 20 and Scaffold 42. For the *FRB* sequence from the *TOR1* gene localized on Scaffold 20:33739-38873, the 3' part of that gene is missing from the database (https://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Phchr2), positions are given according to sequence alignment of the protein sequence shown in Nguyen *et al.*, 2020. For the *FRB* sequence from the *TOR2* gene localized on Scaffold 42 :7003-13402, the 5' sequence of the gene is missing but sequence of the FRB domain was available from the same database.

Mutant name	Position of the mutations[a]		
	***Pc*FKBP12**	***Pc*FRB1**	***Pc*FRB2**
rap1	ND	ND	ND
rap2	ND	ND	H38R C**A**T→C**G**T
rap6	ND	W93L T**G**G→T**T**G:11045	ND
rap8	K→stop codon **A**AG→**T**AG:545654	L110P* C**T**C→C**C**C:11096	ND
rap11	ND	F100L TT**C**→TT**A** :11057	ND
rap12	ND	ND	K120E **A**AG→**G**AG
rap14	ND	F62S T**T**T→T**C**T : 10957	ND
rap15	ND	E25V G**A**A→G**T**A :10841	E13G G**A**A→G**G**A
rap16	ND	ND	ND
rap17	ND	F29Y TTC→TAC :10853	ND

ND : Not Detected

a Alternative residue with position number in FRB or FKBP12, changed codon and position number of equivalent nucleotide in DNA sequence 5'3' of genes. The mutations are indicated in bold.

* The mutation is not located in the FRB domain *stricto sensu* but in the kinase domain.

Among the 10 *rap* mutants isolated, 6 mutants contain one mutation in the FRB1 coding sequence of *Pc*TOR1 (Table 1, Fig. 2). The mutations detected in *rap6* (W93L), *rap8* (L110P), *rap11* (F100L), *rap14* (F62S) and *rap15* (E25V) affect amino acids that are conserved in FRB1 domain sequences, except for the *rap17* mutant (F29Y) (Nguyen *et al.*, 2020). These mutations, except for the *rap8* mutant, are located in an alpha helix of the FRB1 domain, which could lead to structural changes. Three mutants, *rap2*, *rap12* and *rap15* contain one mutation in the FRB2 coding sequence of *Pc*TOR2 (Table 1, Fig. 2). In the mutant *rap2*, the mutation was identified in a non-conserved amino acid (H42R) in a alpha helix of the FRB2 domain of *Pc*TOR2 (Nguyen *et al.*, 2020). In the mutant *rap12*, the mutation was identified in a non-conserved amino acid (K124E) in FRB2 domain of *Pc*TOR2 (Nguyen *et al.*, 2020). Interestingly, the two mutants (*rap2* and *rap12*) containing a mutation only in the FRB2 domain of *Pc*TOR2 are the only mutants for which conidia are unable to germinate in rapamycin supplemented medium (Fig. 1A), suggesting that these mutations in FRB2 domain of *Pc*TOR2 could be responsible for defects in fungal germination. By contrast, the mutant *rap15*, that has one mutation in the FRB2 domain of *Pc*TOR2 (F58G) and another one in the FRB1 domain of *Pc*TOR1 (E25V) was able to germinate (Fig. 1A). Among the mutant collection, only *rap8* contains a mutation in the FKBP12 sequence (Table 1, Fig. 2). This mutation leads to a stop codon (K99Stop), resulting in the production of a *Pc*FKBP12 protein lacking 10 amino acids at the C-terminal end. A second mutation was identified in the FRB1 domain of *Pc*TOR1 (L110P) in the *rap8* mutant. No mutation was identified in the sequences of FKBP12, TOR1 nor TOR2 of the *rap1* and *rap16* mutants, suggesting the involvement of other mechanisms in rapamycin resistance in *P. chrysosporium*.

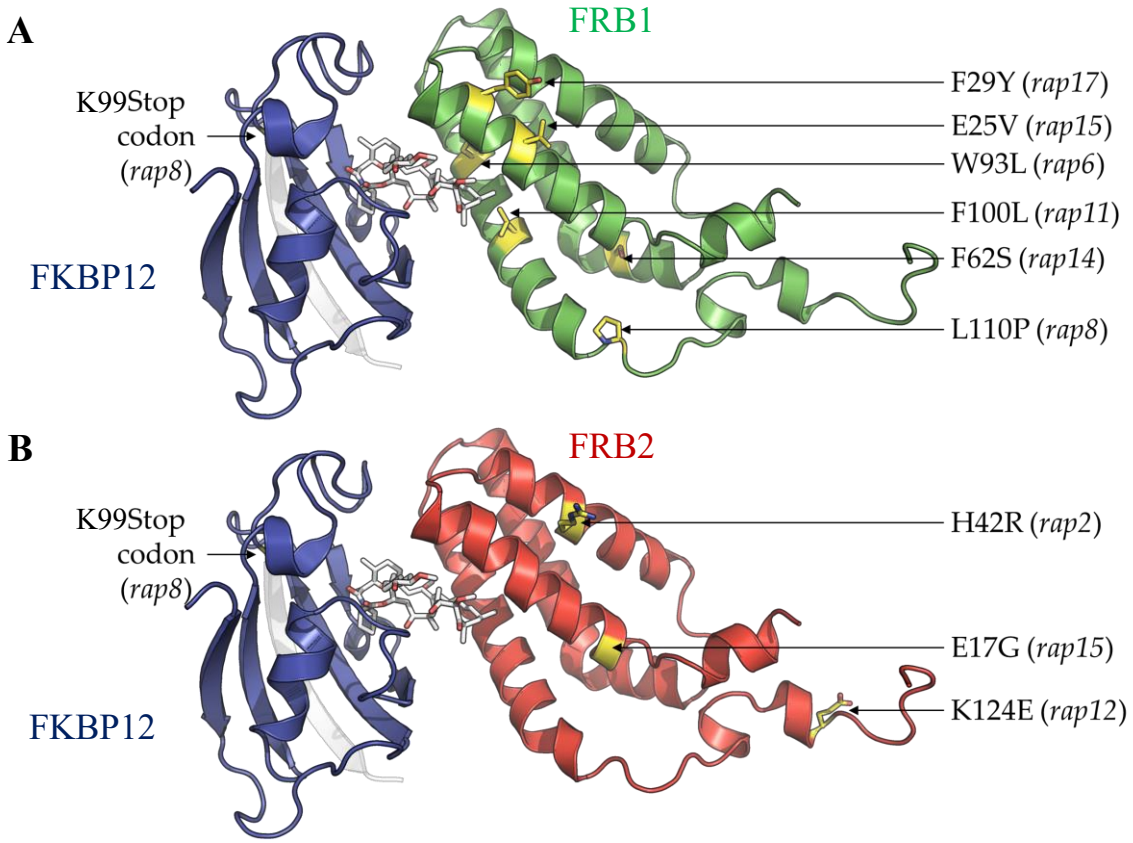


Figure 2. 3D modeling of the *P. chrysosporium* FKBP12-rapamycin-FRB complexes with the mutations identified in the *rap* mutants.

3D models of the predicted *P. chrysosporium* FKBP12-rapamycin-FRB1 (A) and FKBP12-rapamycin-FRB2 complexes (B). FKBP12, FRB1 and FRB2 are displayed with secondary structures in ribbon representation and are colored in blue, green and red, respectively. The rapamycin molecule is displayed in white sticks. Mutations identified in *rap* mutants are represented by yellow sticks in FRB1 and FRB2 domains, the stop codon in FKBP12 is pointed out and the corresponding missing part of FKBP12 is shown in light gray.

Phylogenetic analysis of FPR proteins in Ascomycetes and Basidiomycetes

In *S. cerevisiae*, FKBP12 gene is named FPR1 for FK506-binding proline rotamase 1 (Heitman *et al.*, 1991). *Sc*FPR1 belongs to a multigenic family composed of 4 genes (*Sc*FPR1, *Sc*FPR2, *Sc*FPR3 and *Sc*FPR4) that exhibit a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) domain (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2004). To determine the phylogenetic relationship between *Pc*FKBP12 (identified as AGR57_8308 in the FungiDB database (Nguyen *et al.*, 2020)) and the yeast isoforms, a phylogenetic analysis of the PPIase domain of the FPR sequences from both Ascomycete and Basidiomycete fungi was performed. Orthologous sequences to *S. cerevisiae* FPRs were retrieved in 15 Ascomycota species (Saccharomycotina, Pezizomycotina and Taphrinomycotina subphyla) and 13 Basidiomycota species (Agaricomycotina, Pucciniomycotina and Ustilaginomycotina subphyla), based on sequence homology analysis. Then the PPIase domains were identified by multiple alignments with the PPIase domains of the 4 *S. cerevisiae* FPR sequences. Phylogenetic analysis of FPR proteins was conducted using PPIase

domain sequences (Fig. 3). In the phylogenetic tree, three clusters were identified, one containing *Sc*FPR1 PPIase domain, one containing *Sc*FPR2 PPIase domain and one containing both *Sc*FPR3 and *Sc*FPR4 PPIase domains. These clusters were then named PPIase domain type I, type II (including type II – like) and type III-IV respectively (Fig. 3).

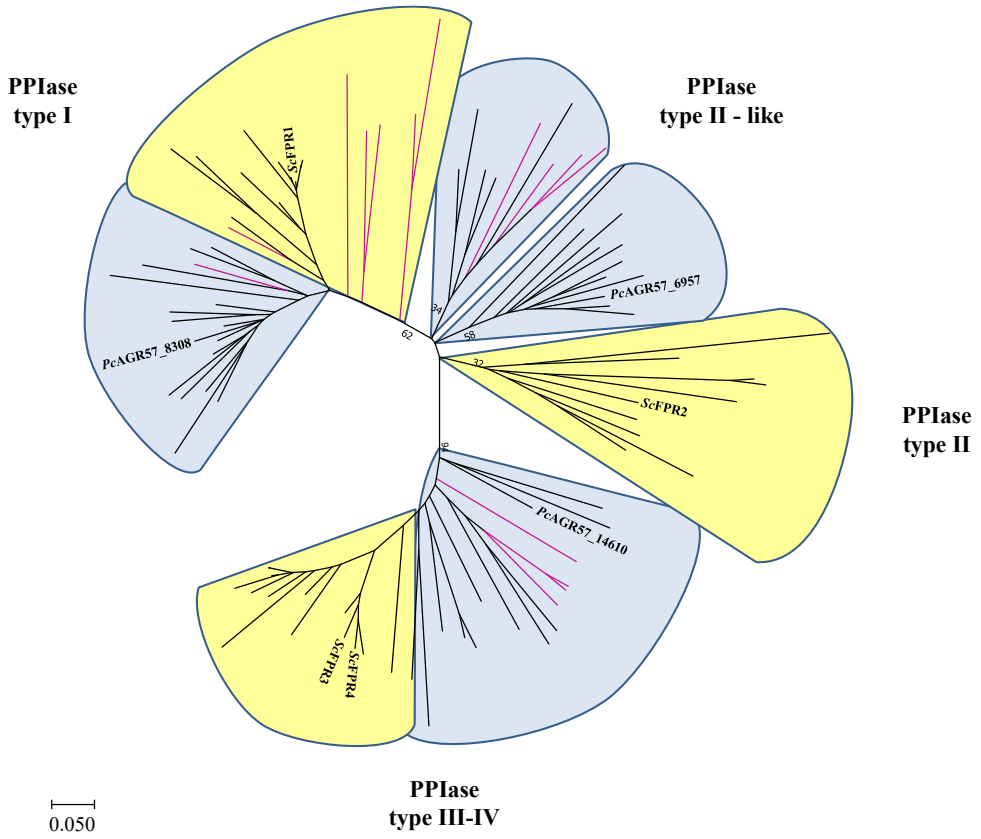


Figure 3. Phylogenetic analysis of PPIase domains of FPR proteins in Ascomycota and Basidiomycota phyla.
The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method and computed using the Poisson matrix-based method in the Mega7 software (Jones *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2016; Saitou and Nei, 1987). FPR proteins of *S. cerevisiae* are indicated and were used as reference to define the type of PPIase domain in the phylogenetic tree. Clusters of Basidiomycota and Ascomycota species are represented in blue and yellow respectively. Anamorphic Ascomycota species are displayed in fuchsia due to their divergence within the Ascomycota phylum. The scale of phylogenetic distances is displayed at the bottom left of the phylogenetic tree.

All species displayed at least one PPIase domain type I sequence, suggesting its conservation in Ascomycota and Basidiomycota phyla. Interestingly, three Pezizomycotina (*T. harzianum*, *A. fumigatus A1163*, *P. rubens Wisconsin 54-1255*) and two Agaricomycetes (*A. ostoyae*, *P. ostreatus PC15*) were identified as having more than one PPIase domain type I sequences (Supporting Information Table S1). PPIase domain type II is divided into three branches in the phylogenetic tree (Fig. 3). The first branch is composed of Basidiomycota species (Tremellomycetes, Microbotryomycetes and Exobasidiomycetes classes), the second branch is composed of Basidiomycota species belonging to the Agaricomycetes

class, and the third branch is composed of Ascomycota species belonging to the Saccharomycotina subphylum. The cluster containing PPIase domain from *Sc*FPR2 was named PPIase domain type II, and the 2 other clusters were named PPIase domain type II – like. For all tested species, one sequence corresponding to PPIase domain type II was identified, except for two Ascomycota species (*B. naardenensis* and *S. pombe*) for which no sequence was found, and two Basidiomycota species (*C. puteana* and *P. ostreatus)* that showed two FPR2 sequences (Supporting Information Table S1).

In *S. cerevisiae*, FPR3 and FPR4 sequences contain PPIase domains respectively named type III and type IV. Among the 28 fungal species analyzed, only 2 other Ascomycota species (*S. pombe*, *C. glabrata*) had 2 orthologous sequences to *S. cerevisiae* PPIase domain type III and type IV (Supporting Information Table S1). Other Ascomycota and Basidiomycota species displayed only one sequence in the PPIase domain type III-IV cluster, with the exception of two Basidiomycota species (*C. bombacis*, *S. lacrymans var. lacrymans S7.9*) for which no orthologue was identified (Supporting Information Table S1).

This analysis showed that *P. chrysosporium* possesses three FPR isoforms, one isoform in each cluster, and confirmed that the AGR57_8308 gene, previously named *Pc*FKBP12, is the orthologous protein of *Sc*FPR1.

_Pc_FKBP12 is a functional peptidyl-prolyl _cis-trans_ isomerase which binds rapamycin

It was demonstrated in human and yeast that the toxicity mechanism of rapamycin is due to its interaction with FKBP12/FPR1, which led to the inhibition of the TOR kinase activity of the TORC1 complex (Heitman *et al.*, 1991; Hentges *et al.*, 2001). Crystal structures of human FKBP12 in complex with rapamycin revealed some amino acids interacting with rapamycin through hydrogen bonds (D37, Q53, E54, I56 and Y82) and others (Y26, F36, F46, V55, W59, I90, I91 and F99) through hydrophobic bonds (Choi *et al.*, 1996). These amino acids are located within the PPIase domain. To analyze if rapamycin-interacting FKBP12 residues are conserved in Ascomycota and Basidiomycota phyla, a sequence alignment was performed with the orthologous fungal sequences of *S. cerevisiae* PPIase domain type I (Fig. 4A). In *S. cerevisiae*, 10 amino acids (Y26, F36, D37, F46, V55, I56, W59, Y82, I91 and F99) out of 13 are conserved in the FPR1 protein. In *Arabidopsis thaliana*, the ortholog to FKBP12 does not interact with rapamycin and shows a substitution of the tyrosine amino acid at position 26 (Y26C) (Sormani *et al.*, 2007). Interestingly, *Pc*FKBP12 contains the 10 amino acids of *S. cerevisiae* FPR1 which are involved in rapamycin binding.

Eight residues (Y26, F36, D37, I56, W59, Y82, I91, F99) are conserved in all studied species and some others can be variable depending on the species (Fig. 4A). For example, Y82 and F99 are not found in one of the two FPR1 sequences of *T. harzianum*. The V55 residue is conserved in 32 species out of 35 (*C. cinerea* (V55I), *S. pombe* (V55L), and for *P. rubens* (V55L in one of two sequences)). The F46 residue is conserved in 31 species out of 35 (*C. cinerea* (F46D), *A. fumigatus* (F46D in one of two sequences) and *P. rubens* (F46L in two sequences)).

To check whether rapamycin binds to *Pc*FKBP12, the molar mass of recombinant *Pc*FKBP12 protein was analyzed in presence or absence of rapamycin by using size exclusion chromatography with inline multi-angle light scattering *(SEC-MALS)* (Fig. 4B). An increase of approximately 1 kDa of the molar mass of *Pc*FKBP12 was observed in presence of rapamycin, corresponding to the molar mass of rapamycin (914,172 Da). Moreover, a variation in retention time was observed in the presence of rapamycin compared to FKBP12 profile without rapamycin. These results suggest that recombinant *Pc*FKBP12 indeed binds rapamycin.

*Sc*FPR1 is a peptidyl-prolyl isomerase, catalyzing the *cis-trans* isomerisation of peptide bonds before proline residues in protein (Fischer *et al.*, 1989; Harrison and Stein, 1990). To determine if *Pc*FKBP12 is functional, PPIase assays were performed in presence or absence of rapamycin (Fig. 4C and D). These assays are based on the use of p-nitrolamine-peptides which are present in solution in *cis* state. Isomerization of these peptides from *cis* to *trans* state leads to the cleavage of p-nitrolamine for which absorbance can be measured at 390 nm, allowing to follow PPIase activity of recombinant proteins by *spectrophotometric* detection. In presence of *Pc*FKBP12, increase of p-nitrolamine release was observed over time, showing that *Pc*FKBP12 is a functional PPIase (Fig. 4C). In presence of rapamycin, PPIase activity of *Pc*FKBP12 is reduced to the level of the rapamycin control, suggesting that rapamycin binding to *Pc*FKBP12 leads to complete inhibition of its PPIase activity (Fig. 4D).

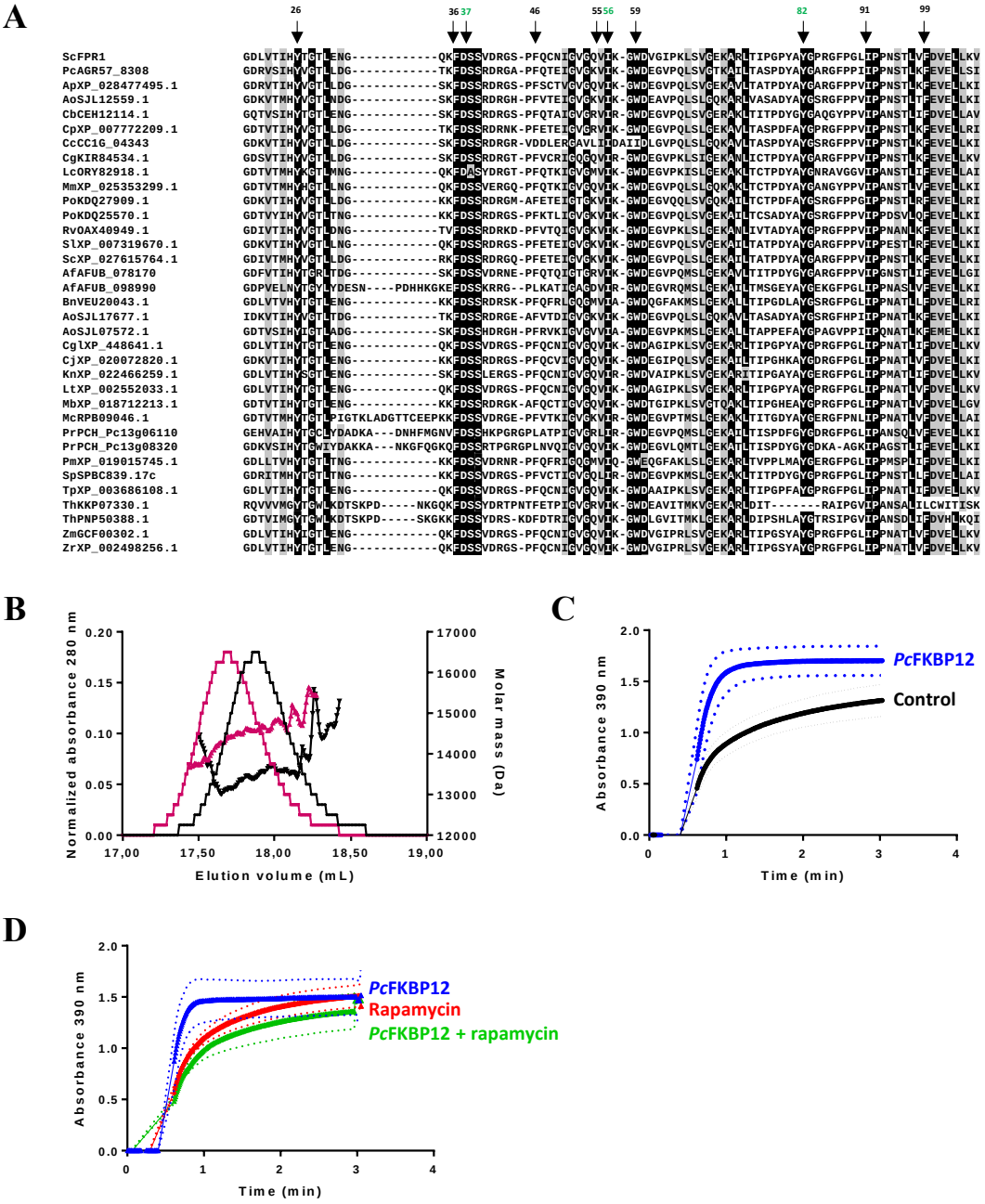


Figure 4. Interaction of rapamycin with *Pc*FKBP12 and inhibition of its PPIase activity.

A. Multiple alignement of PPIase domain type I sequences. Amino acids involved in the interaction with rapamycin are indicated in green for hydrogen bonds and in black for hydrophobic bonds.

B. Size exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering of *Pc*FKBP12 in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 200 mM NaCl supplemented or not with rapamycin. Molar masses of *Pc*FKBP12 and *Pc*FKBP12 incubated with rapamycin (right Y axis) are displayed in accordance with SEC peak (left Y axis). Molar masses and elution profiles are represented in black for *Pc*FKBP12 alone and in red for *Pc*FKBP12 incubated with rapamycin.

C. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activity of *Pc*FKBP12. The activity assays are based on the cleavage of p-nitrolamine peptide using the chymotrypsin peptidase. Assays were performed in presence or not of *Pc*FKBP12 and are represented respectively in blue and black. PPIase activities were measured by following absorbance at 390 nm over time. Standard deviations were calculated from 3 technical replicates and are represented by dashed lines.

D. Inhibition of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activity of *Pc*FKBP12 in presence of rapamycin. Assays were performed in presence or not of rapamycin and are represented respectively in green and blue. Control without *Pc*FKBP12 and with rapamycin was performed and is displayed in red. PPIase activities were measured by following absorbance at 390 nm over time. Standard deviations were calculated from 3 technical replicates and are represented by dashed lines.

Expression of *PcFKBP12* allele in *Δfpr1 S. cerevisiae* restores rapamycin sensitivity in contrast to the *rap8 PcFKBP12* allele

Within the *rap* collection mutant, only one mutant, named *rap8*, was identified with a mutation in FKBP12 (Table 1). However, the UV mutagenesis approach used is not targeted and a whole-genome resequencing of the *rap8* mutant showed 42 other mutations in its genome (Supporting Information Table S2). *P. chrysosporium* RP78 is a homokaryotic derivative of BKM-F-1767 (Martinez *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2000). To date, no sexually compatible strain is available to perform backcross experiment and remove additional mutations in *P. chrysosporium* RP78 genetic background. To bypass this bottleneck and determine if the mutation identified in *Pc*FKBP12 is responsible for resistance to rapamycin in the *rap8* mutant, functional complementation of Δ*fpr1 S. cerevisiae* strain was performed with the wild type and *rap8* allele of *Pc*FKBP12 (Fig. 5). In *S. cerevisiae*, deletion of the FPR1 gene confers resistance to rapamycin (Heitman *et al.*, 1991). The WT and *rap8* alleles of *Pc*FKBP12 were expressed in *S. cerevisiae* BY4741 control strain and Δ*fpr1* strain, under the control of the yeast *GAL1* promoter, which is repressed by glucose and induced by galactose (Giniger *et al.*, 1985; West *et al.*, 1984). The *S. cerevisiae* BY4741 control strain expressing the WT and *rap8 Pc*FKBP12 alleles were sensitive to rapamycin on media containing glucose or galactose. In the Δ*fpr1 S. cerevisiae* strain, expression of the WT allele of *PcFKBP12* restored rapamycin sensitivity in presence of galactose compared to glucose medium (Fig. 5). These results confirm that the expression of *P. chrysosporium* FKBP12 protein is responsible for the sensitivity phenotype to rapamycin of the yeast Δ*fpr1* strain, and that the K99 stop mutation in *rap8* mutant is responsible for the rapamycin resistance phenotype.

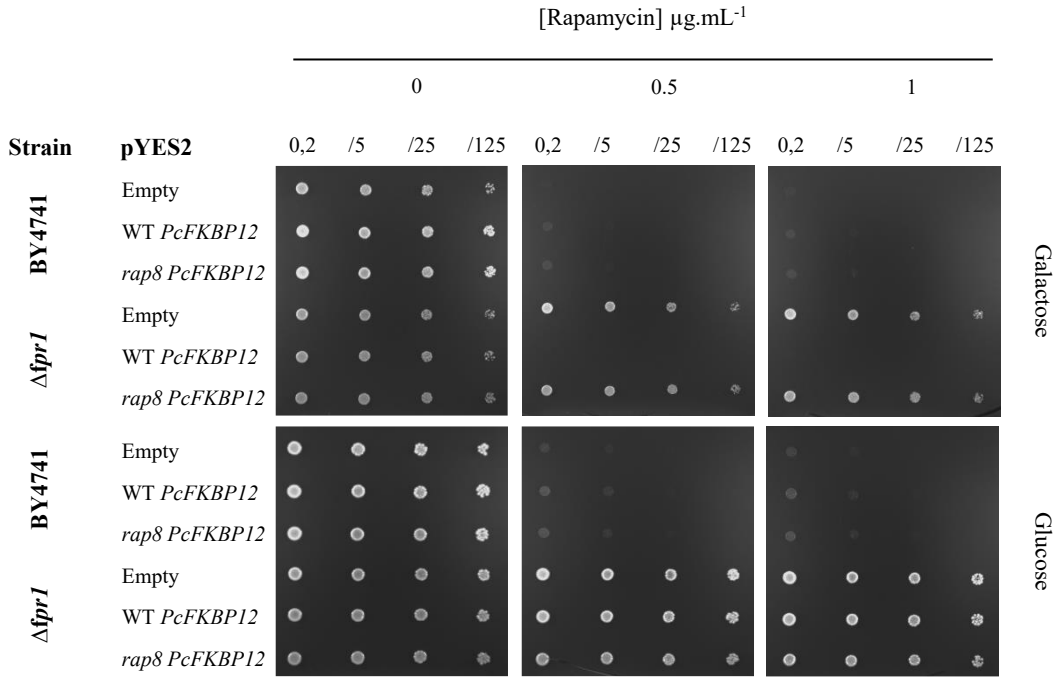


Figure 5. Expression of *PcFKBP12* allele in *Δfpr1 S. cerevisiae* restores rapamycin sensitivity in contrast to the *rap8 PcFKBP12* allele.
Expression of WT and *rap8 PcFKBP12* alleles were performed in *Δfpr1* rapamycin resistant strain and the BY4741 control strain of *S. cerevisiae*. Five-fold serial dilutions of yeast strains were spotted on media supplemented or not with rapamycin, and on YNB galactose and glucose media to induce and repress the expression of *PcFKBP12* alleles under the control of the yeast *GAL1* promoter.

4. Discussion and perspectives

Antifungal molecules can be divided into three groups, depending of their mode of action, such as toxin/toxicant, stressors, and toxin-stressors (Noel *et al.*, 2023). According to this classification, rapamycin, which is naturally produced by *Streptomyces hygroscopicus,* can be defined as a toxin because it has antifungal activity governed by a site specific mode of action (Choi *et al.*, 1996; Lorenz and Heitman, 1995). In number of eukaryotic species, rapamycin was shown to inhibit cellular growth through binding to the FKBP12 protein and FRB domain of TOR proteins, leading to the inhibition of the TOR signaling pathway. In this study, we investigated the mode of action of rapamycin in the wood decaying fungus *P. chrysosporium* by using a UV mutagenesis strategy combined to the screening of mutants resistant to rapamycin. Eight out of the 10 *rap* mutants of the collection showed mutations in FKBP12, TOR1 and TOR2 genes. These results suggest a conserved mechanism of rapamycin toxicity in *P. chrysosporium* and support the reliability of this strategy to identify targets of a toxin in this fungus. To date, the identification of molecular target(s) of toxin/toxicant has been mainly possible in the yeast model *S. cerevisiae* by the use of chemogenetic approaches such as the screening of yeast haploid/ homozygous diploid deletion strains and haploinsufficiency screening (Giaever *et al.*, 2002, 2004). However, these strategies are not widely used in other fungal species with specific lifestyles, like pathogens or wood decaying fungi, mainly because of the lack of genetic tools (Noel *et al.*, 2023). Here,

we show that UV mutagenesis combined to the screening of resistant mutants to an antifungal molecule could be a powerful strategy to study the mode of action of toxin in filamentous fungi for which genetic tools are still not available. Moreover, two mutants resistant to rapamycin do not contain mutations in the genes coding for rapamycin target proteins. This demonstrates that in the case of toxins this method opens also the identification of molecular actors not directly targeted by these molecules and which are involved in the resistance to toxic molecules.

In this study, we have characterized biochemically the orthologous protein to FKBP12/*Sc*FPR1 in *P. chrysosporium*. Previously, orthologue of *Sc*FPR1 in *P. chrysosporium* was identified by sequence homology (Nguyen *et al.*, 2020). Phylogenetic analysis of FPR family proteins confirmed that AGR57_8308, named *Pc*FKBP12, is the orthologous protein to *Sc*FPR1. Based on this, we confirmed that *Pc*FKBP12 is a functional peptidyl-prolyl isomerase and that rapamycin binds to this protein, leading to the inhibition of its activity. The functional complementation of the Δ*fpr1 S. cerevisiae* strain with the WT and *rap8* alleles of *Pc*FKBP12 showed that the mutation identified in *Pc*FKBP12 is the causative mutation responsible for rapamycin resistance in the *rap8* mutant. To determine if the *rap8* mutant resistant to rapamycin could be used as a genetic tool to study the TOR pathway in *P. chrysosporium*, the next step is to quantify the TOR Kinase activity. In eukaryotes, activity of the TORC1 complex can be evaluated by quantifying the rapamycin-sensitive phosphorylation state of RPS6 protein, which is phosphorylated by Ypk3, a direct target of the TORC1 complex (González *et al.*, 2015). To use this mutant as a genetic tool to study the TOR pathway, we need to validate first that the additional mutations present in the genome of the *rap8* mutant do not affect the activity of the TORC1 protein in control media such as nutrient-rich and nutrient-poor environments.

In *P. chrysosporium*, the TOR pathway is involved in conidia germination, vegetative growth and secretome composition (Nguyen *et al.*, 2020). In fungi, the central process named carbon catabolite repression (CCR) represses the expression of genes involved in the use of alternative carbon sources in presence of glucose (Brown *et al.*, 2014). This process is controlled by the conserved transcriptional factor Mig1 in *S. cerevisiae* and CreA/Cre1 in filamentous fungi. In *S. cerevisiae*, interplays between CCR and the TOR signaling pathway have been described at the level of AMPK/Snf1 and PKA pathways (Noël *et al.*, 2021). In Ascomycota filamentous fungi, two targets of the TOR kinase, SchA and SnfA have a synergistic role in the regulation of CreA (Brown *et al.*, 2013). The fact that the TOR signaling pathway could be linked to the CCR opens interesting perspectives for the study of the regulation of carbon acquisition in ligninolytic fungi (Noël *et al.*, 2021). We already showed that rapamycin alters the secretome composition of *P. chrysosporium* in media supplemented or not with glucose (Nguyen *et al.*, 2020). As the enzymes secreted by ligninolytic fungi are of a great interest for biotechnological applications, investigating the role of the TOR pathway in the regulation of these enzymes could help optimize their production. In this context, the use of *rap* mutants resistant to rapamycin and for which TOR kinase activity is not altered are promising tools to study interconnections between the TOR pathway and other signaling pathways in filamentous fungi during wood degradation.

Acknowledgments

We thank Professor Jean-Pierre Jacquot for his help and comments during manuscript preparation. We thank Dr. Benjamin Selles for his help to perform *in vitro* rotamase activity, we also thanks Anna Floyd-Averette for her help to perform complementation experiment in yeast.

This work was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). NDV was supported by a Doctoral Fellowship from the Ministry of Agriculture and Rural Development, Vietnam (Agricultural and Fisheries Biotechnology Program) and support from French ministry of foreign affair (program Campus France). DN was supported by a Doctoral grant from French ministry of higher education and research (MESR). FGA was supported by a postdoctoral grant from Region Grand Est.

References

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 403-410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Arevalo-Rodriguez, M., Wu, X., Hanes, S. D., and Heitman, J. (2004). Prolyl isomerases in yeast. Frontiers in Bioscience-Landmark, 9, Article 4. https://doi.org/10.2741/1405

Basenko, E. Y., Pulman, J. A., Shanmugasundram, A., Harb, O. S., Crouch, K., Starns, D., Warrenfeltz, S., Aurrecoechea, C., Stoeckert, C. J., Kissinger, J. C., Roos, D. S., and Hertz-Fowler, C. (2018). FungiDB : An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. Journal of Fungi, 4, Article 1. https://doi.org/10.3390/jof4010039

Bastidas, R. J., Shertz, C. A., Lee, S. C., Heitman, J., and Cardenas, M. E. (2012). Rapamycin Exerts Antifungal Activity In Vitro and In Vivo against Mucor circinelloides via FKBP12-Dependent Inhibition of Tor. Eukaryotic Cell, 11, 270-281. https://doi.org/10.1128/EC.05284-11

Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Chan, T.-F., Ai, W., and Zheng, X. F. S. (2002). Convergence of TOR-Nitrogen and Snf1-Glucose Signaling Pathways onto Gln3. Molecular and Cellular Biology, 22, 1246. https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1246-1252.2002

Brown, N. A., de Gouvea, P. F., Krohn, N. G., Savoldi, M., and Goldman, G. H. (2013). Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating Aspergillus nidulans hydrolytic enzyme production. Biotechnology for Biofuels, 6, 91. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-91

Brown, N. A., Ries, L. N. A., and Goldman, G. H. (2014). How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. Fungal Genetics and Biology: FG and B, 72, 48-63. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.012

Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., … Wong, E. D. (2012). Saccharomyces Genome Database : The genomics resource of budding yeast. Nucleic Acids Research, 40(Database issue), D700-705. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1029

Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. Science (New York, N.Y.), 273, 239-242. https://doi.org/10.1126/science.273.5272.239

Crespo, J. L., Daicho, K., Ushimaru, T., and Hall, M. N. (2001). The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in Saccharomyces cerevisiae. The Journal of Biological Chemistry, 276, 34441-34444. https://doi.org/10.1074/jbc.M103601200

Cruz, M. C., Cavallo, L. M., Görlach, J. M., Cox, G., Perfect, J. R., Cardenas, M. E., and Heitman, J. (1999). Rapamycin antifungal action is mediated via conserved complexes with FKBP12 and TOR kinase homologs in Cryptococcus neoformans. Molecular and Cellular Biology, 19, 4101-4112. https://doi.org/10.1128/MCB.19.6.4101

Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F. O., Baker, S. E., Barry, K., Bendiksby, M., Blumentritt, M., Coutinho, P. M., Cullen, D., de Vries, R. P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihrmark, K., Kauserud, H., … Watkinson, S. C. (2011). The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science (New York, N.Y.), 333, 762-765. https://doi.org/10.1126/science.1205411

Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., and Cherry, J. M. (2014). The reference genome sequence of Saccharomyces cerevisiae : Then and now. G3 (Bethesda, Md.), 4, 389-398. https://doi.org/10.1534/g3.113.008995

Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F. X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. Nature, 337, 476-478. https://doi.org/10.1038/337476a0

Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martínez, A. T., Otillar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Ferreira, P., Findley, K., … Hibbett, D. S. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. Science (New York, N.Y.), 336, 1715-1719. https://doi.org/10.1126/science.1221748

Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., … Johnston, M. (2002). Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. Nature, 418, Article 6896. https://doi.org/10.1038/nature00935

Giaever, G., Flaherty, P., Kumm, J., Proctor, M., Nislow, C., Jaramillo, D. F., Chu, A. M., Jordan, M. I., Arkin, A. P., and Davis, R. W. (2004). Chemogenomic profiling : Identifying the functional

interactions of small molecules in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 793-798. https://doi.org/10.1073/pnas.0307490100

Giniger, E., Varnum, S. M., and Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. Cell, 40, 767-774. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90336-8

González, A., Shimobayashi, M., Eisenberg, T., Merle, D. A., Pendl, T., Hall, M. N., and Moustafa, T. (2015). TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in Saccharomyces cerevisiae. PloS One, 10, e0120250. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120250

Harrison, R. K., and Stein, R. L. (1990). Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase : Evidence for catalysis by distortion. Biochemistry, 29, 1684-1689. https://doi.org/10.1021/bi00459a003

Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science (New York, N.Y.), 253, 905-909. https://doi.org/10.1126/science.1715094

Helliwell, S. B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M. N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. Molecular Biology of the Cell, 5, 105-118. https://doi.org/10.1091/mbc.5.1.105

Hentges, K. E., Sirry, B., Gingeras, A. C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., and Peterson, A. S. (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 13796-13801. https://doi.org/10.1073/pnas.241184198

Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences: CABIOS, 8, 275-282. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275

Joubert, A., Calmes, B., Berruyer, R., Pihet, M., Bouchara, J.-P., Simoneau, P., and Guillemette, T. (2010). Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. BioTechniques, 48, 399-404. https://doi.org/10.2144/000113399

Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., and Karplus, K. (2009). Improving physical realism, stereochemistry and side-chain accuracy in homology modeling : Four approaches that performed well in CASP8. Proteins, 77(Suppl 9), 114-122. https://doi.org/10.1002/prot.22570

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution, 33, 1870-1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. Cell, 73, 585-596. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90144-f

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Molecular Cell, 10, 457-468. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00636-6

Lorenz, M. C., and Heitman, J. (1995). TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. The Journal of Biological Chemistry, 270, 27531-27537. https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27531

Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., and Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. Nucleic Acids Research, 50(W1), W276-W279. https://doi.org/10.1093/nar/gkac240

Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus Phanerochaete chrysosporium strain RP78. Nature Biotechnology, 22, Article 6. https://doi.org/10.1038/nbt967

Meléndez, H. G., Billon-Grand, G., Fèvre, M., and Mey, G. (2009). Role of the Botrytis cinerea FKBP12 ortholog in pathogenic development and in sulfur regulation. Fungal Genetics and Biology: FG and B, 46, 308-320. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.11.011

Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J.-P., and Gelhaye, E. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. Microbial biotechnology, 6, 248-263. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12015

Nagy, L. G., Riley, R., Bergmann, P. J., Krizsán, K., Martin, F. M., Grigoriev, I. V., Cullen, D., and Hibbett, D. S. (2017). Genetic Bases of Fungal White Rot Wood Decay Predicted by Phylogenomic Analysis of Correlated Gene-Phenotype Evolution. Molecular Biology and Evolution, 34, 35-44. https://doi.org/10.1093/molbev/msw238

Nguyen, D. V., Roret, T., Fernandez-Gonzalez, A., Kohler, A., Morel-Rouhier, M., Gelhaye, E., and Sormani, R. (2020). Target Of Rapamycin pathway in the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. PloS One, 15, e0224776. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224776

Niles, B. J., Joslin, A. C., Fresques, T., and Powers, T. (2014). TOR complex 2-Ypk1 signaling maintains sphingolipid homeostasis by sensing and regulating ROS accumulation. Cell Reports, 6, 541-552. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.040

Noël, D., Nguyen, D. V., and Sormani, R. (2021). Chapter Five - How to rot : A role for TOR. Interplay between carbon catabolite repression and TOR signaling pathway. In M. Morel-Rouhier and R. Sormani (Éds.), Advances in Botanical Research (Vol. 99, p. 151-173). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.002

Ohm, R. A., Riley, R., Salamov, A., Min, B., Choi, I.-G., and Grigoriev, I. V. (2014). Genomics of wood-degrading fungi. Fungal Genetics and Biology: FG and B, 72, 82-90. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.05.001

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

Sehgal, S. N., Baker, H., and Vézina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. The Journal of Antibiotics, 28, 727-732. https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.727

Selles, B., Dhalleine, T., Boutilliat, A., Rouhier, N., and Couturier, J. (2021). A Redox-Sensitive Cysteine Is Required for PIN1At Function. Frontiers in Plant Science, 12. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.735423

Shertz, C. A., Bastidas, R. J., Li, W., Heitman, J., and Cardenas, M. E. (2010). Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. BMC Genomics, 11, 510. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-510

Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C., and Robaglia, C. (2007). Saccharomyces cerevisiae FKBP12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. BMC Plant Biology, 7, 26. https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-26

Stajich, J. E., Harris, T., Brunk, B. P., Brestelli, J., Fischer, S., Harb, O. S., Kissinger, J. C., Li, W., Nayak, V., Pinney, D. F., Stoeckert, C. J., and Roos, D. S. (2012). FungiDB : An integrated functional genomics database for fungi. Nucleic Acids Research, 40(Database issue), D675-681. https://doi.org/10.1093/nar/gkr918

Stewart, P., Gaskell, J., and Cullen, D. (2000). A Homokaryotic Derivative of a Phanerochaete chrysosporium Strain and Its Use in Genomic Analysis of Repetitive Elements. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1629-1633.

Stracka, D., Jozefczuk, S., Rudroff, F., Sauer, U., and Hall, M. N. (2014). Nitrogen source activates TOR (target of rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. The Journal of Biological Chemistry, 289, 25010-25020. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574335

The UniProt Consortium. (2023). UniProt : The Universal Protein Knowledgebase in 2023. Nucleic Acids Research, 51(D1), D523-D531. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052

Tien, M., and Kirk, T. K. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds. Science (New York, N.Y.), 221, 661-663. https://doi.org/10.1126/science.221.4611.661

Vézina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. The Journal of Antibiotics, 28, 721-726. https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.721

Weisman, R., and Choder, M. (2001). The fission yeast TOR homolog, tor1+, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. The Journal of Biological Chemistry, 276, 7027-7032. https://doi.org/10.1074/jbc.M010446200

West, R. W., Yocum, R. R., and Ptashne, M. (1984). Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 divergent promoter region : Location and function of the upstream activating sequence UASG. Molecular and Cellular Biology, 4, 2467-2478. https://doi.org/10.1128/mcb.4.11.2467-2478.1984

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. Cell, 124, 471-484. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016

Yu, F., Gu, Q., Yun, Y., Yin, Y., Xu, J.-R., Shim, W.-B., and Ma, Z. (2014). The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in Fusarium graminearum. The New Phytologist, 203, 219-232. https://doi.org/10.1111/nph.12776

Zheng, X. F., Florentino, D., Chen, J., Crabtree, G. R., and Schreiber, S. L. (1995). TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. Cell, 82, 121-130. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90058-6

Table S1. Classification of PPIase domains in Ascomycota and Basidiomycota species based on the four PPIase domains identified in *S. cerevisiae*. The indexing was performed from phylogenetic analysis conducted on PPIase domain (Fig. 1A).

Phylum	Species	Type I	Type II	Type III-IV	Total
Ascomycota	*Brettanomyces naardenensis*	VEU20043.1		VEU19301.1	2
	Morchella conica CCBAS932	RPB09046.1	RPB11418.1	RPB08682.1	3
	Cyberlindnera jadinii NRRL Y-1542	XP_020072820.1	XP_020071601.1	XP_020071906.1	3
	Kazachstania naganishii CBS 8797	XP_022466259.1	XP_022464938.1	XP_022463340.1	3
	Lachancea thermotolerans CBS 6340	XP_002552033.1	XP_002554254.1	XP_002553435.1	3
	Metschnikowia bicuspidata var. bicuspidata NRRL YB-4993	XP_018712213.1	XP_018709424.1	XP_018712623.1	3
	Pichia membranifaciens NRRL Y-2026	XP_019015745.1	XP_019016971.1	XP_019017379.1	3
	Tetrapisispora phaffii CBS 4417	XP_003686108.1	XP_003684591.1	XP_003684267.1	3
	Zygosaccharomyces mellis	GCF00302.1	GCF00130.1	GCE98639.1	3
	Zygosaccharomyces rouxii	XP_002498256.1	XP_002497983.1	XP_002495577.1	3
	Schizosaccharomyces pombe	SPBC839.17c		SPBC1347.02/ SPAC27F1.06c	3
	Trichoderma harzianum	PNP50388.1/ KKP07330.1	KKP01968.1	KKP02652.1	4
	A. fumigatus A1163	AFUB_078170/ AFUB_098990	AFUB_020940	AFUB_074540	4
	Penicillium rubens Wisconsin 54-1255	PCH_Pc13g06110/ PCH_Pc13g08320	PCH_Pc18g05040	PCH_Pc12g11330	4
	Candida glabrata	XP_448641.1	XP_446873.1	XP_449267.1/ XP_449373.1	4
Basidiomycota	*Ceraceosorus bombacis*	CEH12114.1	CEH14556.1		2
	Serpula lacrymans var. lacrymans S7.9	XP_007319670.1	XP_007317458.1		2
	Leucosporidium creatinivorum	ORY47584.1	ORY47584.1	ORY87392.1	3
	Apiotrichum porosum	XP_028477495.1	XP_028480058.1	XP_028478896.1	3
	Cryptococcus gattii VGIV IND107	KIR84534.1	KIR85872.1	KIR89395.1	3
	Sparassis crispa	XP_027615764.1	XP_027611560.1	XP_027612307.1	3
	Meira miltonrushii	XP_025353299.1	XP_025351578.1	XP_025353092.1	3
	Phanerochaete chrysosporium RP-78	AGR57_8308	AGR57_6957	AGR57_14610	3
	Rhizopogon vinicolor AM-OR11-026	OAX40949.1	OAX37365.1	OAX44120.1	3
	Coprinopsis cinerea okayama7#130	CC1G_04343	CC1G_02351	CC1G_01915	3
	Armillaria ostoyae	SJL17677.1/ SJL12559.1/ SJL07572.1	SJK97079.1	SJK97568.1	5
	Coniophora puteana RWD-64-598 SS2	XP_007772209.1	XP_007766793.1/ XP_007766373.1/ XP_007766794.1	XP_007766490.1	5
	Pleurotus ostreatus PC15	KDQ27909.1/ KDQ25570.1	KDQ31927.1/ KDQ27495.1	KDQ28042.1	5

Table S2. Summary of the mutations identified in the genome of the *rap8* mutant.

Gene identifier	Identity of scaffold	Position of a base in the reference sequence	Base in reference sequence	Alternative/ mutant base	Region of DNA which is affected by the change	Amino acid according to reference	Resulting substitution
AGR57_978.1	scaffold_1	2014140	C	T	CDS	S	F
AGR57_184.1	scaffold_1	381847	G	A	CDS	T	I
AGR57_2477.1	scaffold_2	1997151	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_2137.1	scaffold_2	1254968	T	C	CDS	I	T
AGR57_2137.1	scaffold_2	1254969	C	G	CDS	I	T
AGR57_3208.1	scaffold_3	603384	G	A	CDS	S	L
AGR57_3812.1	scaffold_3	1940559	T	C	CDS	H	R
AGR57_3380.1	scaffold_3	956228	C	T	3'UTR		
AGR57_3847.1	scaffold_3	2005431	C	A	3'UTR		
AGR57_3027.1	scaffold_3	236361	T	A	CDS	E	V
AGR57_3925.1	scaffold_3	2222969	G	A	CDS	A	V
AGR57_3884.1	scaffold_3	2100647	C	A	intronic/noncoding		
AGR57_4463.1	scaffold_4	938824	G	A	CDS	D	N
AGR57_5703.1	scaffold_5	1296384	G	A	CDS	P	S
AGR57_5462.1	scaffold_5	768560	T	C	CDS	Y	H
AGR57_6330.1	scaffold_6	417493	A	T	intronic/noncoding		
AGR57_7315.1	scaffold_7	489300	C	T	CDS	G	N
AGR57_7315.1	scaffold_7	489301	C	T	CDS	G	N
AGR57_7565.1	scaffold_7	1112691	G	T	CDS	G	V
AGR57_8308.1	scaffold_8	545533	T	A	CDS	K	*
AGR57_8307.1	scaffold_8	545533	T	A	3'UTR		
AGR57_8904.1	scaffold_8	1770197	A	G	intronic/noncoding		
AGR57_9574.1	scaffold_9	1408801	C	T	5'UTR		
AGR57_9574.1	scaffold_9	1408840	C	T	5'UTR		
AGR57_9574.1	scaffold_9	1408842	C	T	5'UTR		
AGR57_9889.1	scaffold_10	244728	C	T	intronic/noncoding		
AGR57_10000.1	scaffold_10	549474	T	G	CDS	V	G
AGR57_10695.1	scaffold_11	688350	T	C	CDS	Q	R
AGR57_10797.1	scaffold_11	883699	T	A	3'UTR		
AGR57_11148.1	scaffold_12	222596	G	A	CDS	P	L
AGR57_11228.1	scaffold_12	476142	G	C	CDS	G	A
AGR57_11169.1	scaffold_12	266479	C	T	intronic/noncoding		
AGR57_11169.1	scaffold_12	266818	T	C	intronic/noncoding		
AGR57_11482.1	scaffold_12	992281	T	G	intronic/noncoding		
AGR57_11797.1	scaffold_13	411797	G	T	CDS	M	I
AGR57_12474.1	scaffold_14	684383	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_12502.1	scaffold_14	751208	T	G	intronic/noncoding		
AGR57_13274.1	scaffold_16	415490	T	G	CDS	Y	S
AGR57_14130.1	scaffold_19	281097	A	G	CDS	S	G
AGR57_14379.1	scaffold_20	317897	C	T	CDS	D	N
AGR57_14516.1	scaffold_21	288979	C	T	CDS	A	T
AGR57_14531.1	scaffold_21	313557	T	C	CDS	M	V
AGR57_14627.1	scaffold_22	147569	G	A	CDS	S	L

CDS: coding sequence

UTR: untranslated region

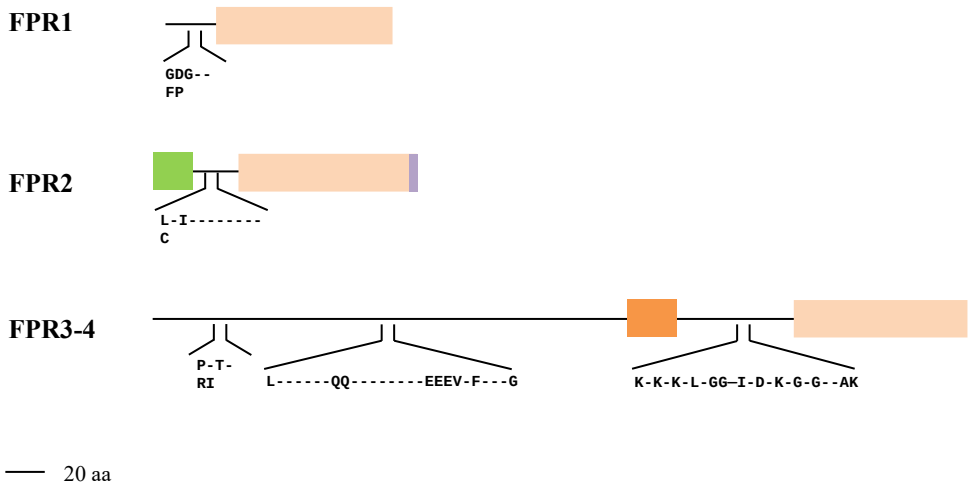


Figure S1. Schematic representation of FPR family proteins in Ascomycota and Basidiomycota phyla. Sequences grouped in PPIase domain type I, type II and type III-IV clusters were used to identify conserved motifs specific to the FPR1, FPR2 and FPR3-4 sequences. For all FPR, a conserved PPIase domain was identified and is displayed by a beige rectangle. Conserved amino acids specific to each FPR proteins are displayed. Peptide and retention signals to endoplasmic reticulum were identified in FPR2 sequences and are displayed respectively by green and purple rectangles. Nuclear localization signal was identified in FPR3-4 sequences and is displayed by orange rectangle.

Chapitre II : Caractérisation de mutants de *P. chrysosporium* résistants aux extractibles de bois de *B. guianensis*

Pour se développer, les champignons dégradeurs de bois sécrètent un ensemble d'enzymes responsables de la dépolymérisation et de la dégradation des polymères du bois (Riley *et al.*, 2014; Rytioja *et al.*, 2014). Cela conduit à la libération d'un ensemble de composés aromatiques incluant des produits issus de la dégradation de la lignine et des molécules appelées extractibles. Ces molécules présentent un intérêt particulier dû à leurs propriétés antifongiques décrites dans la littérature (Schultz et Nicholas, 2000). Bien que de nombreux composés issus du bois ont été mis en évidence avec des propriétés antifongiques, leurs mécanismes d'action restent encore très peu décrits. A l'heure actuelle, les activités antifongiques des extractibles sont expliquées par cinq modes d'actions : une capacité de piégeage des métaux et des radicaux libres, une interaction directe avec des enzymes impliquées dans la dégradation du bois, une perturbation de la paroi et de la membrane plasmique, une perturbation de l'homéostasie ionique et une activité chaotropique (Valette *et al.*, 2017).

Face aux contraintes imposées par leur environnement et leur substrat, les champignons dégradeurs de bois ont mis en place un ensemble de réponses, incluant à la fois un système d'adaptation et de détoxication, pour se développer en présence de ces composés (Morel *et al.*, 2013; Noel *et al.*, 2023). Cependant, un manque d'outils génétiques développé chez les Basidiomycètes restreint la majorité de nos connaissances aux Ascomycètes (Demuyser et Van Dijck, 2019). Afin de remédier à ces limites et de faciliter l'identification des mécanismes d'action de molécules antifongiques et des acteurs moléculaires impliqués dans la résistance à ces composés, une méthode de mutagénèse par UV combinée à l'utilisation de séquençage à haut débit a été développée au laboratoire (Nguyen, 2020). Contrairement aux méthodes de chemogénomique développées majoritairement chez des Ascomycètes, cette méthode a pour avantage d'être applicable à des organismes fongiques non-modèles pour lesquels les outils génétiques ne sont pas disponibles pour effectuer des études fonctionnelles.

Dans cette étude, une banque de mutants résistants aux extractibles de *B. guianensis*, a été générée par mutagénèse par UV et un séquençage entier du génome de deux mutants a été effectué. Cette stratégie a permis de mettre en évidence un gène muté commun entre ces deux mutants. Le séquençage ciblé de ce gène au sein de la collection de mutants a ensuite permis de valider la présence de mutation faux sens au sein de ce gène parmi 26 mutants sur 34. Plus précisément, 15 mutants de la collection contiennent la même substitution au sein de la protéine codée par ce gène. Les conséquences de cette mutation ont été étudiées de manière fonctionnelle en exprimant l'allèle mutant contenant cette mutation dans la souche sauvage de *P. chrysosporium* RP78 et a permis de valider son rôle dans l'acquisition de résistance aux molécules antifongiques. Grâce à des analyses phylogénétiques, nous avons identifié que

la protéine codée par ce gène est une protéine orthologue à la protéine DENND6 humaine. Les protéines DENND activent de petites protéines appelées RAB GTPases par une activité d'échange de GDP en GTP (GEF pour Guanine nucleotide Exchange Factor) ce qui permet de réguler des voies du trafic membranaire (Fig. 42) (Marat *et al.*, 2011).

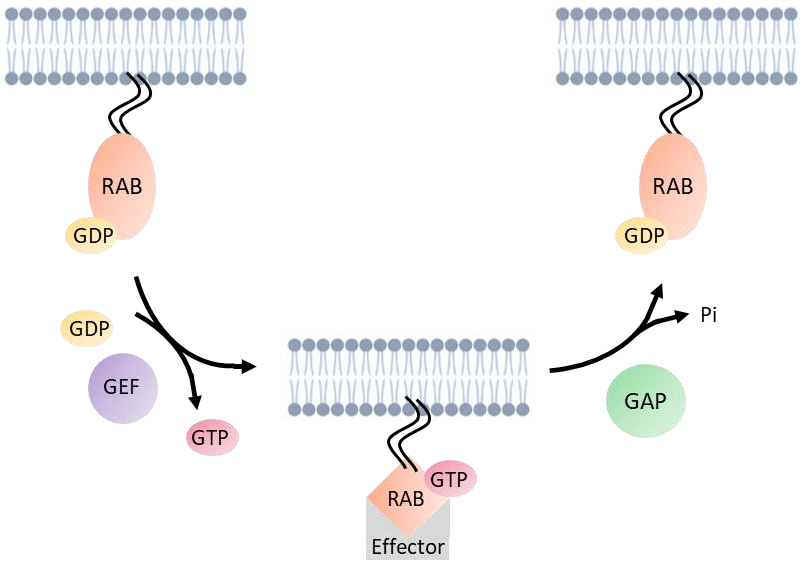


Figure 42. Représentation schématique du cycle d'activation et d'inactivation des RAB GTPases par l'activité de leur familles partenaires régulatrices : les GEFs et les GAPs. Dans leur état inactif, les RAB GTPases sont attachées à la membrane d'un compartiment dans un état lié au GDP. Ces protéines sont activées grâce à l'action de protéines GEF qui catalysent le retrait de GDP résultant en la fixation de GTP. Une fois liées au GTP, les RAB GTPases sont activées et capables de recruter différents effecteurs permettant la régulation du trafic membranaire. Enfin, les GAPs complètent le cycle des RAB GTPases par l'activation de leur fonction GTPase. Les RAB GTPases se retrouvent ainsi dans un état lié au GDP et deviennent inactives (adapté de Hutagalung et Novick, 2011).

En complément des systèmes d'adaptation et de détoxication des champignons dégradeurs de bois, cette étude met en évidence le rôle d'une protéine impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire dans l'acquisition de résistance à des extractibles de bois. Les résultats sont présentés ci-dessous sous la forme d'un projet d'article qu'il faudra compléter avec des données complémentaires.

Article n°4 : Forward genetics approach to identify mutants of *Phanerochaete chrysosporium* resistant to wood extractives from *Bagassa guianensis* Aubl leads to the identification of mutations in the DENND6 coding gene

Noel Delphine*, Nguyen Duy Vuong*, Fernandez-Gonzalez Antonio, Schwartz Mathieu, Gelhaye Eric, Morel-Rouhier Mélanie, Sormani Rodnay

* co-first authors

Article en cours de préparation.

Forward genetics approach to identify mutants of *Phanerochaete chrysosporium* resistant to wood extractives from *Bagassa guianensis* Aubl leads to the identification of mutations in the DENND6 coding gene

Authors

Noel Delphine[a*], Nguyen Duy Vuong[a*], Fernandez-Gonzalez Antonio[a], Schwartz Mathieu[a1], Gelhaye Eric[a], Morel-Rouhier Mélanie[a], Sormani Rodnay[a]

* co-first authors

[a] Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000, Nancy, France

[1] Present address: Université de Bourgogne-Franche Comté, CNRS, INRA, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 21065 Dijon, France

Corresponding author: Rodnay Sormani

Unité Mixte de Recherches 1136 Université de Lorraine/INRAE

Interactions Arbres / Micro-organismes

Faculté des sciences, entrée 1B, 3éme étage

Bd des aiguillettes

54500 VANDOEUVRE-Lès-NANCY

France

Mail: rodnay.sormani@univ-lorraine.fr

Tel: + 33 3 72 74 51 59

Abstract

During wood degradation, fungi have to deal with toxic and stressful compounds called wood extractives. To adapt to this environment, rot fungi have developed various detoxification strategies, which are currently known from the Xenome. However, the lack of genetic tools in basidiomycetes limits our progress in identifying potential molecular targets of these molecules and new molecular actors involved in their detoxification. To circumvent this problem, we propose to use a direct genetic strategy, which we have developed in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In this study, a library of *P. chrysosporium* RP78 UV mutants was generated and screened for strains resistant to *Bagassa guianensis* wood extractives. Interestingly, genetic driven resistance to these extractives confers the ability to *P. chrysosporium* to mineralize *B. guianensis* wood. This resistance is due to causal mutation(s) in the gene coding for an ortholog of the human DENND6 protein. In human, this protein is involved in endocytic recycling, suggesting the potential identification of a new detoxification process of extractives in rot fungi. This study highlights the efficiency of this strategy to improve our understanding of the mechanisms of resistance to antifungal molecules in rot fungi and provides the first genetic evidence that extractives are involved in wood durability.

Keywords
Phanerochaete chrysosporium, white-rot fungi, *Bagassa guianensis*, forward genetic screen, wood extractives.

1. Introduction

Identification of new fungicides appears as a priority for the protection of agricultural crops against pathogenic fungi, and the success of therapeutic strategies to threat fungal infections in humans. This is necessary as (i) fungicide-resistant fungal strains are emerging, and (ii) the restrictions in use for some of the compounds currently used could represent a risk for human health and environment (Burks *et al.*, 2021; Preston, 2000). Plants contain a large diversity of compounds with potential antifungal properties (Deresa and Diriba, 2023). In particular, compounds from wood, named extractives, are involved in wood durability against biotic attacks, acting as stressors and/or toxins in ligninolytic fungi (Kirker *et al.*, 2013; Valette *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2012). Five modes of action have been proposed for extractives. Some compounds can chelate metals and free radicals preventing activity of some enzymes, some can physically interact with some extracellular and intracellular enzymes, some can disrupt cell wall and plasma membrane,some can alter ion homeostasis, and some can act as as chaotropes (Valette *et al.*, 2017). Deciphering the modes-of-action of antifungals is complex sometimes due to the diversity of the cellular damage caused and the diversity of responses implemented by fungi to detoxify or expel the compound and/or limit the damage via stress responses and adaptations (Fernández-González *et al.*, 2018; Kowalczyk *et al.*, 2019; Shimizu *et al.*, 2005; Noel *et al.*, 2023).

Chemogenetics is a powerful approach to identify molecular targets of antifungals. This approach, which is based on the screening of libraries of gene deletion mutants, has been developed in the ascomycete fungal models *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* (Barazandeh *et al.*, 2022; Brown *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018). However, it was shown that data from model fungi cannot be reliably extrapolated to fungi with specific lifestyles (Brown *et al.*, 2014). The combination of UV mutagenesis approach and high-throughput sequencing, is a promising strategy to identify molecular targets or proteins involved in the resistance and/or detoxification of antifungal molecules in fungi distantly related to *S. cerevisiae*. This strategy was used to identify new actors involved in the ligninolytic system of *Pleurotus ostreatus* and in the sclerotial melanization of *Sclerotinia sclerotiorum* (Nakazawa *et al.*, Xu *et al.*, 2022).

In this study, we used this combined approach to generate mutants of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* that are resistant to *Bagassa guianensis* wood extractives (BWE), and identified the causative mutation responsible for the resistance phenotype. *B. guianensis* is a tree belonging to the Moraceae family with economic value in French Guiana. It is classified as a durable species, mainly because of its extractives that contain compounds with antifungal properties (Perrot *et al.*, 2018, 2020; Royer *et al.*, 2012). We showed that BWE inhibit both growth and conidial germination of the wild type strain of *P. chrysosporium*. We generated some mutants resistant to BWE and showed that these mutants are able to use *B. guianensis* wood sawdust as a substrate, contrary to the wild type strain. The causative

mutation responsible for this phenotype is located in a gene encoding a DENND6 protein, an orthologue of the human DENND6 protein that is involved in endocytic recycling (Linford *et al.*, 2012). The putative role of this protein in BWE resistance is discussed.

2. Materials and methods

Preparation of *Bagassa guianensis* wood extractives and fungal growth conditions

Heartwood of *Bagassa guianensis* Aubl. was retrieved from Degrad Saramaca's sawmill at Kourou in French Guiana. Samples were ground to fine sawdust (0.2 to 0.4 mm) before to be Soxhlet-extracted successively during 24 h using acetone. Acetone was then evaporated and dried extractives were stored at -18 °C before use. The Bagassa Wood Extractives (BWE) were resuspended in DMSO at a final concentration of 100 mg/mL.

The homokaryotic strain *Phanerochaete chrysosporium* RP78 was used in this study. Genomic resources for this strain are available within the Mycocosm web portal of the Joint Genome Institute database (Martinez *et al.*, 2004; Ohm *et al.*, 2014). Wild-type and mutated strains were maintained on solid malt agar medium (MA) (malt extract (20 $g.L^{-1}$) agar (30 $g.L^{-1}$)) for storage. For phenotype screening on solid medium, MA was supplemented with 100 $\mu g.mL^{-1}$ of BWE or DMSO as a control. For the antibiogram assays, Whatman paper discs were impregnated with BWE (from 100 µg to 1000 µg) or DMSO as a control.

Mutagenesis of *P. chrysosporium* conidia and screening for BWE resistant strains

Conidia of *P. chrysosporium* RP78 were obtained after 5 days of fungal culture at 37 °C on solid sporulation medium (10 $g.L^{-1}$ glucose, 10 $g.L^{-1}$ malt extract, 2 $g.L^{-1}$ peptone from potato, 2 $g.L^{-1}$ yeast extract, 1 $g.L^{-1}$ asparagine, 2 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$.7H2O, 1 $mg.L^{-1}$ thiamine HCl, 30 $g.L^{-1}$ agar). Conidia were directly irradiated on plates with UV light for 30 seconds. They were resuspended in sterile water and filtered with Miracloth. The conidia concentration was determined by measuring the optical density at 650 nm as previously described (Tien and Kirk, 1983). 10,000 conidia were then plated on MA medium supplemented with 100 $\mu g.mL^{-1}$ of BWE and incubated at 37 °C until the growth of individual mycelia. Mycelia were cultivated again on sporulation medium supplemented with 100 $\mu g.mL^{-1}$ of BWE and 10,000 conidia were inoculated in 10 mL of malt extract (10 $g.L^{-1}$) supplemented with 50 $\mu g.mL^{-1}$ of BWE. Single conidia progenies were then isolated and cultivated on sporulation medium supplemented with 100 $\mu g.mL^{-1}$ of BWE. Conidia from this medium were used as mutant lines called *bag* mutants for further experiments.

Conidial germination measurements by nephelometry

Conidial germination of *P. chrysosporium* WT and *bag* mutant strains was followed using a nephelometric reader (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany). Conidia were

obtained from 8 day-old mycelia grown on sporulation medium through a gentle scraping of the agar plates and filtration through Miracloth. 10,000 conidia were resuspended in 200 µL of malt extract (10 $g.L^{-1}$) in presence or absence of BWE (from 10 to 50 $\mu g.mL^{-1}$) and incubated in the nephelometric reader at 37 °C for 72 h. Relative nephelometric unit (RNU) values were calculated as previously described (Joubert *et al.*, 2010).

CO_2 measurements

CO_2 measurements were performed for *P. chrysosporium* WT and the *bag4* mutant strains grown on *B. guianensis* sawdust. Glass vials were filled with 2 grams of sawdust (0.5-2 mm particles) impregnated with 5 mL of TK minimal medium (5 mM sodium acetate, pH 4.5, 1 % glucose, 0.2 $g.L^{-1}$ ammonium tartrate, tween 1.8 %, 0.1 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$, 2 $g.L^{-1}$ KH_2PO4, 0.5 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$, 1 $mg.L^{-1}$ thiamine, 44.5 $mg.L^{-1}$ $MnCl_2$, 70.2 µL veratryl alcohol, 3.5 % (vol/vol) trace medium [3 $g.L^{-1}$ nitrilotriacetate, 6 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$, 2 $g.L^{-1}$ NaCl, 0.2 $g.L^{-1}$ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 $g.L^{-1}$ $CoCl_2$, 0.2 $g.L^{-1}$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 $g.L^{-1}$ $CuSO_4$, 20 $mg.L^{-1}$ $AlK(SO_4) \cdot 12H_2O$, 20 $mg.L^{-1}$ H_3BO_3, 20 $mg.L^{-1}$ $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$]) (Tien and Kirk, 1988). Two fungal plugs were inoculated by vial and incubated at 25 °C. Carbon mineralisation was followed by CO_2 measurements using a carbometer (LAMBDA laboratory instruments). Measurements were performed every 3 or 4 days and the air in the sample was renewed by atmospheric air using a sterile filter (0.2 µM). Values of CO_2 were obtained in % and converted in µmol of CO_2 using the formula of ideal gas law ($nCO_2 = (P(CO_2) * V) / (R * T)$) with $P(CO_2)$ the atmospheric pressure (101 325 Pa), V = 150 mL (includes a 120 mL volume for the flask and 30 mL for pipes), R = 8,314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$, and T = 25 °C. Quantity of CO_2 (in µmol) was multiplied by % of measured CO_2. Values were then converted in mg of CO_2 released.

Genomic DNA purification and sequencing

Genomic DNA extractions were performed from 3 day-old liquid cultures using QIAGEN DNeasy plant kit. DNAseq was performed at the GeT-PlaGe core facility, INRAE Toulouse. DNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols using the Illumina TruSeq DNA PCR-free HT Library Prep Kit. Briefly, DNA was fragmented by sonication, size selection was performed using SPB beads (kit beads) and adaptors were ligated to the fragments to be sequenced. Library quality was assessed using an Advanced Analytical Fragment Analyzer and libraries were quantified by qPCR using the Kapa Library Quantification Kit. DNA-seq experiments were performed on an Illumina MiSeq3000 using a paired-end read length of 2x250 bp with the Illumina MiSeq3000 Reagent Kits.

Single nucleotide polymorphism (SNP) identification

All short reads from high-throughput sequencing were mapped to the reference genome of *P. chrysosporium* RP78 v2.2 (Martinez *et al.*, 2004; Ohm *et al.*, 2014), available at https://genome.jgi.doe.gov/Phchr2/Phchr2.home.html, using BWA (Li and Durbin, 2009). The VCF file

containing the called SNPs was built with SAMtools (Li, 2011). SNPs were identified by filtering, frequencies calculation, and visualization with SHOREmap v3.5 (Sun and Schneeberger, 2015).

Analysis of mutations in AGR57_7124 alleles

The AGR57_7124 gene sequences were amplified by PCR with Gotaq G2 Flexi DNA polymerase from the genomic DNAs of the wild-type *P. chrysosporium* strain and the *bag* mutant collection. Reactions were performed in a final volume of 20 µL including 1X green Gotaq Flexi Buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.16 mM dNTP, 0.1 µM forward and reverse primers, 50 ng of gDNA and 0.01 U/µl Gotaq G2 Flexi. The sequences were amplified with the following primers (for : 5'ATGGGTGTCACTGTCGAGG3' and rev : 5'CTCGAACTTGAGCGTCGA3'). PCR was run as follows: 2 min at 95 °C, followed by 34 repetition cycles composed of 30 s at 95 °C, 30 s at 55 °C and 1 min 30 s at 72 °C. PCR products were visualized on agarose gel and purified using PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, UK). Purified PCR products were cloned in pGEM-T vector according to manufacturer instructions (promega A1360, USA). Purified recombinant plasmids were sequenced using T7P and SP6 universal primers (GENEWIZ, UK).

Transformation of *P. chrysosporium*

Open reading frame (ORF) of AGR57_7124 gene was synthetized to remove BsaI and BpiI restriction sites in DNA sequence (GeneCust compagny). The design of the synthetic gene was done to make it suitable with Golden Gate vectors (BpiI compatible overhangs 5'AATG/ggTTCG3'). The open reading frame of AGR57_7124 was cloned into the Golden Gate level 0 vector pAGM1287 by digestion and ligation reactions (Weber *et al.*, 2011) (SynBio@TSL website). To generate the main mutant allele of AGR57_7124 (GAA>AAA at position 976 in coding DNA sequence leads to Glu326Lys in protein sequence), site directed plasmid mutagenesis was performed from recombinant Golden Gate level 0 vector with ORF of AGR57_7124 using Pfu polymerase. Mutagenesis was performed with the following primers (for : 5'TGTCTCTTGCTCTGCAAACCAATACTGGTATAC3' and rev : 5'GTATACCAGTATTGGTTTGCAGAGCAAGAGACA3') (Agilent technologies). DNA sequences were then verified by sequencing of recombinant Golden Gate level 0 vectors (Genewiz compagny). To confirm expression of the proteins of interest, the ORF of mCherry was fused to the ORFs of AGR57_7124 (BsaI compatible overhangs 5'AATG/ggTTCG3'; 35S promoter and octopine synthase terminator) into the Golden Gate level 1 vector pICH47761. To select transformants of *P. chrysosporium*, Golden Gate level 2 vectors pAGM4723 were built with three transcriptional units as follows: phosphinothricin marker resistance (35S promoter, phosphinothricin CDS, octopine synthase terminator), cytosolic marker (35S promoter, GFP CDS, octopine synthase terminator), and the construct to express the protein coded by AGR57_7124 gene (35S promoter, AGR57_7124 CDS, mCherry CDS, octopine synthase terminator). Final constructs into Golden Gate level 2 vectors pAGM4723 were verified by digestion with DraIII restriction enzyme and used to transform

Agrobacterium tumefaciens GV3101 (pMP90) strain. *P. chrysosporium* transformations were done according to Sugui *et al.*, 2005. Briefly, conidia were cultivated for 24 h at 28 °C in presence of a 24 h old suspension of *A. tumefaciens* strains treated with acetosyringone at 200 µM for 2 h. Then conidia were plated on TK medium with 100 µM of phosphinothricine and 200 µM of cefotaxime. Plates were incubated at 37 °C until the growth of individual mycelium. Then mycelia were subcultured on fresh new plates with phosphinothricine and cefotaximine.

Phylogenetic analysis of DENN Domain proteins in fungal, plant and animal kingdoms.

All human DENND protein sequences were retrieved from Uniprot (The UniProt Consortium, 2023) using protein IDs reviewed in Marat *et al.*, 2011. DENND protein sequences of *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as well as AGR57_7124 protein sequence from *P. chrysosporium* were used as bait (Supporting Information Table S3). Orthologous DENND protein sequences were retrieved in fungi (*Morchella importuna CCBAS932 v1.0, Aspergillus nidulans, Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255, Trichoderma reesei QM6a, Magnaporthe oryzae 70-15 v3.0, Neurospora crassa OR74A v2.0, Podospora anserina, Candida albicans SC5314, Saccharomyces cerevisiae S288C, Schizosaccharomyces pombe, Melampsora lini CH5, Ustilago maydis 521 2,0, Coniophora puteana v1.0, Gloeophyllum trabeum v1.0, Phanerochaete chrysosporium RP-78 v2.2, Pleurotus ostreatus PC15 v2.0, Rhizopogon vinicolor AM-OR11-026 v1.0, Serpula lacrymans S7.9 v2.0, Trametes versicolor v1.0, Cryptococcus neoformans var. grubii H99*) and plants (*Physcomitrella patens v3.3, Selaginella moellendorffii v1.0, Oryza sativa v7_JGI, Populus trichocarpa v3.0, Arabidopsis thaliana TAIR10, Chlamydomonas reinhardtii v5.5*) from Mycocosm and Phytozome web portals of the Joint Genome Institute using BlastP (Goodstein *et al.*, 2012; Grigoriev *et al.*, 2014) and in animals (*Homo sapiens, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Mus musculus*) from NCBI database. Sequences with E-value > 10^{-5} were eliminated. The sequences were then analyzed on ScanProsite database (de Castro *et al.*, 2006) to define the sequence of the DENN domain from full length sequences. Phylogenetic analyses were conducted from sequences of DENN domain using MEGA 7.0.26 software (Kumar *et al.*, 2016). The analysis involved 149 amino acid sequences and was done from 500 bootstrap test. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 1522 positions in the final dataset. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length is of 82,30730681. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method (Jones *et al.*, 1992) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site.

3D models of *Pc*DENND6 and *Pc*Rabba calculated with AlphaFold

3D structure predictions of *Pc*DENND6 and *Pc*RABba GTPase were carried out with the AlphaFold algorithm implemented in the ColabFold webserver (https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/) (Mirdita *et al.*, 2022). The full-length sequences of *Pc*DENND6 and *Pc*RABba were used for the 3D prediction. The best ranked models had global pLDDTs (predicted local distance difference test) >75 on a scale 0 – 100. For both proteins, the calculated models showed high confidence in all the structured regions (pLDDT > 90 %). For *Pc*DENND6, the regions Met1-His94 (N-terminal), Thr487-Glu545 (loop in the dDENN domain) and Thr597-Pro611 (C-terminal) were predicted disordered as judged by their low pLDDT (< 50 %). To obtain a putative model of complex between *Pc*DENND6 and *Pc*RABba, the two structures were individually superimposed onto their homologous counterparts present in the complex between *Pc*DENND1B and RAB35 GTPase (pdb 3TW8) (Wu *et al.*, 2011). The obtained complex did not show severe clashes. The structures were analyzed using the Pymol visualizing software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.).

3. Results

Bagassa guianensis* wood extractives inhibit conidial germination and hyphal growth of *Phanerochaete chrysosporium

The effect of BWE was tested on radial growth of *P. chrysosporium* using both antibiogram assays (Fig. 1A) and colony diameter measurements on solid BWE-containing medium (Fig. 1B). The antibiograms revealed that a quantity of 300 µg on patches prevents hyphal growth (Fig 1A). When incorporated within the culture medium, BWE decreased fungal growth by 60 % at a concentration of 100 $\mu g.mL^{-1}$ of BWE after 3 days of culture and completely inhibited fungal growth at 200 $\mu g.mL^{-1}$ (Fig. 1B).

Germination of *P. chrysosporium* conidia was followed by nephelometry in presence of increasing concentrations of BWE (Fig. 1C). A concentration of 20 $\mu g.mL^{-1}$ BWE allowed conidial germination but at reduced speed compared to control. Germination was completely abolished from 30 $\mu g.mL^{-1}$ BWE. Altogether, these data confirmed the antifungal properties of acetonic extracts of BWE against *P. chrysosporium.*

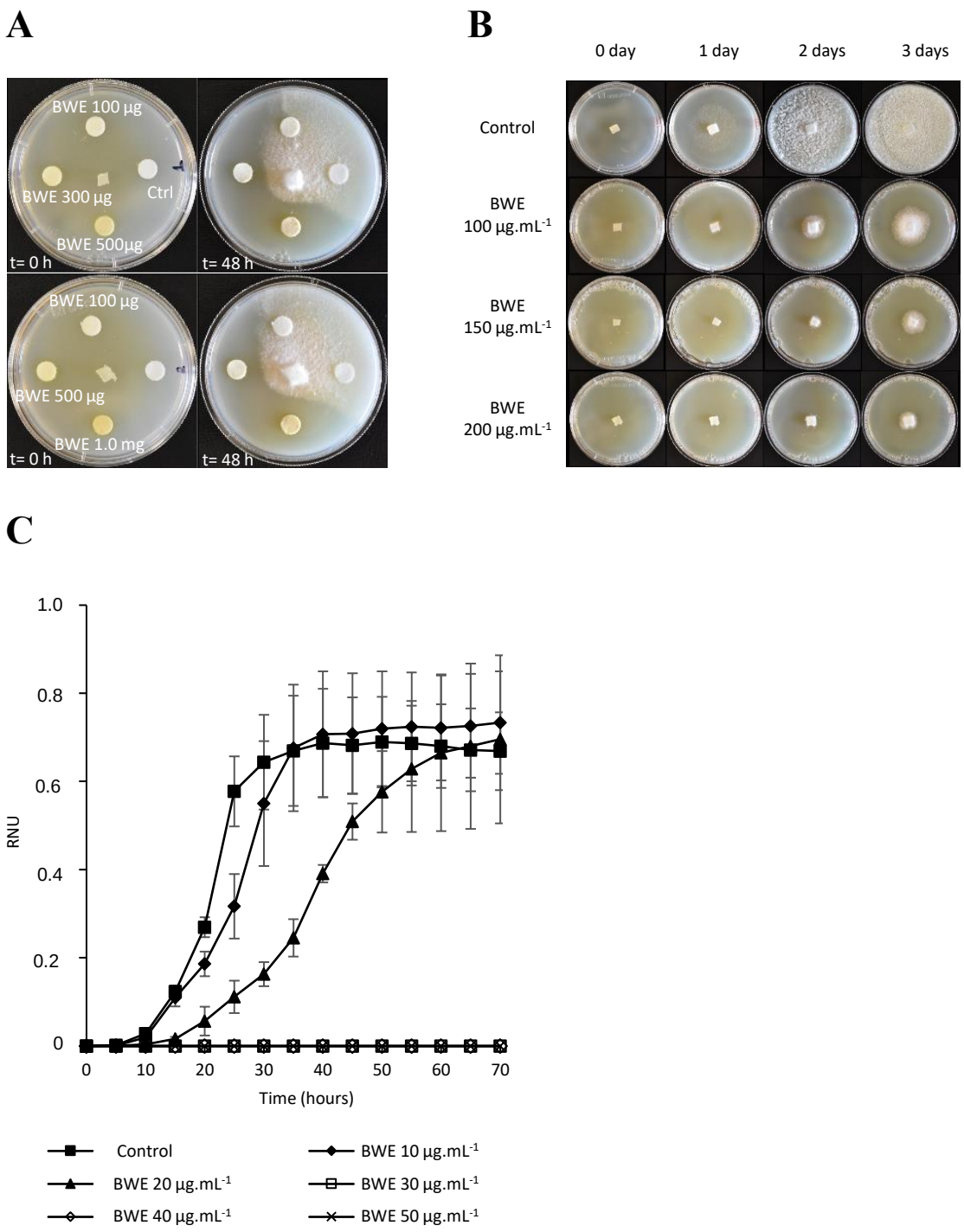


Figure 1. Effect of acetonic *Bagassa guianensis* wood extractives (BWE) on hyphal growth and conidial germination of *P. chrysosporium* RP78.

A. Inhibition of hyphal growth of *P. chrysosporium* RP78 in response to BWE using antibiogram assays. Assays were performed with Whatman papers impregnated with different quantities of BWE (100 µg, 300 µg, 500 µg and 1000 µg) or with 10 µl of DMSO as control. Pictures were taken before incubation and after 48 hours of growth at 37 °C.

B. Inhibition of hyphal growth of *P. chrysosporium* RP78 in response to BWE. A plug of *P. chrysosporium* RP78 was placed at the center of MA medium supplemented or not with different

concentrations of BWE (100 µg.mL^{-1}, 150 µg.mL^{-1}, 200 µg.mL^{-1}). Fungal cultures were incubated at 37 °C for 3 days.

C. Inhibition of *P. chrysosporium* germination in response to BWE. Germination of conidia was followed during 72 hours at 37 °C in MA medium supplemented with different concentrations of BWE or with DMSO as control. Fungal growth was measured in RNU for Relative Nephelometric Unit. Standard deviation was calculated from 9 and 3 technical replicates for control and BWE conditions, respectively.

bag mutants are more resistant to BWE than the wild type strain

After mutagenesis of *P. chrysosporium* conidia by UV, 50 fungal colonies were isolated on a selective medium containing 100 µg.mL^{-1} BWE. These mutants were named *bag* mutants (*bag1* to *bag50)*. The growth of 31 of them was further compared to the growth of the wild type strain in presence of 100 µg.mL^{-1} BWE (Fig 2A). All of them exhibited a better growth than the wild type after 4 days (Fig. 2A). Among them, the *bag2* and *bag4* mutants exhibited the highest growth rates in presence of 100 µg.mL^{-1} BWE, and *bag23* and *bag31* were the most resistant, being able to develop in presence of 200 µg.mL^{-1} BWE (data not shown).

Conidia of the *bag2*, *bag4*, *bag23*, *bag31* and the other randomly selected *bag1* mutant were produced and collected. Their germination was followed by nephelometry in a control medium without BWE (Fig. 2B) and in presence of 30 µg.mL^{-1} BWE (Fig. 2C). In absence of BWE, similar growth patterns were observed between the *bag* mutants and the WT strain (Fig. 2B). In presence of 30 µg.mL^{-1} BWE, conidial germination was fully inhibited for both the WT and the *bag23* mutant, whereas conidia of *bag1*, *bag2*, *bag4* and *bag31* mutants were able to germinate (Fig. 2C).

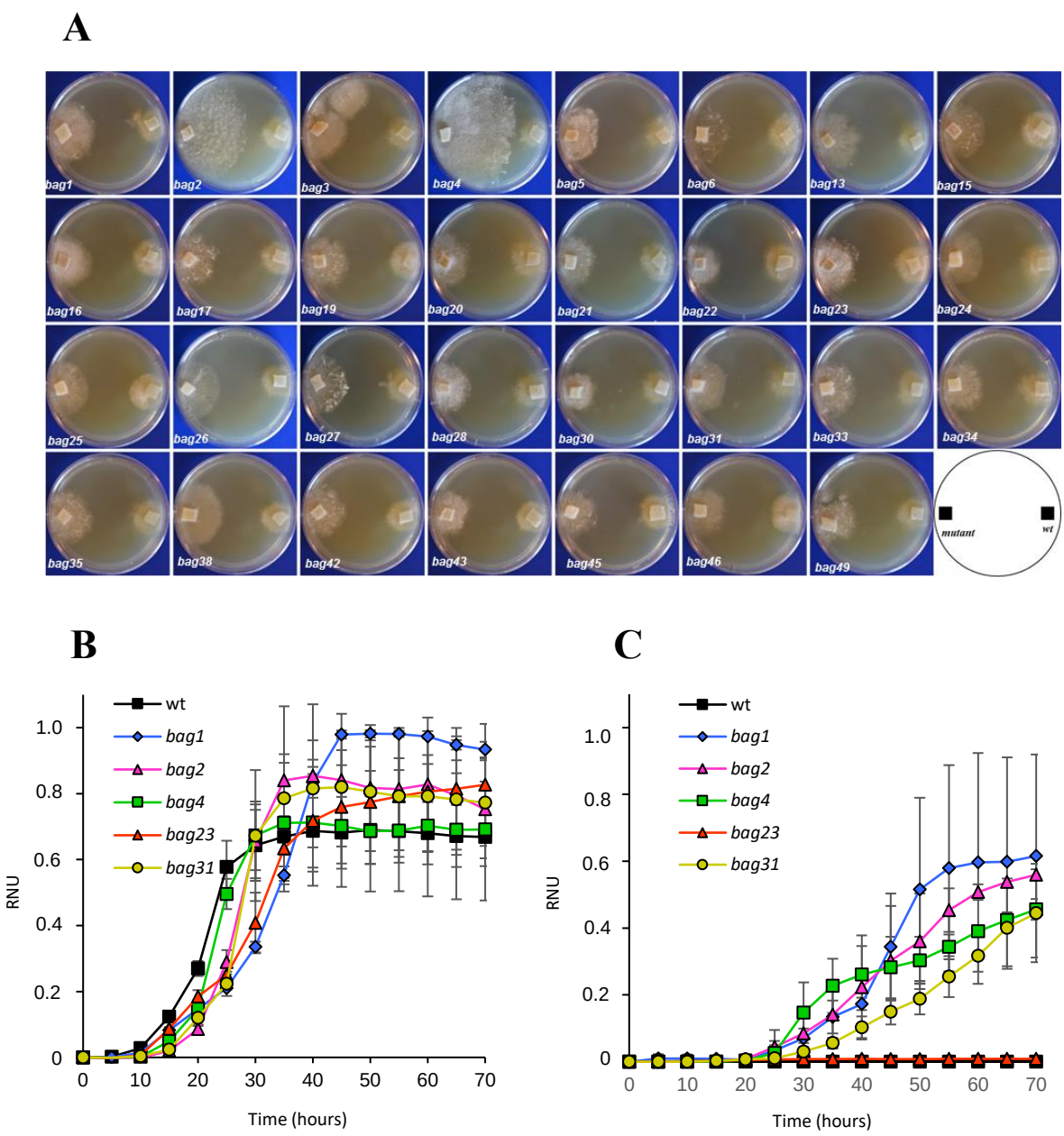


Figure 2. Resistance phenotype of *bag* mutants to BWE.

A. Hyphal growth of *bag* mutants in comparison to the wild type strain on MA medium supplemented with 100 µg.mL^{-1} of BWE.

B. C. Conidial germination of WT, *bag1*, *bag2*, *bag4, bag5, bag23* and *bag31* strains in control condition (without extractives) (B) and in presence of BWE at 30 µg.mL^{-1}(C). The concentration at 30 µg.mL^{-1} of BWE has been chosen as reference because of complete inhibition of the WT strain at this concentration (Fig. 1C). Standard deviation was calculated from 3 technical replicates.

***bag* mutants release more CO_2 from *B. guianensis* wood sawdust than the wild type strain**

To determine whether the resistance of the *bag* mutants to BWE has an impact on their capabilities to degrade wood, the amount of CO_2 released from *B. guianensis* wood sawdust by the WT and the *bag4* mutant strains was quantified over 6 months (Fig. 3). For the WT strain, cumulative CO_2 emissions were below 12 mg of CO_2 along the kinetics, suggesting that the WT strain is not able to use *B. guianensis* wood sawdust as substrate. For the mutant strain *bag*4, the release of CO_2 was higher than the WT strain from day 8, and was constant over time. The cumulative amount of CO_2 emission reached 635 mg after 6 months. These results demonstrate the ability of the *bag4* mutant to use *B. guianensis* wood as substrate, contrary to the WT strain, and suggest that the resistance of the *bag4* mutant to BWE confers an advantage to this strain for *B. guianensis* wood degradation.

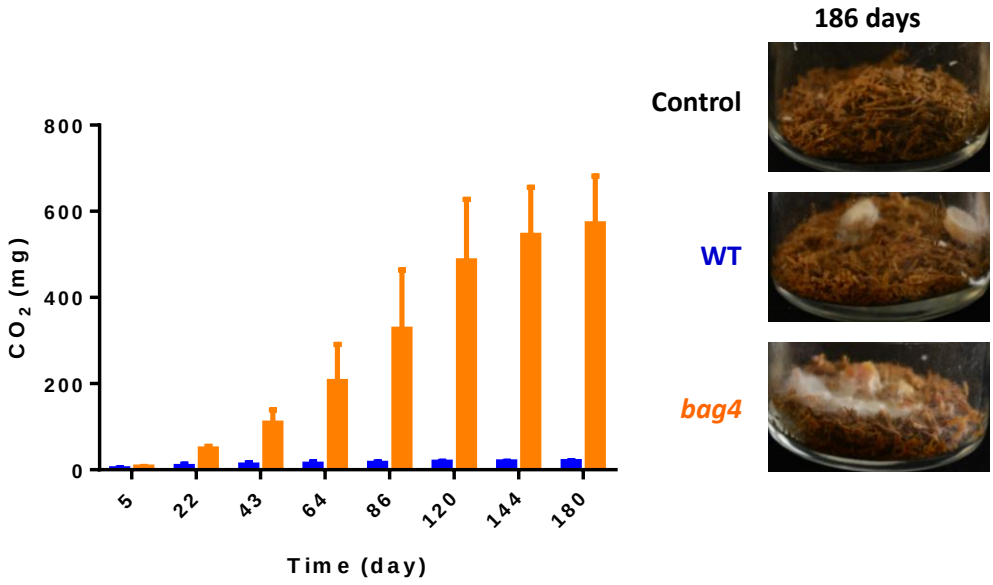


Figure 3. Mineralisation of *B. guianensis* wood by the WT and the *bag4* mutant strains.
The fungal strains were incubated at 25 °C during 180 days and the CO_2 released was quantified using a carbometer. The values of CO_2 were converted in mg and are displayed in time points of the mineralisation process. The WT strain is displayed by blue bars and the *bag4* mutant by orange bars. Standard deviation was calculated from 2 technical replicates for both the WT and *bag4* mutant strains.

Identification of the causative mutation for BWE resistance in *bag* mutants

To identify the causative mutation responsible for BWE resistance of the *bag* mutants, the two *bag4* and *bag31* mutants were selected for whole-genome re-sequencing. A total of 1006 and 1301 SNPs were identified respectively in the genomes of the *bag4* and *bag31* mutants in comparison to the WT reference genome. Among these SNPs, 50 and 64 correspond to non-synonymous mutations for *bag4* and *bag31* mutants respectively (Table S1 and S2). These SNPs were identified in 46 genes for the *bag4* mutant and 54 genes for the *bag31* mutant (Table S1 and S2). Only one common SNP (C to T; scaffold 7 at position 104070) was found in both genomes and is located in the gene named AGR57_7124 in the

Fungidb database. This mutation led to an amino acid substitution, replacing a glutamic acid by a lysine (E326K) (Fig. 4A). To determine if this mutation is present in the genomes of the other mutants of the *bag* collection, the AGR57_7124 gene was amplified from the genomic DNA of 34 of the *bag* mutants resistant to BWE and sequenced (Fig. 4B). Among them, 26 mutants showed mutations in the AGR57_7124 gene and for 15 of them, the mutation corresponds to the E326K substitution.

These results allowed us to propose the AGR57_7124 gene as a relevant putative candidate involved in the resistance phenotype to BWE. To test this hypothesis, the WT allele and the mutated allele producing the E326K variant of AGR57_7124 gene were expressed in the *P. chrysosporium* WT strain. The transformants were selected on phosphinothricin-containing medium. The expression of the cassette was confirmed by fluorescence detection of GFP as a cytosolic marker and of mCherry that was fused to AGR57_7124 gene (data not shown) (see Material and methods for details). The growth of these transformants (T-AGR57_7124 expressing the WT allele of the gene, and T-*bag4* AGR57_7124 expressing the E326K variant) was analyzed in presence of 100 $\mu g.mL^{-1}$ of BWE, in comparison with the WT and *bag4* mutant strains (Fig. 4C). In this condition, only the transformant expressing the mutated allele, and the *bag4* mutant were able to grow. This confirms that the resistance of *P. chrysosporium* to BWE is due to the production of the E326K-variant protein.

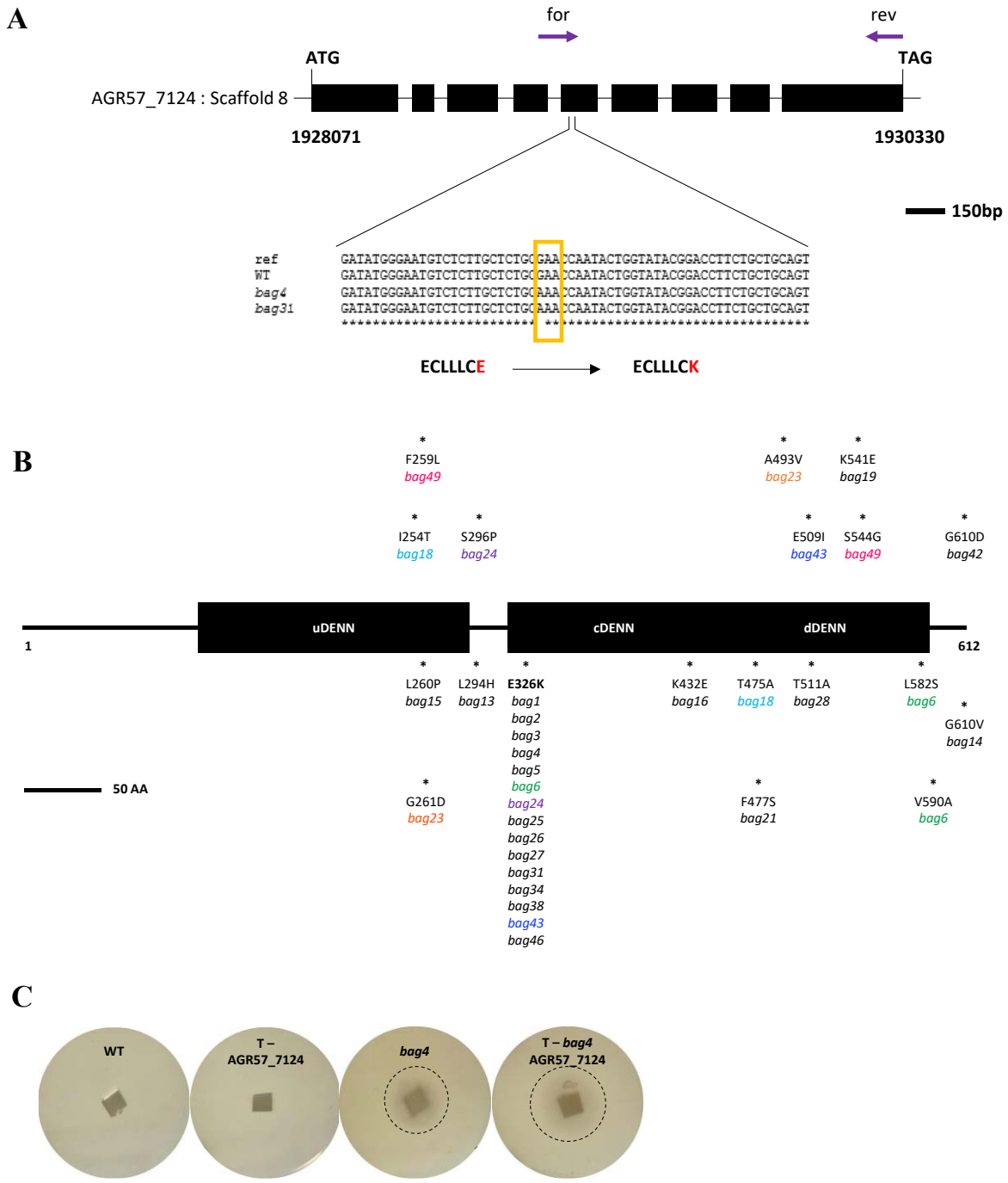


Figure 4. Identification of causative mutations in the gene AGR57_7124.

A. Graphical mapping of AGR57_7124 gene with the causative mutation located at the position 1929046 (G->A) on scaffold 8 (1928071 – 1930330).

B. Schematic representation of *Pc*DENND6 protein with the corresponding substitutions identified in the *bag* mutant collection. The DENN Domain is tripartite and composed of 3 modules as upstream DENN (uDENN), central DENN (cDENN) and downstream DENN (dDENN). Substitutions are represented by an asterisk with the name of the associated mutant.

C. Growth phenotypes of *P. chrysosporium* transformants expressing the mutant and the WT alleles of AGR57_7124 gene in comparison to the WT and the *bag4* mutant strains. The transformants expressing the mutant and the WT alleles of AGR57_7124 are named T-*bag4* AGR57_7124 and T-AGR57_7124

respectively, with the T letter for transformant. Fungal strains were cultivated at 25 °C in agar medium supplemented with 100 µg.mL^{-1} of BWE and pictures were taken after 3 days of growth.

AGR57_7124 codes for a DENND6 protein

AGR57_7124 encodes a protein containing a Domain with Unknown Function 1630 (DUF1630). The protein coded by this gene was thus named *Pc*DUF1630. Using the ScanProsite database, this domain was identified as a DENN Domain (Differentially Expressed in Normal and Neoplastic cells Domain) (de Castro *et al.*, 2006). In human, DENND proteins are part of a multigenic family composed of 18 genes coding for 55 proteins. Human DENND proteins cluster into eight families named DENND1, DENND2, DENND3, DENND4, DENND5, DENND6, MTMR and MADD (Marat *et al.*, 2011). These proteins belong to a family of Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF), whose all members are activators of Rab GTPases.

The human DENND and *Pc*DUF1630 protein sequences were used as baits to retrieve all DENND proteins in *S. cerevisiae*, *Sc. pombe* and *A. thaliana* species. These sequences were then used to retrieve orthologous DENND proteins in 20 fungal species, 6 plant species and 4 animal species. The phylogenetic analysis of these sequences showed that they group into 13 clusters including the eight human DENND families (Fig. 5). *Pc*DUF1630 protein sequence is found in the DENND6 cluster, which contains sequences from animal, plant and Basidiomycota species, suggesting that the AGR57_7124 encodes an orthologous protein of the human DENND6 and is thus named *Pc*DENND6.

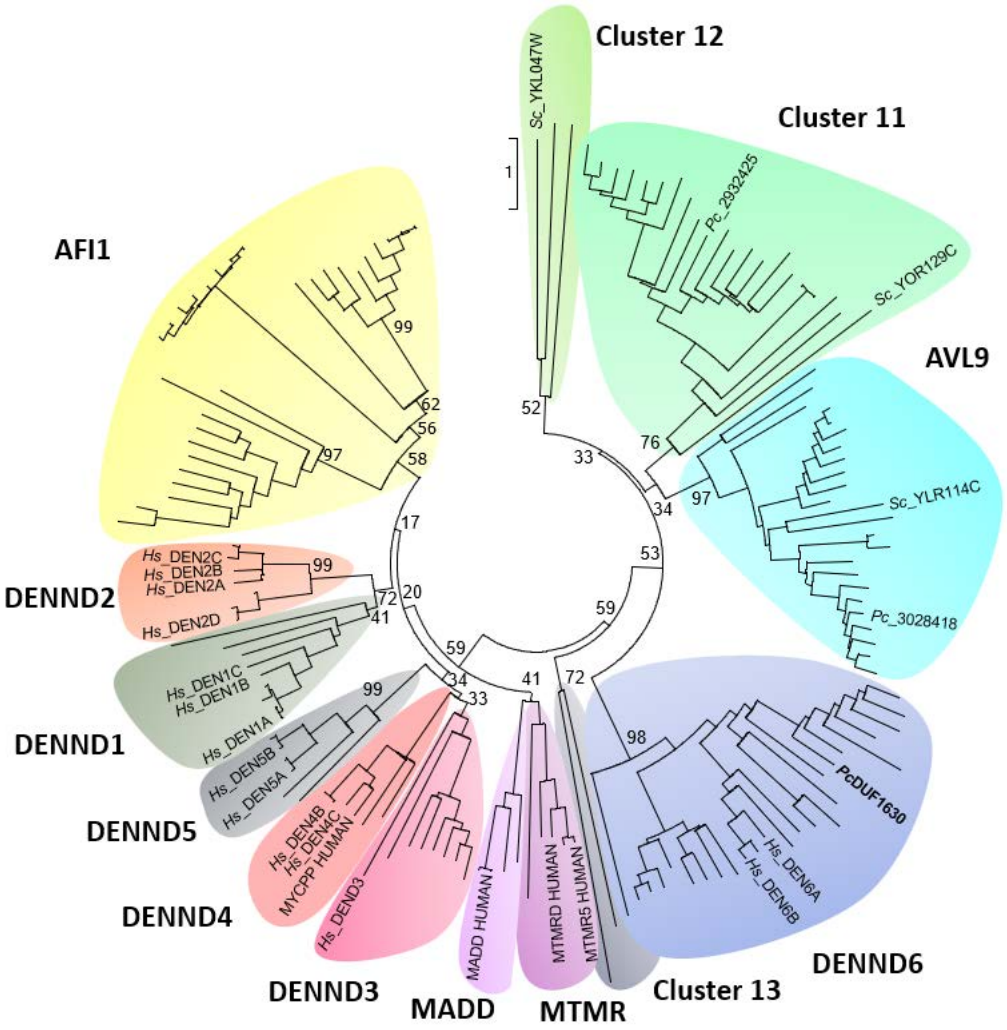


Figure 5. Evolutionary relationships of DENN Domain families in fungal, plant and animal kingdoms.

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method and computed using the JTT matrix-based method in the Mega7 software (Jones *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2016; Saitou and Nei, 1987). Human sequences are indicated and were used as reference to define DENND families in the phylogenetic tree (Marat *et al.*, 2011). Branches without human DENND sequences were named according to reviewed sequences (The UniProt Consortium, 2023). IDs of DENND sequences retrieved in *S. cerevisiae* and *P. chrysosporium* are displayed in the phylogenetic tree.

The E326K mutation is located in the *Pc*DENND6 protein at the interaction site with Rab-GTPase proteins

The structure of PcDENND6 is predicted to have the typical fold of GEF proteins

The overall predicted fold of *P. chrysosporium* DENND6 corresponds to a central beta sheet surrounded by alpha helices in a bi-lobed fashion, as previously described for this family of proteins (Wu *et al.*, 2011). The core DENN domain (cDENN) and the upstream DENN domain (uDENN) stack together with tight contacts, and the downstream DENN domain (dDENN) covers the cDENN domain with a last alpha helix pointing towards the solvent (Fig. 6A). This predicted model was used as template to

search against the Protein Databank for structural homologs using the PDBeFold tool (Krissinel and Henrick, 2004). The best homologs were the GEF domain of DENND1B in complex with RAB35 GTPase (PDB 3TW8, rmsd of 2.39 Å for 296 aligned alpha carbons) and the GEF domain of DENND1A in complex with RAB GTPase (PDB 6EKK, rmsd of 2.50 Å for 293 alpha carbons).

The amino acids that are mutated in the *Pc*DENND6 sequence of the *bag* mutants were mapped onto the modeled structure (Fig. 6A). Eight mutations are located in the disordered region at the C-terminus of the downstream DENN domain (not represented in the figure because only well-structured predicted regions are shown). In the uDENN and the dDENN domains, the mutations are mainly found in loops or at the surface of the protein. In the cDENN domain, two mutations (E326K and K432E) lead to a change of charge at the surface of the protein. Interestingly, the residue E326 is involved in two hydrogen bonds with the side chains of H400 (from the cDENN domain) and R573 (from the dDENN domain) and is probably important for the stabilization of the cDENN and the dDENN domains together. The mutation of E326 to a positively charged lysine residue in the mutant E326K may destabilize the two domains.

To compare both structures in the region near E326, a structural superimposition of the modeled structure of *Pc*DENND6 with DENND1B (PDB 3TW8) was performed (Fig. 6B). In the structure of DENND1B, this region corresponds to the interaction interface between DENND1B and the GTPase. DENND1B (cyan) interacts with the RAB35 GTPase (yellow) via several non-covalent interactions including one H-bond between RAB35:R79 and DENND1B:H192 at the C-terminal end of helix 6 (Fig. 6C). In the modeled structure of *Pc*DENND6, the equivalent helix bears the acidic E326 residue at the same position than R194 in DENND1B (residue at the interaction interface with the GTPase) (Fig. 6B). In human, DENND6 activates RAB14 (Lindford *et al.*, 2012). By searching orthologues of RAB14 in the *P. chrysosporium* genome (version 2.2 on Mycocosm web portal of the Joint Genome Institute), RABba was identified (protein ID : 2973368). A hypothetical model of the complex between *Pc*DENND6 and *Pc*RABba, was proposed based on the structure of the GEF domain of DENND1B in complex with GTPase RAB35 (PDB 3TW8) (Fig. 6D). In this model, the side chain of R82 from *Pc*RABba is close to the region of residue E326. Additionally, the motif 'YYRGA' containing this R82 residue is conserved in both human and *P. chrysosporium* RAB GTPase sequences. From these results, we suggest that this region is probably important for the complex formation between *Pc*DENND6 and RAB GTPase.

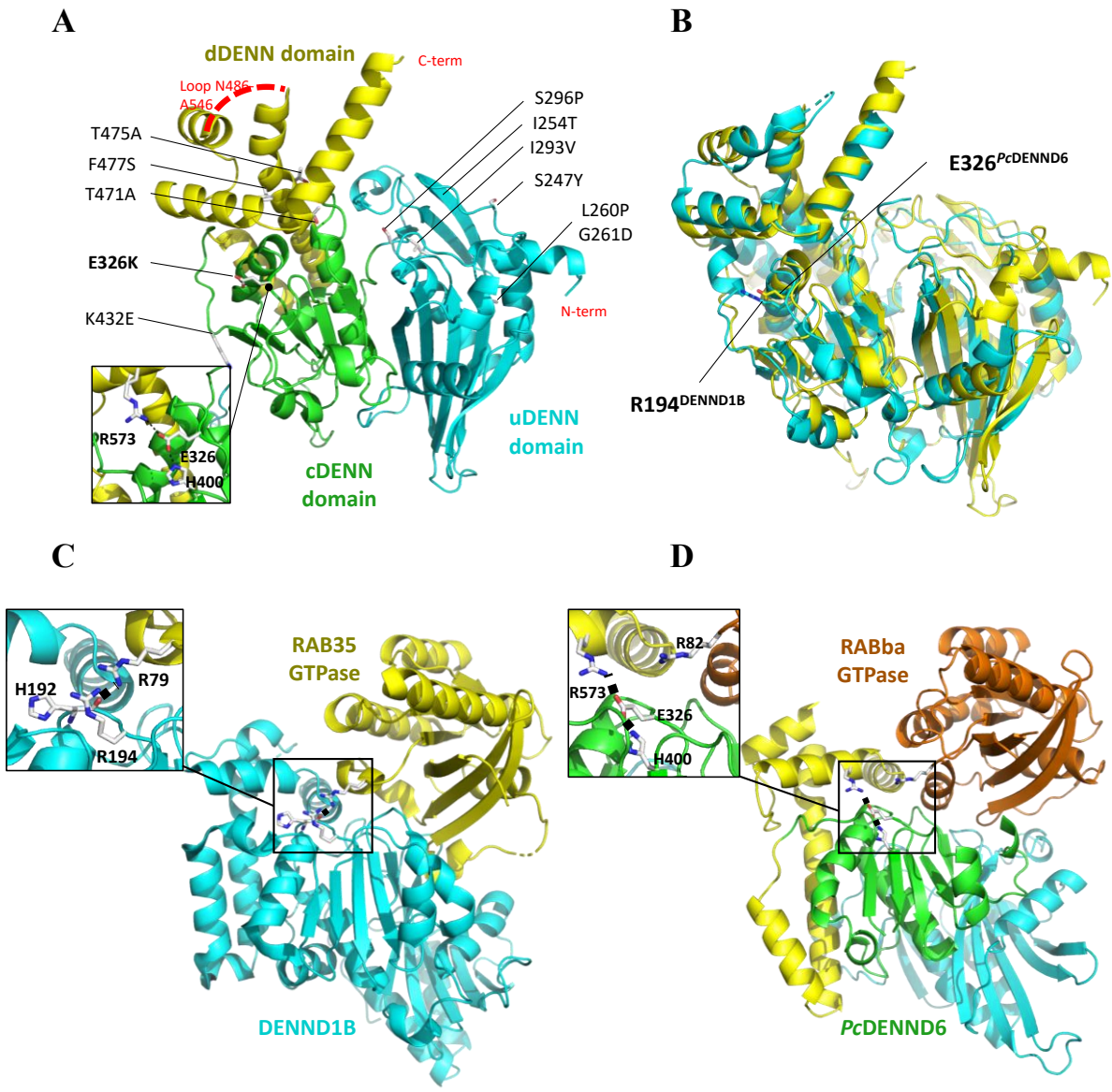


Figure 6. Modeled structure of *Pc*DENND6 with the mutations identified in *bag* mutants and in complex with a potential RAB GTPase partner.

A. Structure of *Pc*DENND6 and mapping of amino acid mutations identified in the *bag* mutant collection. The three modules of the DENN Domain were identified and are represented : the upstream domain (uDENN), the core domain (cDENN) and the downstream domain (dDENN).

B. Structural superimposition of the modeled structure of *Pc*DENND6 with the human DENND1B (PDB 3TW8).

C. Interaction interface between DENND1B and the RAB35 GTPase.

D. Modeled structure of *Pc*DENND6 with *Pc*RABba, the ortholog protein to *Hs*RAB14 in *P. chrysosporium*.

4. Conclusion

In this study, we highlight the efficiency of UV mutagenesis combined to whole genome resequencing of BWE resistant mutants to identify new molecular actors involved in resistance mechanisms to wood extractives in rot fungi. Among the collection, 76 % of the mutants showed a causal mutation in a gene

coding for an ortholog of the human DENND6 protein, suggesting a major mechanism of resistance to the antifungal properties of BWE linked to the function of this protein. Although the molecular function of DENND6 is not known in *P. chrysosporium*, its ortholog is involved in endocytic recycling in human, suggesting that a mechanism linked to endocytosis leads to the resistance to BWE in this fungus (Linford *et al.*, 2012). A biochemical characterization of the DENND6 protein will provide information on both its function and the potentiality that this protein could be a target of toxins present in the BWE. Alternatively, the *Pc*DENND6 could not be physically targeted by a toxin, but rather a mutated version of this protein results in a gain of function related to a detoxification process.

Acknowledgments

We thank Professor Jean-Pierre Jacquot for his help and comments during manuscript preparation.
This work was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). DN was supported by a Doctoral grant from French ministry of higher education and research (MESR). NDV was supported by a Doctoral Fellowship from the Ministry of Agriculture and Rural Development, Vietnam (Agricultural and Fisheries Biotechnology Program) and support from French ministry of foreign affair (program Campus France).

References

Barazandeh, M., Kriti, D., Nislow, C., and Giaever, G. (2022). The cellular response to drug perturbation is limited : Comparison of large-scale chemogenomic fitness signatures. *BMC Genomics*, *23*, 197. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08395-x

Barbier, M., Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Dumarçay, S., Gérardin, P., Morel-Rouhier, M., Sormani, R., and Gelhaye, E. (2020). Glutathione Transferases : Surrogate Targets for Discovering Biologically Active Compounds. *Journal of Natural Products*, *83*, 2960-2966. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00480

Brown, J. C. S., Nelson, J., VanderSluis, B., Deshpande, R., Butts, A., Kagan, S., Polacheck, I., Krysan, D. J., Myers, C. L., and Madhani, H. D. (2014). Unraveling the biology of a fungal meningitis pathogen using chemical genetics. *Cell*, *159*, 1168-1187. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.044

Burks, C., Darby, A., Londoño, L. G., Momany, M., and Brewer, M. T. (2021). Azole-resistant Aspergillus fumigatus in the environment : Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. *PLOS Pathogens*, *17*, e1009711. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009711

Chen, Y., Mallick, J., Maqnas, A., Sun, Y., Choudhury, B. I., Côte, P., Yan, L., Ni, T., Li, Y., Zhang, D., Rodríguez-Ortiz, R., Lv, Q., Jiang, Y., and Whiteway, M. (2018). Chemogenomic Profiling of

the Fungal Pathogen Candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *6*, e02365-17. https://doi.org/10.1128/AAC.02365-17

Cray, J. A., Stevenson, A., Ball, P., Bankar, S. B., Eleutherio, E. C., Ezeji, T. C., Singhal, R. S., Thevelein, J. M., Timson, D. J., and Hallsworth, J. E. (2015). Chaotropicity : A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, *33*, 228-259. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.010

de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., and Hulo, N. (2006). ScanProsite : Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, *34*(Web Server issue), W362-365. https://doi.org/10.1093/nar/gkl124

Deresa, E. M., and Diriba, T. F. (2023). Phytochemicals as alternative fungicides for controlling plant diseases : A comprehensive review of their efficacy, commercial representatives, advantages, challenges for adoption, and possible solutions. *Heliyon*, *9*, e13810. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13810

Fernández-González, A. J., Valette, N., Kohler, A., Dumarçay, S., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2018). Oak extractive-induced stress reveals the involvement of new enzymes in the early detoxification response of Phanerochaete chrysosporium. *Environmental Microbiology*, *20*, 3890-3901. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14409

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome : A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, *40*(Database issue), D1178-1186. https://doi.org/10.1093/nar/gkr944

Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otillar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., and Shabalov, I. (2014). MycoCosm portal : Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, *42*(Database issue), D699-704. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183

Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, *8*, 275-282. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275

Kirker, G. T., Blodgett, A. B., Arango, R. A., Lebow, P. K., and Clausen, C. A. (2013). The role of extractives in naturally durable wood species. *International Biodeterioration* and *Biodegradation*, *82*, 53-58. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.007

Kowalczyk, J. E., Peng, M., Pawlowski, M., Lipzen, A., Ng, V., Singan, V., Wang, M., Grigoriev, I. V., and Mäkelä, M. R. (2019). The White-Rot Basidiomycete Dichomitus squalens Shows Highly Specific Transcriptional Response to Lignocellulose-Related Aromatic Compounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00229

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870-1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *27*, 2987-2993. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*, 1754-1760. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324

Linford, A., Yoshimura, S., Bastos, R. N., Langemeyer, L., Gerondopoulos, A., Rigden, D. J., and Barr, F. A. (2012). Rab14 and Its Exchange Factor FAM116 Link Endocytic Recycling and Adherens Junction Stability in Migrating Cells. *Developmental Cell*, *22-540*, 952-966. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.010

Marat, A. L., Dokainish, H., and McPherson, P. S. (2011). DENN domain proteins : Regulators of Rab GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 13791-13800. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.217067

Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus Phanerochaete chrysosporium strain RP78. *Nature Biotechnology*, *22*, 695-700. https://doi.org/10.1038/nbt967

Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2022). ColabFold : Making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, *19*, Article 6. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1

Nguyen, D. V. (2020). *Isolation et caractérisation de mutants de Phanerochaete chrysosporium résistants à différents composés antifongiques* [These de doctorat, Université de Lorraine]. https://www.theses.fr/2020LORR0045

Ohm, R. A., Riley, R., Salamov, A., Min, B., Choi, I.-G., and Grigoriev, I. V. (2014). Genomics of wood-degrading fungi. *Fungal Genetics and Biology: FG* and *B*, *72*, 82-90. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.05.001

Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Beauchêne, J., Gérardin, P., Dumarçay, S., Sormani, R., Morel-Journel, T., and Gelhaye, E. (2020). A reverse chemical ecology approach to explore wood natural durability. *Microbial Biotechnology*. https://agritrop.cirad.fr/595251/

Perrot, T., Schwartz, M., Saiag, F., Salzet, G., Dumarçay, S., Favier, F., Gérardin, P., Girardet, J.-M., Sormani, R., Morel-Rouhier, M., Amusant, N., Didierjean, C., and Gelhaye, E. (2018). Fungal Glutathione Transferases as Tools to Explore the Chemical Diversity of Amazonian Wood Extractives. *ACS Sustainable Chemistry* and *Engineering*, *6*, 13078-13085. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02636

Preston. (2000). Wood preservation. Trends of today that will influence the industry tomorrow. *Forest Products Journal*, *50*, 12-19.

Royer, M., Rodrigues, A. M. S., Herbette, G., Beauchêne, J., Chevalier, M., Hérault, B., Thibaut, B., and Stien, D. (2012). Efficacy of Bagassa guianensis Aubl. Extract against wood decay and human pathogenic fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *70*, 55-59. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.016

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

Schilling, M., Maia-Grondard, A., Baltenweck, R., Robert, E., Hugueney, P., Bertsch, C., Farine, S., and Gelhaye, E. (2022). Wood degradation by Fomitiporia mediterranea M. Fischer : Physiologic, metabolomic and proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 988709. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.988709

Schultz, T. P., and Nicholas, D. D. (2002). Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry*, *61*, 555-560. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00267-4

Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H., and Wariishi, H. (2005). Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium against exogenous addition of vanillin. *PROTEOMICS*, *5*, 3919-3931. https://doi.org/10.1002/pmic.200401251

Sugui, J. A., Chang, Y. C., and Kwon-Chung, K. J. (2005). Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Aspergillus fumigatus : An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Targeted Gene Disruption. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 1798-1802. https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1798-1802.2005

Sun, H., and Schneeberger, K. (2015). SHOREmap v3.0 : Fast and accurate identification of causal mutations from forward genetic screens. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1284*, 381-395. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8_19

The UniProt Consortium. (2023). UniProt : The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D523-D531. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052

Tien, M., and Kirk, T. K. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds. *Science (New York, N.Y.)*, *221*, 661-663. https://doi.org/10.1126/science.221.4611.661

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

Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, *31*, 113-123. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.01.002

Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PloS One*, *6*, e16765. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765

Wu, C.-C., Wu, C.-L., Huang, S.-L., and Chang, H.-T. (2012). Antifungal activity of Liriodenine from Michelia formosana heartwood against wood-rotting fungi. *Wood Science and Technology*, *46*, 737-747. https://doi.org/10.1007/s00226-011-0428-9

Table S1. Summary of the mutations identified in the genome of the *bag4* mutant.

Gene identifier	Identity of scaffold	Position of a base in the reference sequence	Base in the reference sequence	Alternative/ mutant base	Region of DNA which is affected by the change	Amino acid according to reference	Resulting substitution
AGR57_827	scaffold_1	1737019	G	A	CDS	S	L
AGR57_1241	scaffold_1	2695172	C	A	CDS	R	L
AGR57_1794	scaffold_2	571089	G	T	intronic/noncoding		
AGR57_2419	scaffold_2	1866158	C	T	CDS	S	F
	scaffold_2	1866159	C	T	CDS	S	F
AGR57_1996	scaffold_2	994606	G	T	CDS	G	V
AGR57_2068	scaffold_2	1127968	G	A	CDS	P	S
AGR57_4000	scaffold_3	2364982	C	T	CDS	S	F
AGR57_3251	scaffold_3	696781	G	T	CDS	P	T
AGR57_3368	scaffold_3	926070	C	T	CDS	P	S
AGR57_3812	scaffold_3	1940559	T	C	CDS	H	R
	scaffold_3	1940656	C	T	CDS	E	K
AGR57_4372	scaffold_4	761370	C	A	CDS	Q	K
AGR57_4603	scaffold_4	1202261	C	T	CDS	H	Y
	scaffold_4	106632	C	T	CDS	A	V
AGR57_5668	scaffold_5	1208924	G	A	CDS	S	F
AGR57_5390	scaffold_5	602115	A	G	CDS	V	A
AGR57_5827	scaffold_5	1545859	T	C	CDS	F	L
AGR57_6058	scaffold_5	2008794	G	A	CDS	S	L
AGR57_5947	scaffold_5	1768617	G	A	CDS	S	L
AGR57_6650	scaffold_6	1079424	G	A	CDS	Q	*
AGR57_6349	scaffold_6	462761	A	C	CDS	L	R
AGR57_7118	scaffold_7	92036	A	G	CDS	S	P
AGR57_7124	scaffold_7	104070	C	T	CDS	E	K
AGR57_7162	scaffold_7	182780	G	A	splice_site_change		
AGR57_8406	scaffold_8	725988	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_9613	scaffold_9	1490106	G	A	CDS	E	K
AGR57_10338	scaffold_10	1393250	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_10340	scaffold_10	1395593	C	A	CDS	A	S
AGR57_10648	scaffold_11	584854	C	T	CDS	T	I
AGR57_10648	scaffold_11	584855	C	T	CDS	T	I
AGR57_11335	scaffold_12	696261	G	A	CDS	L	F
AGR57_11708	scaffold_13	228855	G	A	CDS	P	L
AGR57_11973	scaffold_13	768405	C	T	CDS	T	I
	scaffold_13	768406	C	T	CDS	T	I
AGR57_12000	scaffold_13	838485	C	T	CDS	D	N
AGR57_11998	scaffold_13	833772	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_12514	scaffold_14	779288	G	A	five_prime_UTR		
AGR57_12707	scaffold_15	132567	G	A	three_prime_UTR		

AGR57_13158	scaffold_16	186161	C	T	CDS	S	L
AGR57_13368	scaffold_16	610413	G	T	CDS	A	E
AGR57_13650	scaffold_17	429051	C	T	intronic/noncoding		
AGR57_13883	scaffold_18	276623	G	C	CDS	R	G
AGR57_13973	scaffold_18	438733	T	C	intronic/noncoding		
AGR57_13967	scaffold_18	421555	G	T	CDS	G	C
AGR57_14132	scaffold_19	285815	T	C	CDS	C	R
AGR57_14067	scaffold_19	122229	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_14256	scaffold_20	76704	A	G	splice_site_change		
AGR57_14583	scaffold_22	43867	G	A	three_prime_UTR		
AGR57_15117	scaffold_28	5479	A	T	CDS	T	S

Table S2. Summary of the mutations identified in the genome of the *bag31* mutant.

Gene identifier	Identity of scaffold	Position of a base in the reference sequence	Base in the reference sequence	Alternative/ mutant base	Region of DNA which is affected by the change	Amino acid according to reference	Resulting substitution
AGR57_346	scaffold_1	700916	C	T	CDS	L	F
AGR57_2818	scaffold_2	2832102	C	T	CDS	R	C
AGR57_1730	scaffold_2	457746	G	A	CDS	E	K
AGR57_1948	scaffold_2	899205	A	G	CDS	L	P
AGR57_2137	scaffold_2	1254971	A	G	CDS	E	G
AGR57_2356	scaffold_2	1731833	C	T	three_prime_UTR		
AGR57_2239	scaffold_2	1463655	C	T	intronic/noncoding		
AGR57_3779	scaffold_3	1867898	G	A	three_prime_UTR		
AGR57_3056	scaffold_3	300900	G	A	five_prime_UTR		
AGR57_2935	scaffold_3	28017	G	A	three_prime_UTR		
AGR57_3937	scaffold_3	2245008	G	T	intronic/noncoding		
AGR57_3881	scaffold_3	2095986	G	C	splice_site_change		
	scaffold_3	2088151	C	T	CDS	A	V
AGR57_4947	scaffold_4	1885717	A	G	CDS	I	T
AGR57_5181	scaffold_5	92331	T	C	CDS	K	R
AGR57_5275	scaffold_5	369658	A	G	CDS	E	G
AGR57_5181	scaffold_5	92318	T	G	CDS	Q	H
AGR57_5744	scaffold_5	1369986	G	A	three_prime_UTR		
AGR57_5203	scaffold_5	144620	G	A	CDS	L	F
AGR57_5274	scaffold_5	361895	T	C	CDS	V	A
AGR57_6776	scaffold_6	1352909	A	G	intronic/noncoding		
	scaffold_6	1352901	A	G	intronic/noncoding		
AGR57_6184	scaffold_6	139687	G	A	CDS	P	L
AGR57_6344	scaffold_6	448209	G	A	CDS	W	*
AGR57_6892	scaffold_6	1709186	G	C	CDS	C	S
AGR57_7124	scaffold_7	104070	C	T	CDS	E	K
AGR57_7090	scaffold_7	39320	A	C	five_prime_UTR		

AGR57_7625	scaffold_7	1260380	G	A	CDS	R	Q
AGR57_8082	scaffold_8	97914	A	G	CDS	F	L
	scaffold_8	95437	C	A	three_prime_UTR		
AGR57_8504	scaffold_8	928136	C	T	five_prime_UTR		
	scaffold_8	928137	C	T	five_prime_UTR		
AGR57_8081	scaffold_8	95018	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_8082	scaffold_8	95833	G	T	intronic/noncoding		
	scaffold_8	98020	C	T	intronic/noncoding		
AGR57_8884	scaffold_8	1734171	A	G	intronic/noncoding		
	scaffold_8	1734163	C	T	intronic/noncoding		
AGR57_8081	scaffold_8	94792	T	C	CDS	N	D
AGR57_9417	scaffold_9	1090506	G	A	CDS	S	L
AGR57_9601	scaffold_9	1471159	C	G	three_prime_UTR		
AGR57_9801	scaffold_9	1882978	C	T	CDS	R	C
AGR57_9256	scaffold_9	631412	C	T	CDS	R	Q
AGR57_9457	scaffold_9	1160597	C	T	intronic/noncoding		
AGR57_9982	scaffold_10	520862	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_10234	scaffold_10	1117680	G	T	CDS	A	E
AGR57_10326	scaffold_10	1373584	G	T	intronic/noncoding		
AGR57_11410	scaffold_12	837649	G	C	CDS	S	W
	scaffold_12	837660	G	A	CDS	A	V
	scaffold_12	837661	G	A	CDS	A	V
AGR57_11874	scaffold_13	568834	C	T	CDS	A	V
AGR57_12966	scaffold_15	728132	G	A	CDS	L	F
AGR57_13356	scaffold_16	582344	C	T	CDS	E	K
	scaffold_16	582485	C	T	CDS	V	I
AGR57_13376	scaffold_16	632827	C	T	five_prime_UTR		
AGR57_13515	scaffold_17	186862	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_14198	scaffold_19	445524	G	A	CDS	T	I
AGR57_14027	scaffold_19	45138	C	T	CDS	P	S
AGR57_14393	scaffold_20	341602	G	A	intronic/noncoding		
AGR57_14705	scaffold_22	294741	G	A	CDS	R	C
AGR57_14728	scaffold_22	338061	C	T	CDS	L	F
AGR57_14764	scaffold_23	108879	C	A	CDS	P	Q
AGR57_14917	scaffold_24	195662	G	A	CDS	R	*
AGR57_15334	scaffold_51	4551	C	G	CDS	E	D

Table S3. ID of the DENND protein sequences used as bait to retrieve orthologous proteins in animal, plant and fungal kingdoms.

Protein ID	Species	Database
DEN1A	*H.sapiens*	Uniprot (The UniProt Consortium, 2007)
DEN1B		
DEN1C		
DEN2A		
DEN2B		
DEN2C		
DEN2D		
DEND3		
MYCPP_HUMAN		
DEN4B		
DEN4C		
DEN5A		
DEN5B		
DEN6A		
DEN6B		
MADD_HUMAN		
MTMR5_HUMAN		
MTMRD_HUMAN		
P36090	*S. cerevisiae*	*Saccharomyces* Genome Database (SGD) (Cherry *et al.*, 1998)
Q99222		
YKL176C		
P53237		
YLR114C		
AVL9	*S. pombe*	Uniprot (The UniProt Consortium, 2007)
BHD1		
YLF7		
YBAG		
YG76		
DENN		
AT1G49040.1	*A. thaliana*	Tair (Garcia-Hernandez *et al.*, 2002)
AT1G73930.1		
AT2G20320.1		
AT5G35560.1		
AGR57_7124	*P. chrysosporium RP78*	Fungidb (Stajich *et al.*, 2012)

Table S4. Protein IDs grouped in each DENND protein family in the phylogenetic analysis.

Division	Subdivision	Species	DENND1	DENND2	DENND3	DENND4	DENND5	DENND6	MADD	MTMR	AVL9	AFI1	Cluster 11	Cluster 12	Cluster 13	Total
Chordata	Vertebrata	*Homo sapiens*	DEN1A DEN1B DEN1C	DEN2A DEN2B DEN2C DEN2D	DEND3	DEN4B DEN4C MYCPP HUMAN	DEN5A DEN5B	DEN6A DEN6B	MADD HUMAN	MTMR5 HUMAN MTMRD HUMAN						18
Arthropoda	Hexapoda	*Drosophila melanogaster*	NP 665880.2			NP 727281.2	NP 647620.1	NP 572216.1	NP 573001.2	NP 477401.2	NP 572901.1			NP 648090.1		8
Nematoda	Chromadorea (class)	*Caenorhabditis elegans*	F46F6.1a			F52C12.4A	C52E12.4.1	F53H1.3a	C02H7.3a	H28G03.6	T26A5.6.1			F22D3.2d		8
Chordata	Vertebrata	*Mus musculus*	NP 001349902 NP 001349906 NP 001349907	NP 001164032 NP 001343312 NP 001265870		NP 001087223	NP 001074535 NP 001298068	NP 033901	NP 001035789	NP 001074499.2					NP_001343304	13
Bryophyta	Bryophytina	*Physcomitrella patens v3.3*			Pp3c26 9700			Pp3c12 18170 Pp3e4 11450					Pp3e15 22380 Pp3e9 25650			5
Tracheophyta	Lycophyta	*Selaginella moellendorffii v1.0*			118822			163686 98817					445651			4
	Spermatophytina	*Oryza sativa v7_JGI*			LOC Os01g39380			LOC Os03g15390					LOC Os03g05200.1 LOC Os02g53700			4
		Populus trichocarpa v3.0			Potri.012G060800 Potri.015G049500			Potri.012G060200 Potri.015G049900					Potri.002G255500 Potri.006G143000 Potri.018G065500			7
		Arabidopsis thaliana TAIR10			AT1G49040			AT1G73930					AT2G20320 AT5G35560			4
Chlorophyta	Chlorophytina	*Chlamydomonas reinhardtii v5.5*	Cre12.g511600		Cre07.g352900								Cre06.g289450			3
Ascomycota	Pezizomycetes	*Morchella importuna CCBAS932 v1.0*						533424			507333	500314	609914 607388			5
	Eurotiomycetes	*Aspergillus nidulans*									5693	6519	6172 850			4
		Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255									139903	149747	146983 148924			4
		Trichoderma reesei QM6a									113283	117475	116390 116285			4
	Sordariomycetes	*Magnaporthe oryzae 70-15 v3.0*									4054	6811	492 9144			4
		Neurospora crassa OR74A v2.0									6517 6518	4468	2892 2893 3344 3345 3346			8
		Podospora anserina									407679	196769	154596 385747			4
	Saccharomycotina	*Candida albicans SC5314*									4833	2525				2
		Saccharomyces cerevisiae S288C									4134	5782			3789	3
	Taphrinomycotina	*Schizosaccharomyces pombe*									1066	3647	4916		2614	4
Basidiomycota	Pucciniomycotina	*Melampsora lini CH5*						196755			196205	201993				3
	Ustilaginomycotina	*Ustilago maydis 521 2,0*						465			4311	3747				3
	Agaricomycetes	*Coniophora puteana v1.0*						99518			56688	108255				3
		Gloeophyllum trabeum v1.0						77890			141142	80490				3
		Phanerochaete chrysosporium RP-78 v2.2						3004327			3028418	2932425				3
		Pleurotus ostreatus PC15 v2.0						1047778			1045321	1062011				3
		Rhizopogon vinicolor AM-OR11-026 v1.0						799599			679112	862901				3
		Serpula lacrymans S7.9 v2.0						1187405			1148619	1179896				3
		Trametes versicolor v1.0						72463			147292	31020				3
	Tremellomycetes	*Cryptococcus neoformans var. grubii H99*						3830 10777			2764 10269	3582 8034				6

Chapitre III : Etude du rôle de la protéine DENND6 dans les mécanismes de résistance aux extractibles de bois de *B. guianensis* chez *P. chrysosporium*

1. Résultats

Dans l'étude précédente, nous avons identifié une mutation dans le gène codant pour la protéine DENND6 de *P. chrysosporium*, comme étant impliquée dans le processus d'acquisition de résistance aux extractibles de *B. guianensis* de certains des mutants *bag* (Nguyen, 2020). Ces résultats nous ont amenés à émettre 2 hypothèses principales :

1- DENND6 est la cible d'une molécule toxique présente dans les extractibles de *B. guianensis.*
2- DENND6 n'est pas la cible directe, mais est impliquée dans un processus plus général de réponse au stress.

Chez les eucaryotes, les protéines DENND sont impliquées dans la régulation des voies du trafic membranaire par leur interaction et activité avec de petites protéines appelées RAB GTPases (Barr et Lambright, 2010). Chez l'homme, toutes les familles de protéines à domaine DENN ont été identifiées avec une activité Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) pour une ou plusieurs RAB GTPases (Tableau 13) (Marat *et al.*, 2011). Cette activité se traduit par la dissociation du GDP des RAB GTPases conduisant à la fixation de GTP. Dans un état lié au GTP, les RAB GTPases sont actives et recrutent un ensemble d'effecteurs permettant la régulation des voies d'endocytose et d'exocytose (Barr et Lambright, 2010). Chez l'homme, deux gènes codant pour des protéines DENND6 ont été identifiés. Ces protéines sont appelées FAM116A et FAM116B, et ont été renommées DENND6A et DENND6B dû à un pourcentage de similarité de séquences élevé avec les protéines à domaine DENN (Marat *et al.*, 2011). La recherche de leurs protéines RAB GTPases partenaires a permis d'identifier une activité GEF des protéines DENND6A et DENND6B pour la GTPase RAB14 (Linford *et al.*, 2012). Plus précisément, la protéine DENND6A recrute et active la GTPase RAB14 au niveau des endosomes de recyclage. La délétion des gènes codant les protéines DENND6A ou RAB14 a permis de mettre en évidence leur rôle dans le transport endocytique et le recyclage de la protéase ADAM10. L'altération des processus de recyclage de cette protéine a conduit à une accumulation des niveaux de N-cadhérine aux jonctions cellule-cellule. Ces défauts sont responsables d'une inhibition de la mobilité cellulaire chez des cellules de mammifères. A l'heure actuelle, les connaissances acquises sur la protéine DENND6 sont restreintes à cette seule étude réalisée chez l'homme (Linford *et al.*, 2012). Dans le but de caractériser DENND6 de *P. chrysosporium* pour apporter des éléments de réponse aux hypothèses

émises concernant son rôle dans la résistance aux extractibles, nous avons recherché ses potentielles RAB GTPases partenaires et mesuré son activité GEF *in vitro*.

Tableau 13. Tableau de synthèse des RAB GTPases partenaires des protéines à domaine DENN chez l'homme (Linford *et al.*, 2012; Marat *et al.*, 2011).

Gène	Protéine	RAB GTPases associées à une activité GEF
DENND1A	connecdenn 1	Rab35
DENND1B	connecdenn 2	Rab35
DENND1C	connecdenn 3	Rab35 Rab13
DENND2A		Rab9a/b
DENND2B	ST5 HTS1	Rab9a/b Rab34
DENND2C		Rab9a/b
DENND2D		Rab9a/b
DENND3		Rab12 Rab18
DENND4A	IrlB MycPBP	Rab10
DENND4B		Rab10
DENND4C		Rab10
DENND5A	Rab6IP1	Rab39
DENND5B	Rab6IP1-like	Rab39
FAM116A	DENND6A	Rab14
FAM116B	DENND6B	Rab14, Rab35
Set Binding Factor 1 SBF-1	MTMR5	Rab28 Rab5a
Set Binding Factor 2 SBF-2	MTMR13	Rab28
MADD	DENN/MADD Rab3GEP DENN-SV IG20 IG20-SV2	Rab3 Rab27a/b

1.1 Identification des RAB GTPases de *P. chrysosporium* orthologues à *Hs*Rab14, partenaire de DENND6 chez l'homme

Afin d'identifier la protéine orthologue de *Hs*RAB14 chez *P. chrysosporium*, des analyses phylogénétiques des protéines RAB14 ont été réalisées chez 7 espèces de Basidiomycètes en utilisant l'outil BlastP avec *Hs*RAB14 comme séquence de référence. L'embranchement contenant la séquence *Hs*RAB14 est présenté en figure 43. Un premier sous-embranchement contient les séquences protéiques humaines *Hs*RAB2, *Hs*RAB4 et *Hs*RAB14 ainsi que les séquences de 6 Basidiomycètes incluant *P. chrysosporium*. La séquence de *P. chrysosporium* notée *Pc*_2912255 étant plus proche de *Hs*RAB4 que des autres séquences humaines, celle-ci a été nommée *Pc*RAB4. Un deuxième sous embranchement contient uniquement des séquences fongiques incluant les 7 Basidiomycètes de l'étude. La séquence *Pc*_2973368 inclue dans ce sous-embranchement a ainsi été considérée comme un second potentiel orthologue de *Hs*RAB2/4/14 et a été nommée *Pc*RABba en référence aux Basidiomycètes en attendant une annotation plus canonique. Ces analyses ont ainsi permis d'identifier deux protéines orthologues de la protéine *Hs*RAB14 chez *P. chrysosporium*, nommées *Pc*RAB4 et *Pc*RABba (Fig. 43).

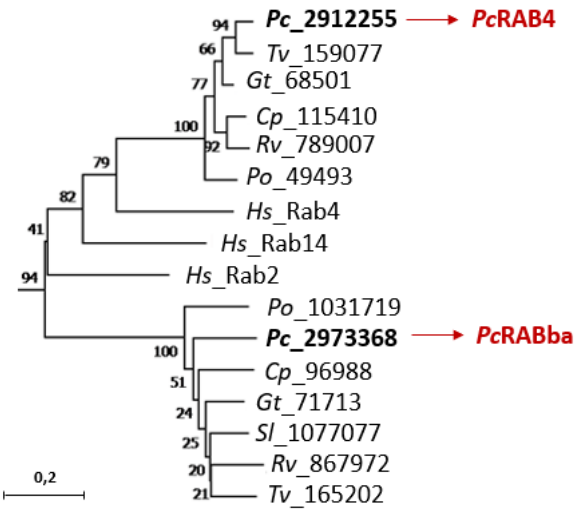


Figure 43. Embranchement contenant la séquence protéique *Hs*RAB14 dans l'arbre phylogénétique des protéines RAB14 GTPases. Un total de 113 séquences a été utilisé pour construire l'arbre phylogénétique des protéines RAB14 GTPase avec la méthode Neighbor-Joining sur le logiciel MEGA 7.0.26 software (Kumar *et al.*, 2016). Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode basée sur la matrice JTT. Les protéines orthologues à *Hs*RAB14 chez *P. chrysosporium* sont indiquées en gras et ont été renommées en rouge.

1.2 Caractérisation fonctionnelle de *Pc*RAB4 et *Pc*RABba

Comme leur nom le suggère, les protéines RAB GTPases ont une activité GTPase. Le cycle catalytique de ces protéines est régulé par deux familles de protéines appelées GEF pour Guanine nucleotide Exchange Factor et GAP pour GTPase-Activating Proteins (Hutagalung et Novick, 2011). Les protéines

GEF catalysent la dissociation du GDP des RAB GTPases ce qui conduit à la fixation de GTP et à leur activation. Les protéines GAP activent la fonction GTPase des RAB GTPases ce qui conduit à l'hydrolyse du GTP et à leur inactivation (Fig. 42). L'activité des GEFs et des GAPs permet ainsi d'augmenter le taux d'hydrolyse de GTP par les RABs, soit par la catalyse de la dissociation du GDP, soit par l'activation de la fonction GTPase des RABs.

Les protéines recombinantes His-*Pc*RAB4 et His-*Pc*RABba ont été produites en système hétérologue chez la souche BL21 psBET d'*E. coli* et purifiées par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) (Fig. 44).

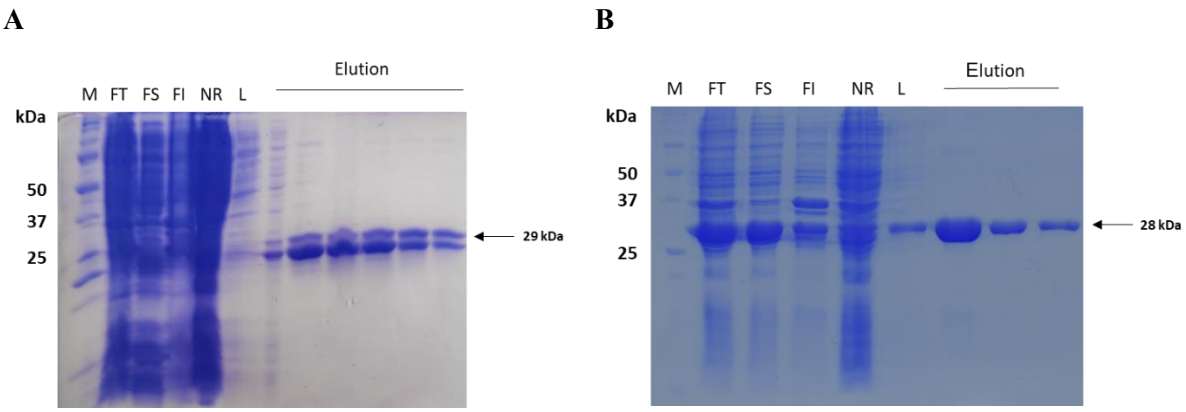


Figure 44. Purification des protéines recombinantes His-*Pc*RAB4 (A) et His-*Pc*RABba (B). Les protéines recombinantes ont été purifiées par IMAC et analysées par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide 15 %. Les noms complets des abréviations utilisées sont les suivants : M (marqueur moléculaire); FT (fraction totale); FS (fraction soluble); FI (fraction insoluble); NR (fraction non retenue) et L (lavage). Le poids moléculaire des protéines recombinantes est indiqué.

Les activités GTPases de *Pc*RAB4 et *Pc*RABba ont été mesurées avec le kit GTPase-Glo™ Assay, dont le fonctionnement est basé sur la détection de GTP restant en solution qui est converti en ATP puis en bioluminescence (Fig. 45). Une diminution de luminescence reflète ainsi une diminution de GTP présent en solution et traduit une activité GTPase des protéines.

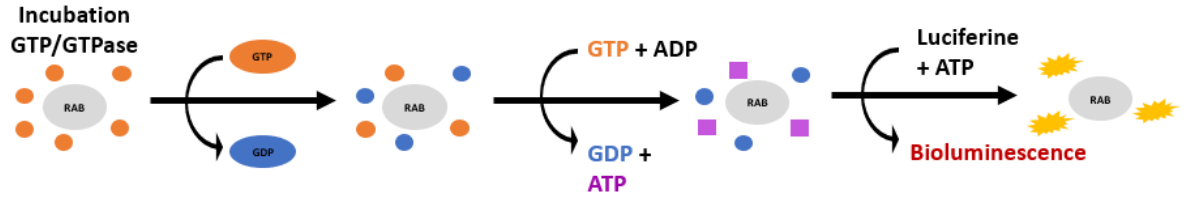


Figure 45. Principe de fonctionnement des tests d'activité GTPase avec le kit GTPase-Glo™ Assay.

Pour chacune des RAB GTPases étudiées, une diminution de luminescence relative à la concentration de protéines recombinantes utilisée a été observée (Fig. 46). Ces analyses permettent de confirmer que *Pc*RAB4 et *Pc*RABba ont une activité GTPase.

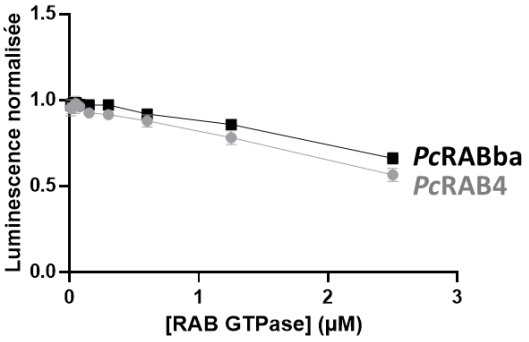


Figure 46. Tests d'activité GTPase des protéines recombinantes His-*Pc*RAB4 et His-*Pc*RABba. Les activités GTPases ont été mesurées à l'aide du kit GTPase-Glo™ Assay. Ces activités sont mesurées à partir de la quantité de GTP restant en solution qui est converti en ATP puis en luminescence. Les écarts-types ont été calculés à partir de 3 réplicats techniques.

1.3 Caractérisation fonctionnelle de *Pc*DENND6

Optimisation des conditions pour la production et purification des protéines *Pc*DENND6

Pour produire la protéine recombinante *Pc*DENND6, les séquences déposées dans les bases de données Fungidb et JGI à partir des différentes versions du génome de *P. chrysosporium* ont été comparées (Basenko *et al.*, 2018; Grigoriev *et al.*, 2014). Les séquences proposées dans la version 3.0 (JGI) et dans la base de données Fungidb (en 2018) présentent une délétion de 92 et 234 acides aminés au niveau de la partie N-terminale de la séquence protéique en comparaison à la version 2.2 (JGI). La séquence annotée la plus longue (version 2.2 de JGI) a d'abord été amplifiée à partir des cDNA de *P. chrysosporium*, confirmant que cette forme longue est exprimée chez *P. chrysosporium*. Dans le but de déterminer quelle est la séquence peptidique fonctionnelle *in vivo*, trois tailles putatives de séquence ont été prises en compte pour la production et la purification des protéines recombinantes de *Pc*DENND6 (Fig. 47).

- La première a été nommée « pleine longueur – Full » (nombre d'acides aminés : 611, poids moléculaire : 67,6 kDa) car elle correspond à la séquence codante annotée la plus longue. Elle est retrouvée sur la version 2.2 de JGI et Fungidb (2019), et a été amplifiée à partir de cDNA de *P. chrysosporium*.
- La deuxième a été nommée « longueur intermédiaire – Short » (nombre d'acides aminés : 519, poids moléculaire : 57,6 kDa). Elle a été sélectionnée dû à la présence d'un potentiel site alternatif d'initiation à la traduction et à l'identification d'une région hydrophobe en partie N-

terminal de la séquence. La forme intermédiaire correspond également à l'annotation la plus proche de celle retrouvée sur la version 3.0 de la base de données JGI.

- La troisième a été nommée « petite longueur - LEVAC » (Nombre d'acides aminés : 377, Poids moléculaire : 41,5 kDa). Elle était référencée sur Fungidb en 2018.

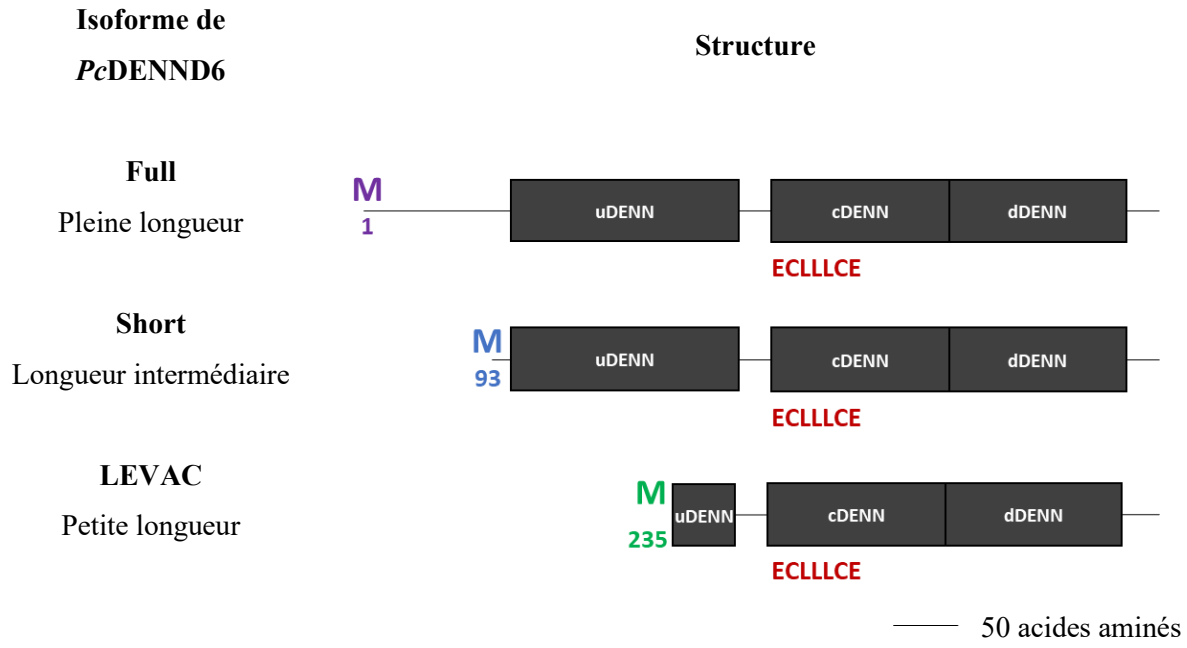


Figure 47. Représentation schématique des 3 isoformes de la protéine *Pc*DENND6. Ces trois isoformes ont été appelées « pleine longueur », « longueur intermédiaire » et « petite longueur » en fonction de la taille de la séquence protéique. Le motif palindromique (ECLLLCE) dans lequel a été identifié la mutation causale chez les mutants *bag* est indiqué en rouge et est présent dans chacune des isoformes.

Afin de produire et purifier les 3 isoformes de *Pc*DENND6, un ensemble de conditions a été expérimenté (Tableau 14). L'optimisation des paramètres de production des protéines recombinantes a permis de produire et de purifier uniquement les protéines recombinantes de l'isoforme « longueur intermédiaire » de *Pc*DENND6. Les protéines recombinantes ont été produites fusionnées à une étiquette poly-histidine-sumo permettant à la fois d'améliorer la production et la solubilité des protéines recombinantes et de les purifier par chromatographie d'affinité IMAC (Kuo *et al.*, 2014). Une étape supplémentaire de purification par chromatographie d'exclusion de taille et un clivage de l'étiquette poly-histidine-sumo ont été réalisés (Fig. 48). Pour comparer l'activité de la protéine DENND6 sauvage à une variante mutante identifiée au sein de la collection de mutants résistants aux extractibles de bois, la version mutante de *Pc*DENND6 (E234K) a été produite et purifiée en utilisant une stratégie similaire (Tableau 14, Fig. 48).

Tableau 14. Conditions expérimentées et utilisées pour produire et purifier les versions sauvage et mutante de la protéine *Pc*DENND6.

Protéine	Isoforme	Vecteur d'expression	Souche d'expression	Température	Conditions utilisées pour la production des protéines recombinantes
Version sauvage de *Pc*DENND6	« pleine longueur »	pET15b	BL21 psBET	37 °C	
			BL21 pRARE2		
			C41		
			Origami2		
			GroES GroEL psBET		
		pCARGHO1	BL21 psBET	37 °C	
			BL21 pRARE2		
			C41		
			Origami2		
			GroES GroEL psBET		
		pBG102	C41	37 °C	
			Origami2		
			GroES GroEL psBET		
			BL21 pRARE2		
			Rosetta pRARE2		
			C41 pRARE2		
	« longueur intermédiaire »	pBG102	BL21 pRARE2	37 – 20 °C	pBG102 BL21 pRARE2 20 °C
			Rosetta pRARE2	37 °C	
			C41 pRARE2	37 °C	
			Rosetta pRARE2 (-pLYS)	37 – 20 °C	
	« petite longueur »	pBG102	BL21 pRARE2	37 – 28 – 20 °C	
			Rosetta pRARE2	37 – 28 – 20 °C	
			C41 pRARE2	37 °C	
Version mutante de *Pc*DENND6 (E234K)	« longueur intermédiaire »	pBG102	BL21 pRARE2	37 - 20 °C	pBG102 Rosetta pRARE2 (-pLYS) 20 °C
			Rosetta pRARE2 (-pLYS)		

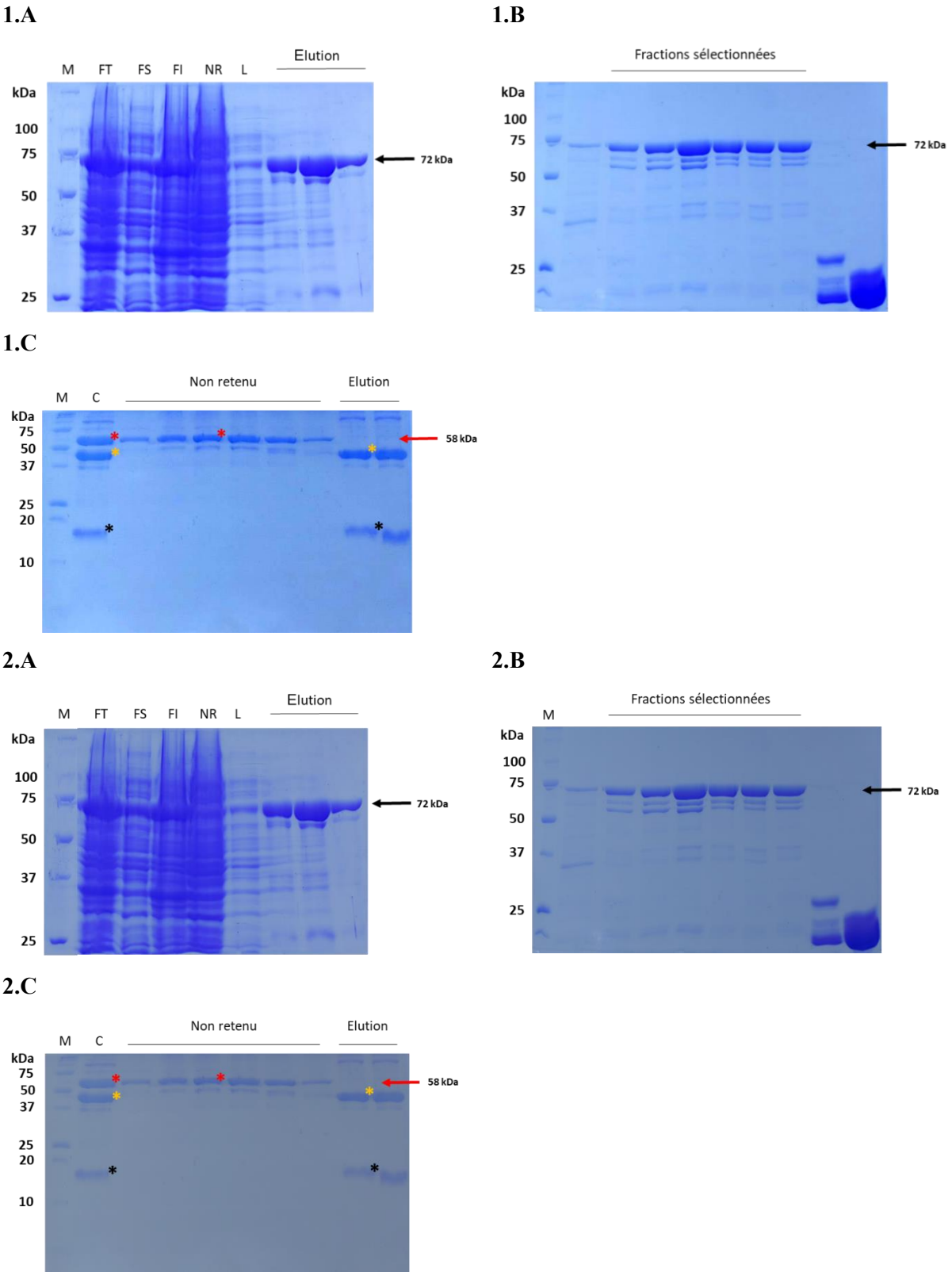


Figure 48. Purification des versions sauvage (1) et mutante E234K (2) de l'isoforme « longueur intermédiaire » de *Pc*DENND6. La stratégie de purification employée comprend trois étapes : (A) une chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés, (B) une chromatographie d'exclusion de taille et (C) une réaction de clivage de l'étiquette poly-histidine-sumo suivie par une chromatographie d'affinité inverse sur ions métalliques immobilisés. Les protéines recombinantes ont été analysées à

chaque étape par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (15 % et 10 %). Les noms complets des abréviations utilisées sont les suivants : M (marqueur moléculaire); FT (fraction totale); FS (fraction soluble); FI (fraction insoluble); NR (fraction non retenue); L (lavage) et C (fraction de la réaction de clivage de l'étiquette poly-histidine-sumo). (A) Analyse des différentes fractions obtenues par IMAC sur gel de polyacrylamide 10 %. (B) Analyse des différentes fractions obtenues par chromatographie d'exclusion de taille sur gel de polyacrylamide 10 %. (C) Analyse des différentes fractions obtenues après clivage de l'étiquette poly-histidine-sumo et IMAC inverse sur gel de polyacrylamide 15 %. Les bandes protéiques correspondants à *Pc*DENND6, la protéase HRV 3C et l'étiquette poly-histidine-sumo sont représentées respectivement par des astérisques rouges, jaunes et noirs.

Après purification des versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6, deux bandes ont été identifiées sur gel SDS-PAGE (une à 58 kDa correspondant à la taille attendue et une à 48 kDa environ) (Fig. 48). Pour déterminer si la bande supplémentaire correspond à un contaminant protéique ou une potentielle dégradation des protéines recombinantes, les différentes bandes présentent sur le gel correspondant à la version sauvage de l'isoforme « longueur intermédiaire » ont été analysées en LC-MALDI short run (Plateforme protéomique – IBSLor – JB Vincourt) (Fig. 49). Ces analyses ont permis d'identifier des peptides similaires entre les deux bandes protéiques, correspondant aux régions N-terminale et C-terminale de la séquence de *Pc*DENND6 et suggérant que la bande supplémentaire n'est pas un contaminant ni un produit de dégradation.

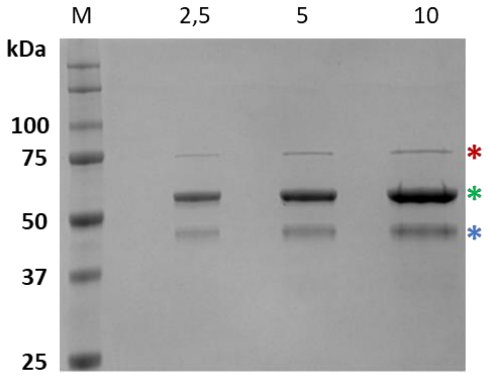


Figure 49. Profil de migration des protéines recombinantes *Pc*DENND6 (version sauvage de l'isoforme « longueur intermédiaire ») par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide 10 %. Différentes quantités de protéines recombinantes ont été déposées (2,5 - 5 et 10 µg). Les bandes protéiques ont été analysées en LC MALDI short run (Plateforme protéomique – IBSLor) et trois polypeptides ont été identifiés : une chaperone d'*E. coli* (astérisque rouge) et les protéines recombinantes *Pc*DENND6 (astérisques vert et bleu).

La différence de migration pourrait s'expliquer par une différence au niveau de l'état redox de la protéine dans le cas d'une réduction non-totale des cystéines (Zannini *et al.*, 2017). En effet, une réduction partielle des cystéines peut générer la formation d'un pont disulfure intramoléculaire et conduire à une

augmentation de vitesse de migration des protéines recombinantes en comparaison aux protéines totalement réduites. Afin de déterminer si l'état redox des cystéines est responsable de la différence de migration électrophorétique des protéines recombinantes *Pc*DENND6, leur profil de migration a été analysé en présence d'agents réducteurs (β-mercaptoéthanol et TCEP) et/ou après dénaturation par la température (Fig. 50). Aucune différence n'a été mise en évidence, les deux bandes sont visibles quelle que soit la condition testée, suggérant que l'état redox des cystéines n'est pas responsable de la présence de cette bande supplémentaire. Comme aucune dégradation des protéines n'a été détectée précédemment, cet extrait protéique a été utilisé pour la suite de cette étude.

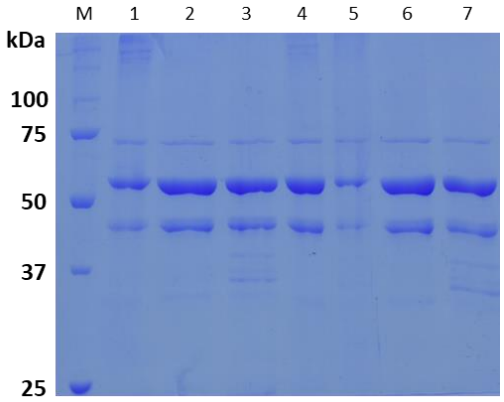


Figure 50. Analyse des profils de migration des protéines recombinantes *Pc*DENND6 (version sauvage de l'isoforme « longueur intermédiaire ») en présence d'agents réducteurs et/ou après dénaturation par la température, par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide 10 %. Les conditions qui ont été utilisées sont les suivantes : (1) – β-mercaptoéthanol, (2) + β-mercaptoéthanol, (3) + β-mercaptoéthanol + 95 °C, (4) – β-mercaptoéthanol + TCEP, (5) – β-mercaptoéthanol + TCEP + 95 °C, (6) + β-mercaptoéthanol + TCEP et (7) + β-mercaptoéthanol + TCEP + 95 °C. Pour chaque condition, 5 µg de protéines recombinantes ont été déposées.

Activités GEF des protéines *Pc*DENND6

Les RAB GTPases recombinantes de *P. chrysosporium* étant fonctionnelles, des tests d'activités ont été effectués pour déterminer si les versions sauvage et mutée (E234K) de *Pc*DENND6 ont une activité GEF pour *Pc*RAB4 et/ou *Pc*RABba. L'activité GEF des protéines *Pc*DENND6 a été mesurée avec le kit GTPase-Glo™ Assay, dont le fonctionnement est basé sur la détection de GTP restant en solution qui est converti en ATP puis en bioluminescence (Fig. 45). En présence de leur protéine GEF, la dissociation du GDP des RAB GTPases est accélérée ce qui permet d'augmenter le taux d'hydrolyse de GTP par les RAB GTPases. Ainsi, si une activité GEF est présente, une diminution d'intensité de luminescence est attendue en comparaison à une réaction contenant la GTPase seule.

Les tests d'activité GEF ont été réalisés avec les versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6 en absence et en présence de la protéine *Pc*RAB4 GTPase (Fig. 51 et 52). Ces tests sont basés sur la détection de

GTP qui est converti en bioluminescence. De manière inattendue, une diminution de luminescence a été mesurée dans les contrôles contenant seulement les protéines DENND6 (Fig. 51).

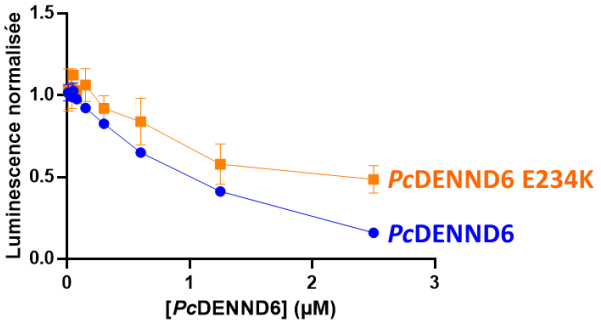


Figure 51. Mesures d'activité GTPase des versions sauvage et mutante (E234K) des protéines recombinantes *Pc*DENND6. Les activités GTPases ont été mesurées à l'aide du kit GTPase-Glo™ Assay. Ces activités sont mesurées à partir de la quantité de GTP restant en solution qui est converti en ATP puis en luminescence. Les écarts-types ont été calculés à partir de 3 réplicats techniques.

Ces résultats sont particulièrement surprenants car cela suggère une activité GTPase des protéines recombinantes *Pc*DENND6. Cette activité est dépendante de la concentration de DENND6 testée et la version mutante (E234K) de *Pc*DENND6 présente une activité GTPase plus faible que la version sauvage. Ces résultats mettent en évidence une activité GTPase des protéines *Pc*DENND6. L'activité GTPase de *Pc*RAB4 en présence de *Pc*DENND6 (Fig. 52) n'a pas permis de détecter d'activité GEF des protéines *Pc*DENND6 pour *Pc*RAB4.

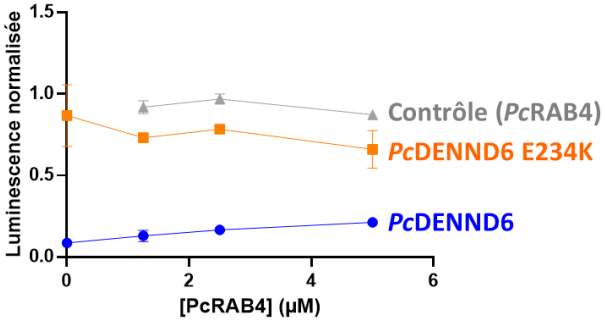


Figure 52. Tests d'activité GEF des versions sauvage et mutante (E234K) des protéines recombinantes *Pc*DENND6 pour la RAB GTPase *Pc*RAB4. Les activités GTPases ont été mesurées à l'aide du kit GTPase-Glo™ Assay. Ces activités sont mesurées à partir de la quantité de GTP restant en solution qui est converti en ATP puis en luminescence. Les écarts-types ont été calculés à partir de 3 réplicats techniques.

Ces résultats nous ont ainsi amenés à tester une autre méthode basée sur la fixation de GTP marqué avec un fluorophore (N-MAR-GTP) sur les RAB GTPases (Kit RhoGEF Exchange Assay Biochem). Ce dernier permet de suivre en temps réel des activités GEF grâce à une augmentation de fluorescence

émise lorsque le GTP est fixé aux RAB GTPases. Ainsi, une augmentation de l'intensité de fluorescence reflète une fixation plus importante de GTP sur les RAB GTPase et traduit une activité GEF.

Un contrôle positif a d'abord été réalisé avec des protéines recombinantes humaines et a permis de confirmer l'activité GEF attendue de hDbs pour Cdc42 (Fig. 53A) (Cheng *et al.*, 2002). L'activité GEF des versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6 pour *Pc*RAB4 et *Pc*RABba a ensuite été mesurée (Fig. 53B et C). En présence des versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6, une augmentation de l'intensité de fluorescence est observée en comparaison aux réactions contrôles contenant uniquement les GTPases *Pc*RAB4 et *Pc*RABba. Cependant, les réactions contrôles contenant uniquement les GTPases présentent une diminution d'intensité de fluorescence au cours du temps. Le profil obtenu pour *Pc*RAB4 et *Pc*RABba est assez surprenant car les GTPases recombinantes fournies dans le kit présentent un profil de fluorescence stable ou en légère augmentation au cours du temps, dû à la faible activité GTPase des protéines en absence de leur protéine GEF partenaire (Fig. 54). La diminution d'intensité de fluorescence observée pour *Pc*RAB4 et *Pc*RABba suggère une dégradation du fluorophore N-MAR-GTP et donc l'hydrolyse de cette molécule par leur activité GTPase. Pour réaliser ce test, nous avons utilisé les quantités de GTPases indiquées par le fabricant, cependant il est envisageable que dans notre cas la concentration des GTPases *Pc*RAB4 et *Pc*RABba soit trop importante.

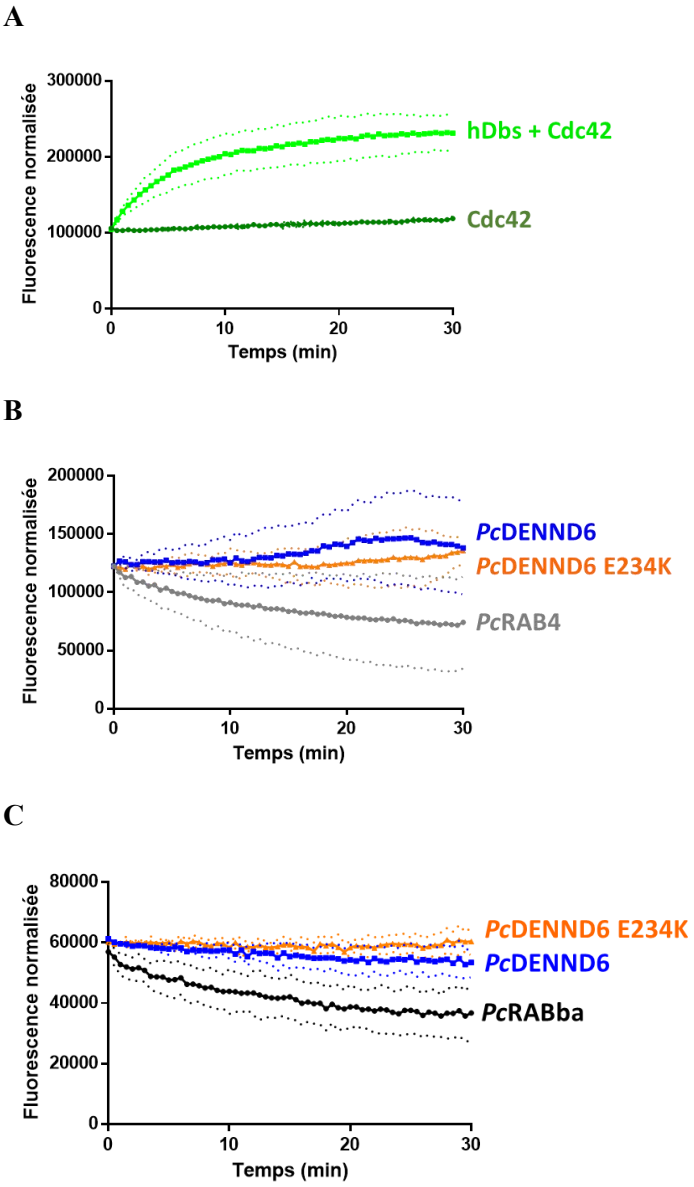


Figure 53. Tests d'activité GEF des versions sauvage et mutante des protéines recombinantes *Pc*DENND6 pour les GTPases *Pc*RAB4 et *Pc*RABba. Les activités GEF sont mesurées à l'aide d'un fluorophore de GTP nommé N-MAR-GTP (RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit). (A) Contrôle positif d'activité GEF entre les protéines humaines hDbs et sa GTPase partenaire Cdc42. (B) Tests d'activité GEF des versions sauvage et mutante des protéines *Pc*DENND6 pour *Pc*RAB4. (C) Tests d'activité GEF des versions sauvage et mutante des protéines *Pc*DENND6 pour *Pc*RABba. Les écarts-types ont été calculés à partir de 3 réplicats techniques.

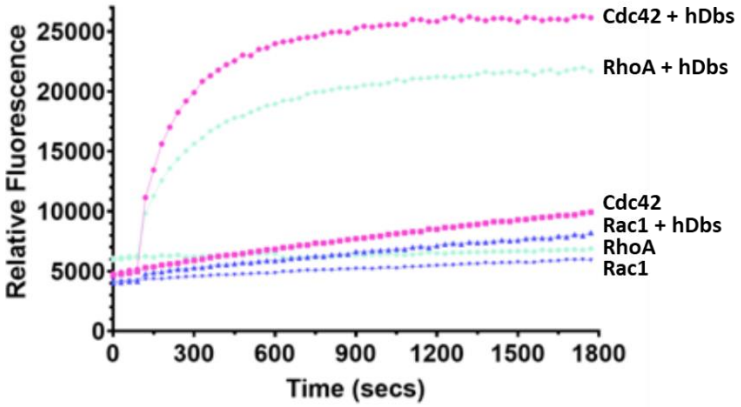


Figure 54. Tests d'activité GEF des protéines hDbs avec les GTPases Cdc42, RhoA et Rac1 et mesures des intensités de fluorescences pour les réactions contrôles contenant uniquement les GTPases (RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit).

Les profils obtenus ne permettent donc pas de conclure sur une activité GEF des protéines *Pc*DENND6 pour *Pc*RAB4 et *Pc*RABba. Afin de pallier ces limites, ces activités seront mesurées à nouveau avec une concentration de GTPase plus faible. Selon les résultats obtenus, une autre possibilité pourrait également être d'initier les réactions avec les protéines DENND lorsque l'intensité de fluorescence émise par le fluorophore atteint un plateau en présence de ces RAB GTPases.

Interactions par double hybride des protéines *Pc*DENND6 et de leurs RAB GTPases partenaires

Pour déterminer si une des trois isoformes de la protéine *Pc*DENND6 interagit avec *Pc*RAB4 et/ou *Pc*RABba, des tests ont été réalisés par double hybride chez *S. cerevisiae*. L'activité des RAB GTPases est régulée par 2 familles de protéines appelées GEF et GAP. Ces protéines interagissent avec les RAB GTPases de manière transitoire. La substitution des acides aminés impliqués dans la fixation du GDP et GTP et dans l'hydrolyse du GTP permet de générer des variants de RAB GTPases pour lesquels les interactions sont stabilisées avec leurs protéines partenaires (GEF et GAP) (Olkkonen et Stenmark, 1997). Ces acides aminés sont identifiés dans l'alignement présenté en figure 55.

Pour identifier de potentielles interactions entre *Pc*DENND6 et des RAB GTPases, nous avons ainsi considéré deux variants :

- Un variant présentant une plus grande affinité pour le GDP que le GTP. Ce variant est généré grâce à la substitution d'une sérine en asparagine au sein du motif « VGK**S** » (Olkkonen et Stenmark, 1997). Il est utilisé pour mimer un état lié au GDP et stabiliser une interaction entre une RAB GTPase et une GEF.
- Un variant défectueux pour hydrolyser le GTP. Ce variant est généré grâce à la substitution d'une glutamine en leucine au sein du motif « WDTAG**Q** » (Olkkonen et Stenmark, 1997). Il est utilisé pour mimer un état lié au GTP et stabiliser une interaction entre une RAB GTPase et une GAP.

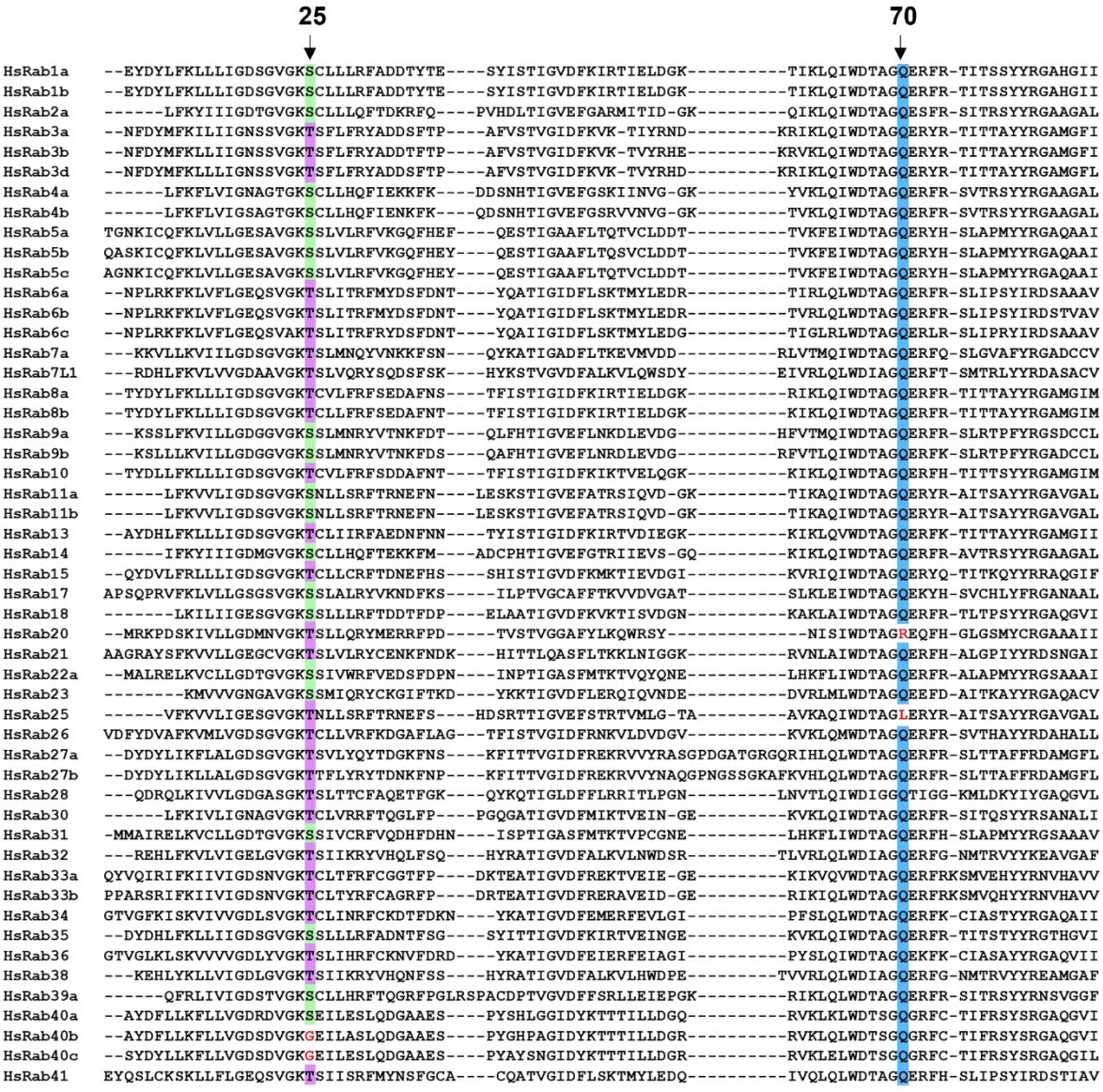


Figure 55. Alignement multiple des séquences protéiques des RAB GTPases humaines. Les séquences ont été récupérées sur les bases de données GenBank et Uniprot à partir des IDs indiquées dans l'article Pereira-Leal et Seabra, 2001. Les acides aminés impliqués dans l'association du GDP et GTP et dans l'hydrolyse du GTP ont été numérotés par rapport à leurs positions identifiées au sein de la séquence protéique *Hs*Rab1a. Les acides aminés impliqués dans l'association du GDP et GTP sont surlignés en vert (sérine) et violet (thréonine). Les acides aminés impliqués dans l'hydrolyse du GTP sont surlignés en bleu (glutamine). La substitution d'un de ces acides aminés dans les séquences protéiques des RAB GTPases est indiquée en rouge.

Afin d'identifier ces acides aminés au sein des séquences protéiques de *Pc*RAB4 et *Pc*RABba, des alignements de séquences ont été effectués avec des séquences de RAB GTPase humaines et les protéines orthologues fongiques identifiées dans les analyses phylogénétiques des protéines RAB14 GTPase (Fig. 56).

A

```
Hs_RAB2a    3    YAYLFKYIIIGDTGVGKSCLLLQFTDKRFQPVHDLTIGVEFGARMITIDG--KQIKLQIWDTAGQESFRSITRSYYRGAAGALLVYD  87
Hs_RAB4a    10   YDFLFKFLVIGNAGTGKSCLLHQFIEKKFKDDSNHTIGVEFGSKIINVGG--KYVKLQIWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGALLVYD  94
Hs_RAB14    8    YSYIFKYIIIGDMGVGKSCLLHQFTEKKFMADCPHTIGVEFGTRIIEVSG--QKIKLQIWDTAGQERFRAVTRSYYRGAAGALMVYD  92
Pc_RAB4     16   YDFLMKYIIIGEAGTGKSCLLHQFTHNSFKEHSQHTIGVEFSSRTVKLGE--KRIKLQLWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGAILVYD  100
Tv_159077   17   YDFLMKYIIIGEAGTGKTCLLHQFTHNSFKDHSQHTIGVEFSSRTVKLGE--KRIKLQLWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGAILVYD  101
Gt_68501    17   YDFLMKYIIIGEAGTGKSCLLHQFTHNSFKDHSQHTIGVEFSSRTVKLGE--KKIKLQLWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGAILVYD  101
Cp_115410   17   YDFLMKYIIIGEAGSGKSCLLHHFIHNAFKDHSQHTIGVEFSSRTIKLGE--KRIKLQLWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGVILVYD  101
Rv_789007   17   YDFLMKYIIIGEAGTGKSCLLHHFTHNAFKDHSQHTIGVEFSSRTVKLGE--KRIKLQLWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGVILVYD  101
Po_49493    17   YDFLMKFIVIGEAGTGKSCLLHHFIHNSFKDHSQHTIGVEFSSRTVNLGE--KRIKLQLWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGAILVYD  101
```

B

```
Hs_RAB2a    3    YAYLFKYIIIGDTGVGKSCLLLQFTDKRFQPVHDLTIGVEFGARMITIDG--KQIKLQIWDTAGQESFRSITRSYYRGAAGALLVYD  87
Hs_RAB4a    10   YDFLFKFLVIGNAGTGKSCLLHQFIEKKFKDDSNHTIGVEFGSKIINVGG--KYVKLQIWDTAGQERFRSVTRSYYRGAAGALLVYD  94
Hs_RAB14    8    YSYIFKYIIIGDMGVGKSCLLHQFTEKKFMADCPHTIGVEFGTRIIEVSG--QKIKLQIWDTAGQERFRAVTRSYYRGAAGALMVYD  92
Pc_RABba    6    WHYVLKFIITGDAAVGKSSLLVRLTDQRFLANPDPTLGVEFGSKLITIPEENKVVKLQCWDTAGTESFRSITRSYYRGAAGCLLVYD  92
Tv_165202   6    WHYVLKFIITGDAAVGKSSLLVRLTDQRFLANPDPTLGVEFGSKLITIPEENKIVKLQCWDTAGTESFRSITRSYYRGAAGCLLVYD  92
Gt_71713    6    WHYVLKFIITGDAAVGKSSLLVRLTDQRFLANPDPTLGVEFGSKLITIPEENKIVKLQCWDTAGTESFRSITRSYYRGAAGCLLVYD  92
Cp_96988    6    WHYVLKFIITGDAAVGKSSLLVRLTDQRFLANPDPTLGVEFGSKLIEIPEEGKIVKLQCWDTAGTESFRSITRSYYRGAAGCLLVYD  92
Rv_867972   6    WHYVLKFIITGDAGVGKSSLLIRLTDQRFLANPDPTLGVEFGSKLIKIPDEEKIVKLQCWDTAGTESFRSITRSYYRGAAGCLLVYD  92
Po_1031719  6    WHYVFKFIITGDAAVGKSSLLIRLTDQRFLVNPDPTLGVEFGSKLIEIPEENKVIKLQCWDTAGTESFRSITRSYYRGAAGCLLVYD  92
Sl_1077077  6    WHYVLKFIITGDAAVGKSSLLVRLTDQRFLTNPDPTLGVEFGSKLIEIPEEGKIVKLQCWDTAGTESFRSITRSYYRGAAGCLLVYD  92
```

Figure 56. Alignement multiple des séquences protéiques regroupées dans les embranchements contenant *Pc*RAB4 (A) et *Pc*RABba (B) dans les analyses phylogénétiques des protéines RAB14 GTPases. Le nom des séquences est annoté par l'abréviation du nom de l'espèce et l'ID de la séquence protéique. Les séquences humaines RAB2, RAB4 et RAB14 GTPases ont été inclues dans l'alignement comme référence. Les acides aminés impliqués dans l'association du GDP et GTP sont surlignés en vert (sérine) et violet (thréonine). Les acides aminés impliqués dans l'hydrolyse du GTP sont surlignés en bleu (glutamine) et orange (thréonine). Les noms complets des abréviations utilisées sont les suivants : Pc (*Phanerochaete chrysosporium*); Tv (*Trametes versicolor*); Gt (*Gloephyllum trabeum*); Cp (*Coniophora puteana*); Rv (*Rhizopogon vinicolor*); Po (*Pleurotus ostreatus*) et Sl (*Serpula lacrymans*).

Deux variants (S33N et Q78L) ont ainsi été générés pour la protéine *Pc*RAB4 et trois variants (S23N, T70L et T70Q) dans le cas de la protéine *Pc*RABba. De manière intéressante, la glutamine en position 70 (sur la séquence de *Hs*RAB14) conservée au sein des séquences RAB GTPases humaines n'est pas conservée dans la séquence protéique de *Pc*RABba et est substituée par une thréonine. Nous avons donc généré un troisième variant, comme contrôle, où la thréonine est substituée par une glutamine.

Tableau 15. Récapitulatif des variants de RAB GTPases et des substitutions générées. La position des acides aminés mutés est indiquée pour les GTPases *Pc*RAB4 et *Pc*RABba, et *Hs*RAB1a comme référence.

RAB GTPase	Etat lié au GDP	Etat lié au GTP
*Hs*RAB1a	S25N	Q70L
*Pc*RAB4	S33N	Q78L
*Pc*RABba	S23N	T70L

Concernant la protéine *Pc*RAB4 GTPase, aucune interaction n'a été détectée entre les variants de *Pc*RAB4 (sauvage, S33N, Q78L) et les 3 isoformes de la protéine *Pc*DENND6 sauvage (Fig. 57). Il en est de même pour les 3 isoformes de la version mutante de la protéine *Pc*DENND6 (E234K) et les

variants de *Pc*RAB4 (Fig. 57). Ces résultats suggèrent ainsi l'absence d'interaction des protéines *Pc*DENND6 et *Pc*RAB4 GTPase dans ces conditions.

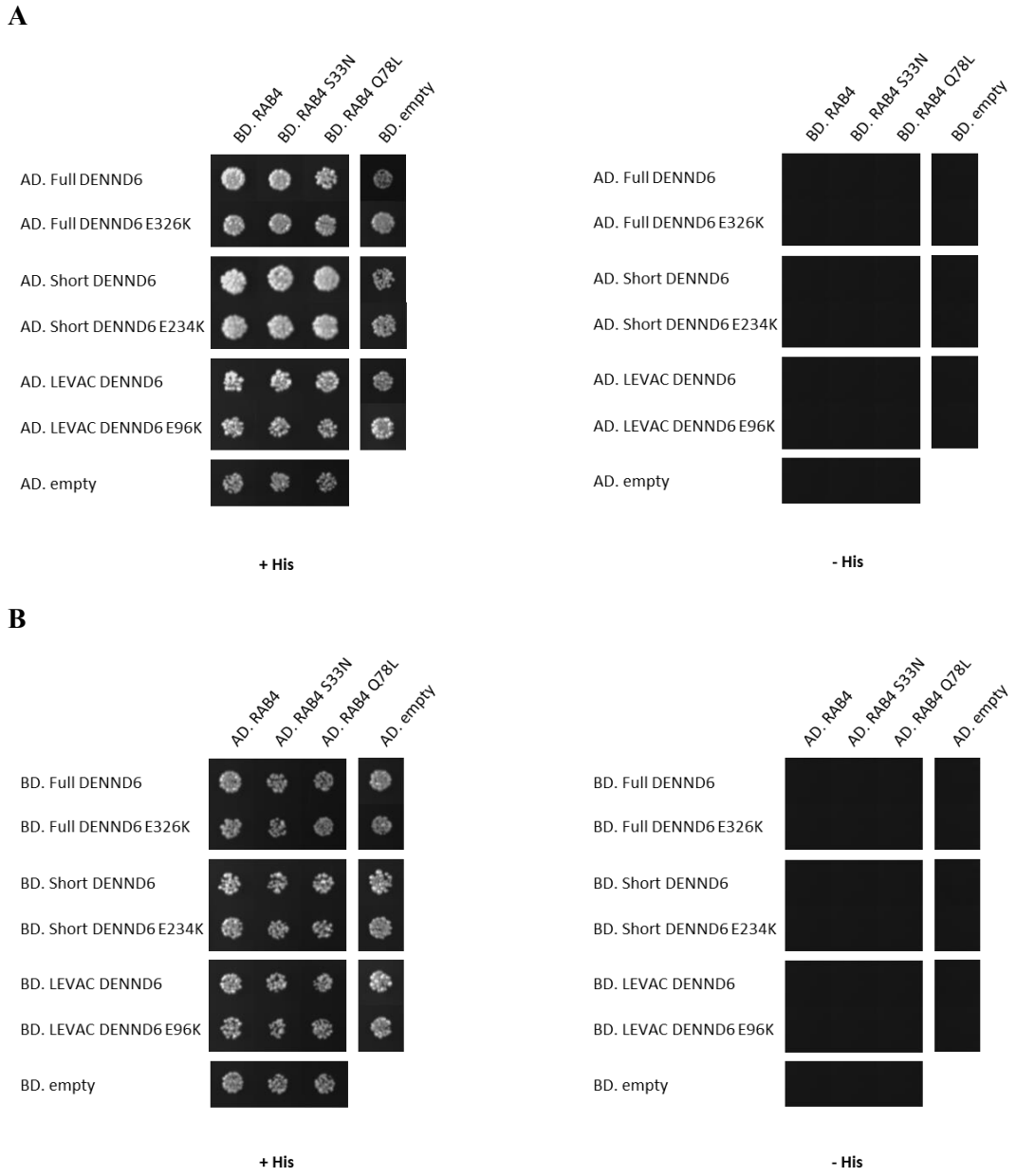


Figure 57. Test d'interaction par double hybride entre les versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6 et les variants de *Pc*RAB4. Les isoformes de *Pc*DENND6 sont nommées Full (pour pleine longueur), Short (pour longueur intermédiaire) et LEVAC (pour petite longueur). Les variants de *Pc*RAB4 incluent la forme sauvage, une forme dans un état lié au GDP (S33N) et une forme dans un état lié au GTP (Q78L). (A) Les interactions ont été expérimentées avec les isoformes de *Pc*DENND6 fusionnées au domaine d'activation de GAL4 (nommé AD) et les variants de *Pc*RAB4 fusionnés au domaine de liaison de GAL4 (nommé BD). (B) Les interactions ont été expérimentées avec les isoformes de *Pc*DENND6 fusionnées au domaine de liaison de GAL4 et les variants de *Pc*RAB4 fusionnés au domaine d'activation de GAL4. Des contrôles ont été réalisés avec les vecteurs pGAD et pGBK natifs et les candidats d'intérêt pour confirmer l'absence d'auto-activation. La croissance des levures a été analysée après 5 jours d'incubation à 28°C en absence d'histidine (- His) en comparaison à un milieu contrôle contenant de l'histidine (+ His).

Concernant la protéine *Pc*RABba GTPase, aucune interaction n'a été détectée entre les isoformes de la protéine *Pc*DENND6 et le variant mimant un état lié au GDP (S23N) (Fig. 58). De manière intéressante, une interaction entre les versions sauvage et mutante de l'isoforme « longueur intermédiaire » de la protéine *Pc*DENND6 a été détectée avec le variant *Pc*RABba dans un état lié au GTP (T70L). Cette interaction a été détectée uniquement avec la construction exprimant *Pc*RABba fusionnée au domaine d'activation de GAL4.

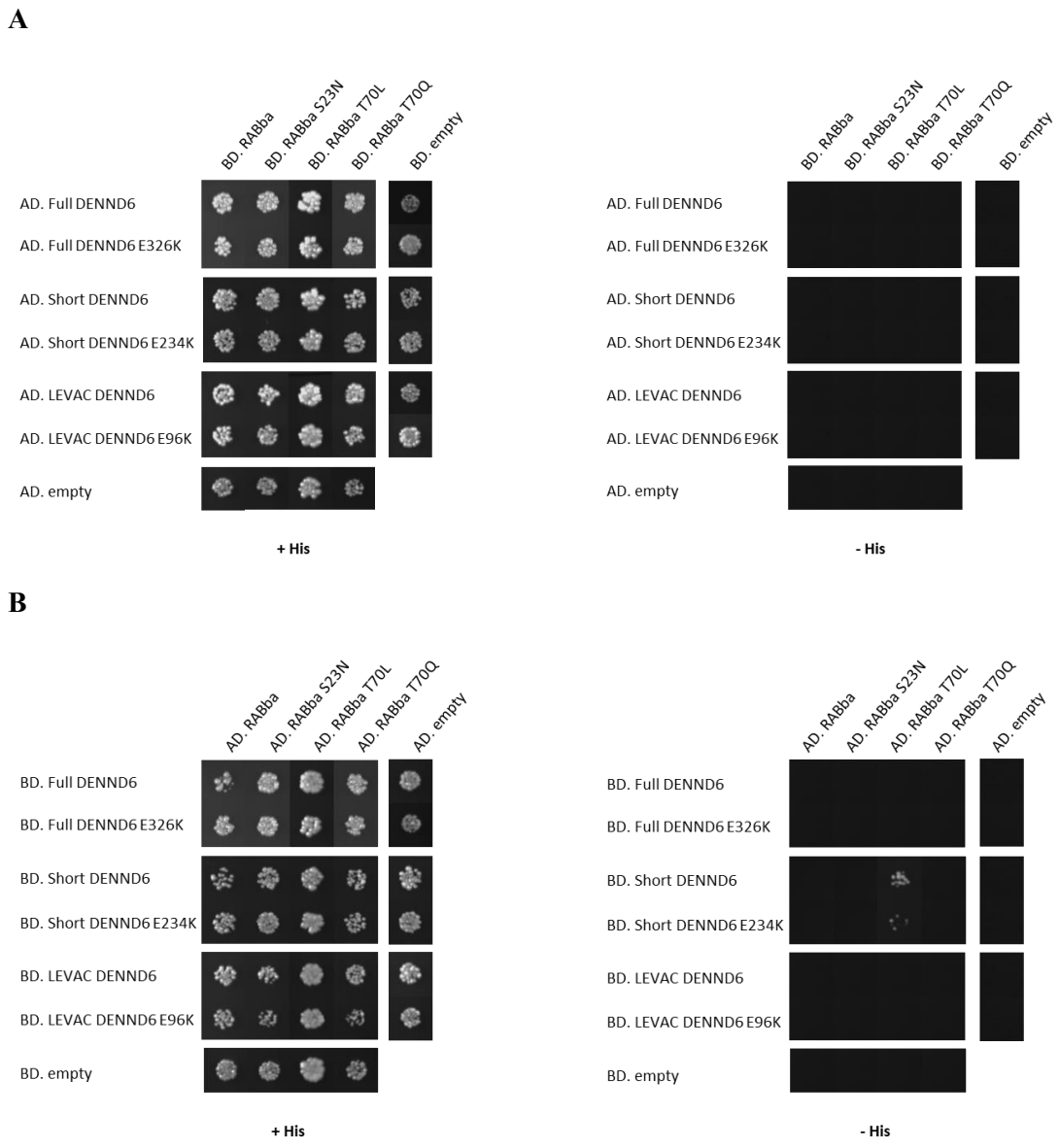


Figure 58. Test d'interaction par double hybride entre les versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6 et les variants de *Pc*RABba. Les isoformes de *Pc*DENND6 sont nommées Full (pour pleine longueur), Short (pour longueur intermédiaire) et LEVAC (pour petite longueur). Les variants de *Pc*RABba incluent la forme sauvage, une forme dans un état lié au GDP (S23N), une forme dans un état lié au GTP (T70L) et une forme contenant l'acide aminé conservé identifié dans les séquences protéiques des RAB GTPases humaines (T70Q). (A) Les interactions ont été expérimentées avec les isoformes de *Pc*DENND6 fusionnées au domaine d'activation de GAL4 (nommé AD) et les variants de *Pc*RABba fusionnés au domaine de liaison de GAL4 (nommé BD). (B) Les interactions ont été expérimentées avec

les isoformes de *Pc*DENND6 fusionnées au domaine de liaison de GAL4 et les variants de *Pc*RABba fusionnés au domaine d'activation de GAL4. Des contrôles ont été réalisés avec les vecteurs pGAD et pGBK natifs et les candidats d'intérêt pour confirmer l'absence d'auto-activation. La croissance des levures a été analysée après 5 jours d'incubation à 28°C en absence d'histidine (- His) en comparaison à un milieu contrôle contenant de l'histidine (+ His).

Pour confirmer les interactions détectées entre ces protéines, trois réplicats biologiques ont été expérimentés et incubés durant 5 et 7 jours (Fig. 59). Ces différents temps d'incubation ont ainsi permis de valider une interaction entre ces protéines et de mettre en évidence la présence d'une interaction réduite entre la version mutante de *Pc*DENND6 et le variant de *Pc*RABba dans un état lié au GTP (T70L) en comparaison à la version sauvage de *Pc*DENND6.

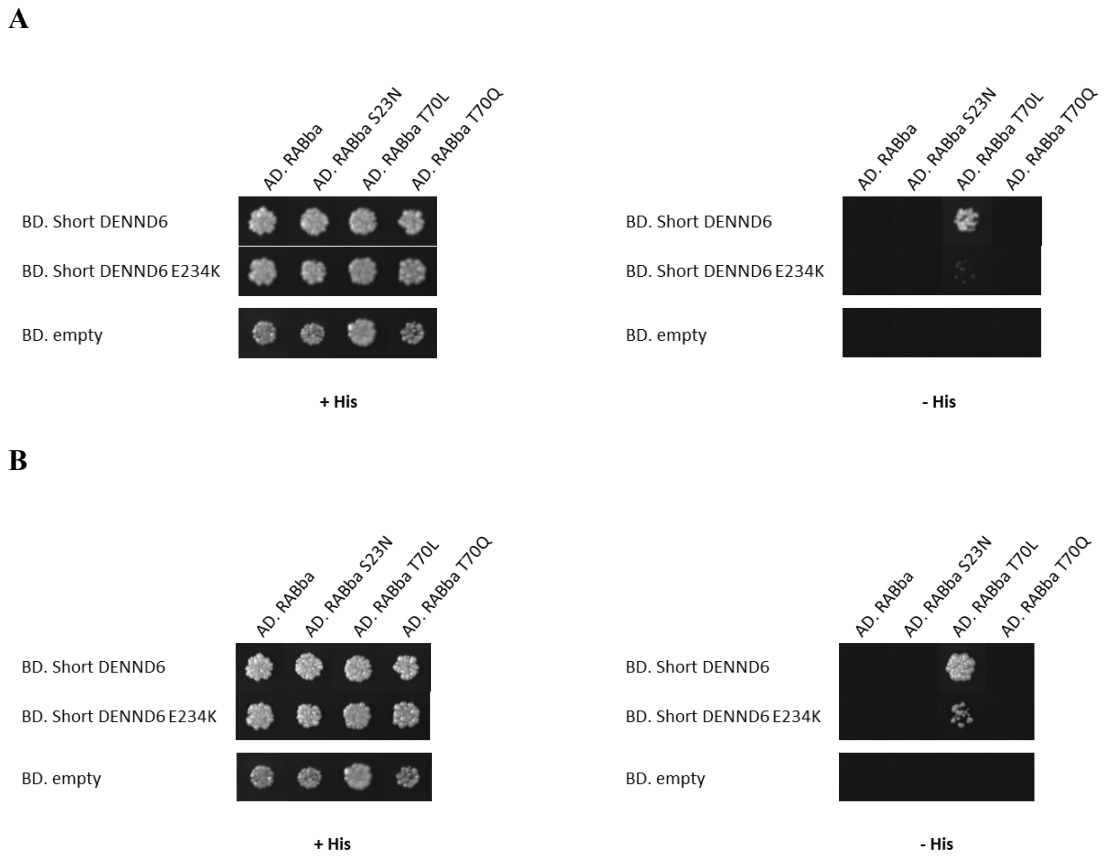


Figure 59. Confirmation des interactions détectées par double hybride entre les versions sauvage et mutante de l'isoforme « longueur intermédiaire » de *Pc*DENND6 et le variant *Pc*RABba T70L. Les isoformes « longueur intermédiaire » de *Pc*DENND6 sont nommées Short. Les interactions ont été détectées et confirmées uniquement avec les versions sauvage et mutante de *Pc*DENND6 fusionnées au domaine de liaison de GAL4 (nommé BD) et le variant *Pc*RABba T70L fusionné au domaine d'activation de GAL4 (nommé AD). Des contrôles ont été réalisés avec le vecteur pGBK natif et les candidats d'intérêt pour confirmer l'absence d'auto-activation. La croissance des levures a été analysée après 5 et 7 jours d'incubation à 28°C (A et B, respectivement) en absence d'histidine (-His) en comparaison à un milieu contrôle contenant de l'histidine (+ His).

Dans la littérature, les interactions RAB GTPases – GEFs sont identifiées par double hybride avec une forme mimant un état lié au GDP (Koch et al, 2016). Ces interactions ont été mises en évidence avec des protéines possédant une activité GEF, dont les protéines à domaine DENN (Miserey *et al.*, 2007, Mori *et al.*, 2013, Sato *et al.*, 2008). L'absence d'interaction entre les protéines *Pc*DENND6 et ce variant suggère ainsi l'absence d'activité GEF de ces protéines pour les RAB GTPases étudiées. Cependant, une interaction des protéines *Pc*DENND6 avec le variant de *Pc*RABba mimant un état lié au GTP suggère l'implication de ces protéines dans des processus de cascade de RAB GTPase. Ces phénomènes ont été décrits avec plusieurs protéines GEF (Hutagalung et Novick, 2011). Cela signifie qu'une protéine GEF interagit avec une première RAB GTPase dans un état lié au GTP puis avec une seconde dans un état lié au GDP pour laquelle elle a une activité GEF (Fig. 60). Ces processus permettent notamment une régulation spatio-temporelle et une directionnalité des étapes du trafic membranaire. En ce sens, une hypothèse probable serait une interaction de la protéine *Pc*DENND6 avec *Pc*RABba dans un état lié au GTP conduisant à un changement d'état de *Pc*DENND6 *in vivo* et ainsi à une interaction avec une seconde RAB GTPase pour laquelle elle présente une activité GEF.

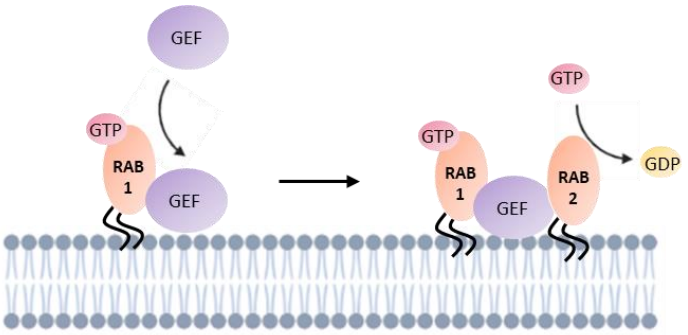


Figure 60. Représentation schématique des processus appelés « cascade de RAB GTPases » (adapté de Hutagalung et Novick, 2011).

Chez l'homme, la protéine RAB11 colocalise avec la protéine RAB14 dans un état lié au GTP au niveau des endosomes de recyclage (Kelly *et al.*, 2010). La protéine RAB11 pourrait ainsi constituer la seconde RAB GTPase de la cascade pour laquelle la protéine *Pc*DENND6 a une activité GEF. Pour tester cette hypothèse, l'interaction entre *Pc*DENND6 (longueur intermédiaire) et l'orthologue de *Hs*RAB11 chez *P. chrysosporium* a été testée en double hybride. Dans ces conditions, aucune interaction n'a été détectée entre les candidats d'intérêt (résultats non montrés). Cependant, une auto-activation de *Pc*RAB11 a été détectée lorsqu'il est fusionné au domaine d'activation de GAL4 masquant une éventuelle interaction entre *Pc*DENND6 et *Pc*RAB11, puisque nous avons montré précédemment que seule la construction exprimant *Pc*RABba T70L fusionnée au domaine d'activation de GAL4 interagit avec *Pc*DENND6 (Fig. 58 et 59).

1.4 Rôle de la protéine DENND6 dans un phénomène de multi-résistance aux extractibles de bois

Afin de déterminer si le phénotype de résistance observé chez le mutant *bag4* est spécifique aux extractibles de bois de *B. guianensis*, nous avons évalué la capacité du mutant *bag4* à minéraliser du bois de hêtre et de peuplier en comparaison à la souche sauvage (Fig. 61).

La composition en extractibles de ces essences est différente. Les extractibles de bois de *B. guianensis* (extraction avec de l'acétate d'éthyl) contiennent des flavonoïdes (steppogenin, katuranine, dihydromorine), des stilbénoïdes (trans-resvératrol, trans-oxyresvératrol, arachidine-2, arachidine-4, alboctalol, (-)-epialboctalol and artogomezianol), des moracines (moracine M, moracine N, moracine P, moracine Z, 6-O-méthyl-moracine M and 6-O-méthyl-moracine N), du β-sitostérol et du résorcinol (Royer *et al.*, 2010). L'analyse de la composition en extractibles de bois de hêtre (extraction avec du cyclohexane et un mélange méthanol/eau) a permis d'identifier des flavonoïdes (ex : catéchine, taxifoline), des composés phénoliques simples (ex : vanilline, acide vanillique, acide syringique, inositol, dilignol), des acides gras saturés et insaturés, et des alcools gras (Vek *et al.*, 2015). Enfin, l'analyse de la composition en extractibles de bois de peuplier (extraction avec un solvant chloroforme-éthanol) a permis d'identifier un ensemble de composés phénoliques (ex : vanilline, syringaldéhyde, acétosyringone), des stérols et des terpénoïdes (Szadkowska *et al.*, 2021).

Comme pour le bois de *B. guianensis* (Chapitre II – Noel et al, unpublished), une faible quantité de CO_2 (< 100 mg) a été mesurée pour la souche sauvage de *P. chrysosporium* après une période d'incubation de 4 mois sur du bois de hêtre et de peuplier, suggérant une faible capacité de cette souche à se développer sur ces essences (Fig. 61). En revanche, une quantité de CO_2 de 900 mg et 700 mg a été mesurée pour le mutant *bag4* après 4 mois d'incubation sur du bois de hêtre et de peuplier, respectivement. Ces résultats démontrent une capacité supérieure du mutant *bag4* à minéraliser le bois de ces essences en comparaison à la souche sauvage, suggérant une résistance accrue aux propriétés antifongiques des extractibles de bois de hêtre et de peuplier. Afin de confirmer cette hypothèse, des tests d'inhibition de croissance seront réalisés pour la souche sauvage de *P. chrysosporium* et le mutant *bag4* en présence des extractibles de ces essences.

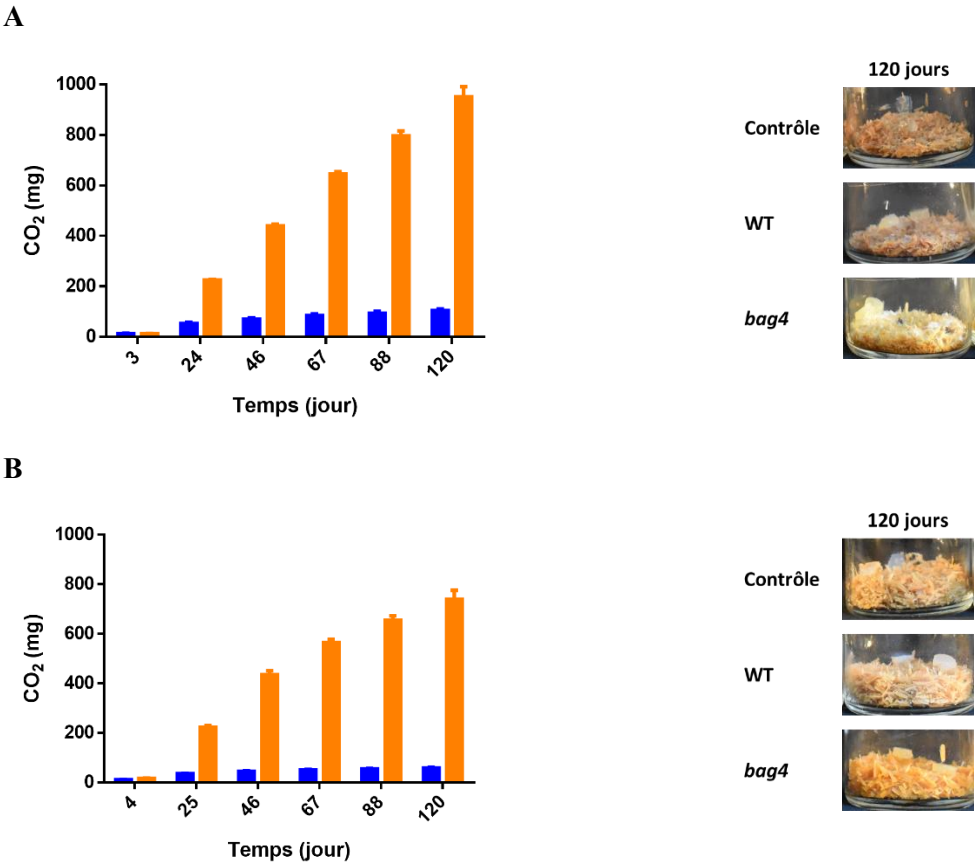


Figure 61. Essais de minéralisation du bois de hêtre (A) et de peuplier (B) par le mutant *bag4* et la souche sauvage de *P. chrysosporium*. Les quantités de CO_2 émises au cours du temps sont représentées en bleu pour la souche sauvage et en orange pour le mutant *bag4*. Les écarts-types ont été calculés à partir de 6 réplicats biologiques.

Ce phénomène de multi-résistance a été décrit dans la littérature (Yang *et al.*, 2019) et a été associé à (1) une augmentation de l'efflux des molécules antifongiques, (2) une augmentation des processus de détoxication, ou (3) une diminution de l'import des molécules antifongiques. Bien que la fonction des protéines DENND6 ne soit pas connue chez les champignons, la fonction générale des protéines à domaine DENN est associée à la régulation des processus d'endocytose et d'exocytose (Pinar *et al.*, 2021). Les mutations identifiées dans la protéine DENND6 des mutants *bag* pourrait ainsi conférer un gain de fonction dans une voie de signalisation associée à l'import, l'export ou la détoxication des molécules antifongiques, résultant en l'acquisition potentielle d'une multi-résistance par les mutants.

2. Conclusion et perspectives

2.1 La protéine *Pc*DENND6 est-elle la cible d'une toxine des extractibles de bois de *B. guianensis* ?

Pour identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux extractibles de bois de *B. guianensis* chez ces mutants, notre première hypothèse est que la protéine *Pc*DENND6 constitue la cible d'une molécule toxique dans les extractibles. Nous avons montré que la protéine *Pc*DENND6 a une activité GTPase et interagit avec la protéine *Pc*RABba dans un état lié au GTP. Dans le cas du variant E234K, cette activité et cette interaction sont réduites. Sachant que le mutant *bag4* qui porte cette mutation est résistant aux extractibles de bois de *B. guianensis*, l'acide aminé E234 pourrait faire partie du site de fixation d'une molécule toxique présente dans ces extractibles qui aurait pour conséquence (i) une altération de l'activité de *Pc*DENND6 et/ou (ii) un changement de conformation de la protéine conduisant à une perturbation de l'interaction avec sa protéine partenaire.

En effet, un des mécanismes majeurs de résistance à des toxines (ex : rapamycine) est expliqué par la présence de mutations au sein du gène codant sa cible protéique (Nguyen, 2020). Les mutations générées sont responsables d'un changement de conformation de la protéine, résultant en une perte d'affinité de la toxine pour sa cible protéique et ainsi à un phénotype de résistance (Mair *et al.*, 2016). La résistance des mutants aux extractibles de bois de *B. guianensis* pourrait ainsi être expliquée par la perte d'affinité d'une toxine pour la protéine *Pc*DENND6 chez les mutants identifiés avec une mutation au sein du gène codant cette protéine. Pour répondre à cette hypothèse, la ou les molécules responsables des propriétés antifongiques des extractibles de bois de *B. guianensis* devront être identifiées et leurs effets sur les activités GTPases et les interactions entre *Pc*DENND6 et *Pc*RABba devront être testés.

Précédemment, les propriétés antifongiques des extractibles de bois de *B. guianensis* ont été démontrées contre un champignon de pourriture blanche (*Pycnoporus sanguineus L.* (Murrill) 270 (CTFT)) et deux champignons pathogènes (*Candida glabrata* ATCC 15126 et *Trichophyton rubrum*) (Royer *et al.*, 2012). Afin d'identifier les molécules avec des propriétés antifongiques dans ces extraits, ces derniers ont été fractionnés et évalués pour leurs activités antifongiques. Parmi ces composés, les molécules 6-O-méthyl-moracine N et moracine N présentent les activités antifongiques les plus importantes (MIC comprises entre 4 et 16 µg/mL). Pour déterminer si une toxine est présente dans les extractibles de bois de *B. guianensis*, la même stratégie sera utilisée contre *P. chrysosporium*. Une fois la ou les molécule(s) identifiée(s), des expériences de thermal shift assay pourront être réalisées pour déterminer si une interaction physique existe entre la protéine DENND6 et ces molécules, et si cette interaction est altérée avec les variants de DENND6. Cette méthode a été expérimentée au laboratoire avec des protéines appartenant à la superfamille des GST et a permis d'identifier des interactions entre ces protéines et de

nombreux composé phénoliques issus d'extractibles de bois (Barbier *et al.*, 2020; Perrot *et al.*, 2018, 2020).

2.2 La mutation E234K dans la protéine *Pc*DENND6 induit-elle une résistance au stress chez *P. chrysosporium* ?

Pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux extractibles de bois de *B. guianensis* chez les mutants *bag*, notre seconde hypothèse est que la protéine *Pc*DENND6 n'est pas la cible directe d'une toxine des extractibles, mais est impliquée dans un processus plus général de réponse au stress (Noel *et al.*, 2023). Pour répondre à cette hypothèse, nous avons évalué la capacité d'un mutant de la collection à minéraliser plusieurs essences de bois (*B. guianensis*, hêtre et peuplier) dont la composition en extractibles est différente. Les résultats obtenus ont permis de mettre en avant une capacité supérieure du mutant *bag4* à minéraliser ces essences en comparaison à la souche sauvage de *P. chrysosporium*, suggérant l'acquisition d'une multi-résistance par ce mutant.

Bien que la composition en extractibles soit différente entre ces essences, un ensemble de composés phénoliques communs peut être identifié (ex : vanilline, syringaldéhyde, acétosyringone, acide vanillique, acide benzoïque, cinnamaldéhyde). Ces derniers présentent des activités chaotropes ou hydrophobes, et ont été définis avec des propriétés stressantes (Cray *et al.*, 2013, 2015). Des approches de transcriptomiques ont permis de mettre en évidence également des réponses de remédiation et de stress chez *P. chrysosporium* en réponse à des extractibles de chêne. Une expression différentielle des gènes impliqués dans la production et conversion d'énergie, et dans les premières étapes de détoxication du xénome (CytP450 et GST) a été observée (Fernández-González *et al.*, 2018). En revanche, aucune différence d'expression différentielle n'a été observée pour les gènes codant les protéines *Pc*DENND6, *Pc*RAB4 et *Pc*RABba dans cette expérience. La capacité du mutant *bag4* à minéraliser les bois de *B. guianensis*, hêtre et peuplier pourrait ainsi indiquer un rôle du variant E234K de la protéine *Pc*DENND6 dans la résistance à des stress induits par des composés phénoliques.

Dans la littérature, les propriétés antifongiques de plusieurs composés chaotropes ou hydrophobes (ex : vanilline, guaïacol et cinnamaldéhyde) ont été associées à une augmentation de la perméabilité membranaire, de la production d'espèces réactives de l'oxygène et à une altération de l'homéostasie du calcium (Cray *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Les extractibles de bois de *B. guianensis* comprennent principalement les molécules de 6-O-méthyl-moracine N et moracine N (Royer *et al.*, 2012). Dans la littérature, le mode d'action de la 6-O-méthyl-moracine N a été étudié chez des cellules cancéreuses humaines (Gao *et al.*, 2020). Les auteurs ont montré une induction de ROS dépendante de la concentration de 6-O-méthyl-moracine N utilisée. La génération des ROS a conduit à deux phénomènes : (1) un dysfonctionnement des activités

mitochondriales résultant en l'activation des voies de l'apoptose, et (2) une inhibition de la voie de TOR résultant en l'activation de l'autophagie. Pour obtenir davantage d'informations sur le mode d'action des extractibles de bois de *B. guianensis* chez *P. chrysosporium*, les analyses pourraient être initiées par une quantification de ROS pour évaluer le stress oxydant, et utiliser des techniques décrites précédemment (Mani-López *et al.*, 2021) pour identifier une potentielle altération de la paroi, une altération de l'intégrité de la membrane plasmique, un changement de la morphologie cellulaire, une altération de l'homéostasie cellulaire et un dysfonctionnement des mitochondries.

Pour comprendre comment la mutation E234K dans la protéine *Pc*DENND6 permet la résistance aux extractibles de bois, il sera nécessaire également de déterminer la fonction de cette protéine chez *P. chrysosporium* et les effets de cette mutation sur sa fonction. Chez l'homme, la protéine DENND6 est impliquée dans des voies de recyclage endocytiques (Lindford *et al.*, 2012). Afin d'étudier le rôle de la protéine *Pc*DENND6 dans ces processus, nous envisageons d'utiliser le marqueur FM4-64. Il est internalisé à la membrane plasmique par endocytose et colore les endosomes, les vésicules du Spitzenkörper et les membranes vacuolaires chez les champignons (Fischer-Parton *et al.*, 2000). L'utilisation de ce marqueur permet ainsi de mettre en évidence une altération des processus endocytiques chez des mutants affectés dans l'endocytose (Penalva *et al.*, 2005).

Pour cela, des transformants de *P. chrysosporium* produisant les protéines de fusion DENND6-GFP ou DENND6 E234K-GFP seront utilisés comme outils. Le marquage des hyphes des transformants de *P. chrysosporium* avec le colorant FM4-64 permettra ainsi d'analyser le phénotype endocytique de ces champignons ainsi que la localisation des protéines sauvage et mutante de *Pc*DENND6 au niveau des compartiments endocytiques. Ces analyses pourront être effectuées dans un premier temps en réponse à un milieu minimum et riche (Penalva *et al.*, 2005). Une fois les phénotypes endocytiques analysés en absence d'agent stressant, nous envisageons de regarder les effets des extractibles de bois de *B. guianensis* sur l'internalisation du marqueur FM4-64, les processus endocytiques et la localisation des protéines PcDENND6 chez *P. chrysosporium*.

3. Matériels et méthodes

3.1 Souches bactériennes

Clonage et amplification de plasmides recombinants

La souche DH5α d'*E. coli* a été utilisée pour les expériences de clonage et les amplifications de plasmides recombinants. Le génotype de la souche DH5α est le suivant : F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1. Cette souche a été optimisée pour améliorer l'efficacité de transformation et présente plusieurs mutations. Elle contient une mutation dans le gène recA1 ce qui permet d'inactiver l'activité de recombinases et empêche la recombinaison homologue. Cela permet d'éviter d'introduire des mutations dans le plasmide lors de sa réplication. Elle contient également une mutation dans le gène endA ce qui permet d'inactiver une endonucléase spécifique de l'ADN et empêche la dégradation des plasmides insérés dans les bactéries. Cela permet ainsi d'obtenir une bonne qualité et un bon rendement des ADN plasmidiques après extraction et purification. Enfin, la mutation *lac*ZΔM15 permet d'inactiver l'activité de la β-galactosidase. Cette mutation permet ainsi d'utiliser le système lacZ comme stratégie de clonage avec une sélection blanc/bleu.

Expression et production de protéines recombinantes

Plusieurs souches d'expression d'*E. coli* ont été utilisées dans le but d'optimiser la production et la solubilité des protéines d'intérêt. Cela comprend les souches BL21 (DE3) pSBET, BL21 (DE3) GroEL – GroES, C41 (DE3), Origami2 (DE3), Rosetta 2 (DE3) pRARE2 et Rosetta 2 (DE3) pRARE2 -pLys. Le génotype de ces souches est décrit dans le tableau ci-dessous.

Souche d'expression d'*E. coli*	Génotype
BL21 (DE3)	F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)
Rosetta 2 (DE3)	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)
C41 (DE3)	F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)
Origami2 (DE3)	*Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvu*II *phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[lac^+ $lacI^q$ *pro*] (DE3) *gor522*::Tn*10 trxB* (Str^R, Tet^R)

Tableau 16. Génotype des souches d'expression d'*E. coli* utilisées dans cette étude.

L'ensemble des souches d'expression utilisées contiennent le prophage lambda DE3 et possèdent ainsi une copie chromosomique du gène codant pour l'ARN polymérase T7. Ce gène est sous le contrôle du promoteur lacUV5 qui est inductible à l'IPTG. La transformation de ces souches avec des vecteurs d'expression pour lesquels les gènes clonés sont sous le contrôle du promoteur T7 permet ainsi la surexpression des protéines d'intérêt par induction à l'IPTG. De plus, les souches utilisées dans cette

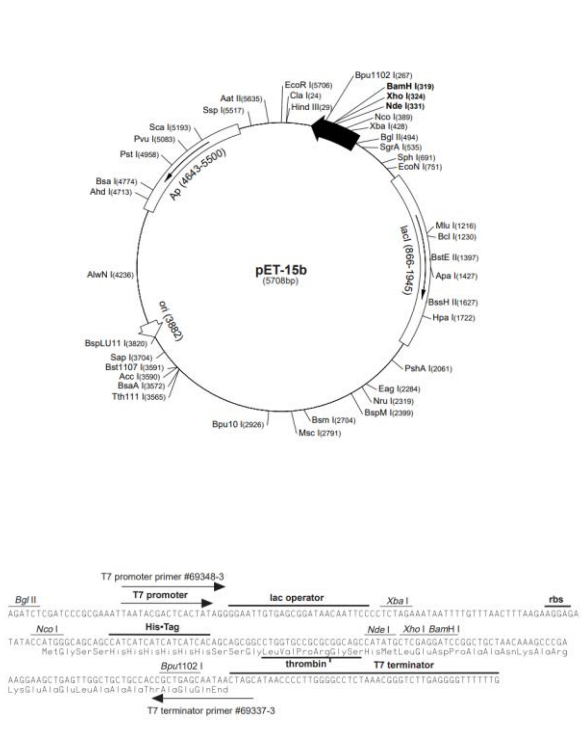
étude contiennent un plasmide qui porte le gène codant le lysozyme du phage T7 à l'exception de la souche Rosetta 2 (DE3) pRARE2 -pLys. Il s'agit d'un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase T7 ce qui permet de supprimer l'expression basale des protéines d'intérêt avant induction à l'IPTG.

La souche BL21 (DE3) représente la souche standard pour l'expression de protéines recombinantes. Cette souche a été utilisée avec le plasmide psBET qui permet la synthèse d'ARNt reconnaissant les codons rares AGG et AGA. Cette souche a été utilisée également avec le plasmide GroEL GroES qui permet la surexpression des chaperones GroEL et GroES dans le but de favoriser le bon repliement et la solubilité des protéines recombinantes. Enfin, cette souche a été utilisée avec le plasmide pRARE2 qui permet la synthèse d'ARNt pour 7 codons rares (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, et CGG).
La souche Rosetta 2 (DE3) est un dérivé de la souche BL21 qui a été optimisée pour l'expression de protéines eucaryotes contenant des codons rarement utilisés chez *E. coli*. La souche utilisée contient le plasmide pRARE2. Une variante de cette souche (Rosetta pRARE2 -pLYS) qui n'exprime pas le lysozyme du phage T7 a également été utilisée pour la production de certaines protéines d'intérêt.
La souche C41 (DE3) est utilisée pour l'expression de protéines toxiques. Cette souche présente une mutation qui empêche la mort cellulaire induite par l'expression de protéines toxiques.
La souche Origami2 (DE3) est un dérivé de la souche K-12 qui présente une mutation au sein des gènes codant la thiorédoxine réductase (*trxB*) et la glutathione réductase (*gor*). Cette souche est particulièrement adaptée pour la production de protéines recombinantes nécessitant la formation de ponts disulfures pour avoir un repliement correct.

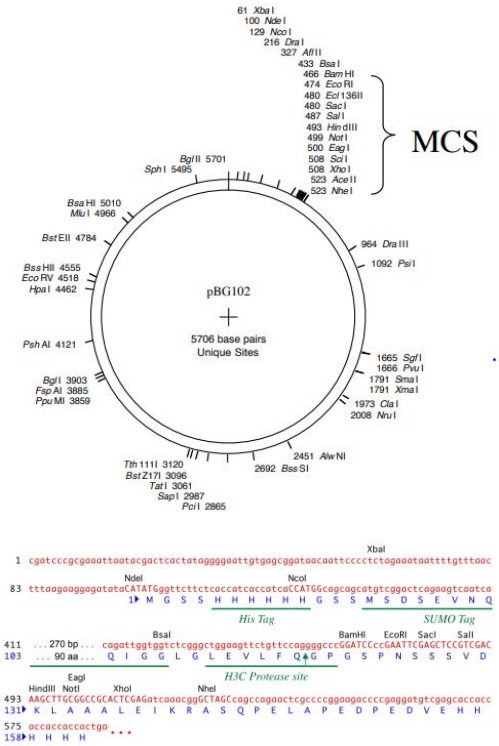
3.2 Souche de levure

La souche CY306 de *S. cerevisiae* a été utilisée pour les tests d'interaction en double hybride. Le génotype de la souche CY306 est le suivant : MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2- 801, leu2-3, leu2-112, trp11-901, gal4-542, gal80-538, lys2::UASGAl1-TATAGAL1-HIS3, URA3::UASGal4 17MERS(x3)- TATACYC1-LacZ, trx1::KanMX4, trx2::KanMX4 (Vignols *et al.*, 2005). Cette souche est auxotrophe pour les molécules suivantes : uracile, histidine, adénine, lysine, leucine, tryptophane et histidine. Elle porte des mutations dans les gènes *GAL4* et *GAL80* ce qui permet d'utiliser le système de double hybride par la reconstitution du facteur de transcription GAL4. Elle est également délétée pour les gènes codant les thiorédoxines 1 et 2.

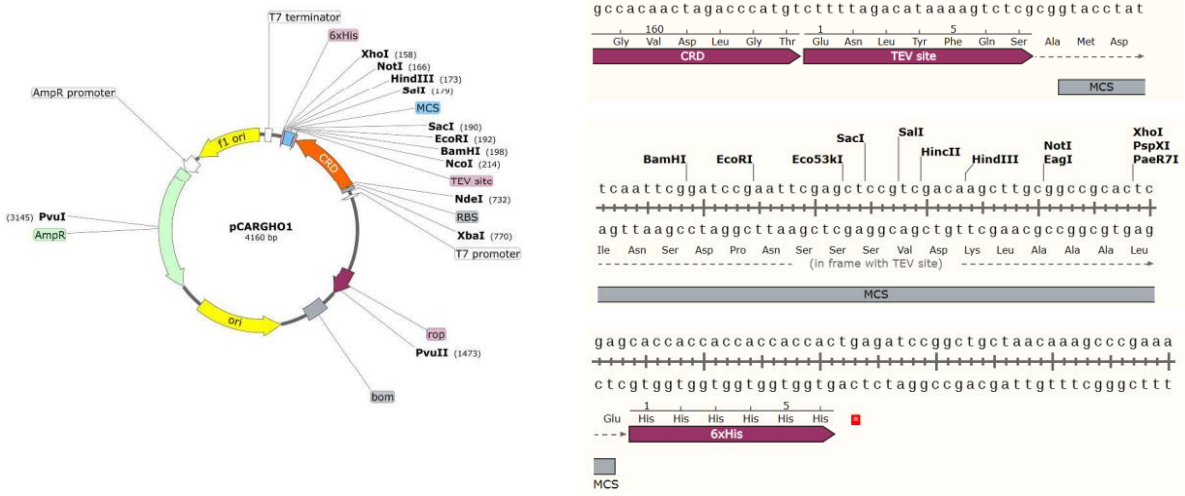
3.3 Cartes plasmidiques utilisées pour la production de protéines recombinantes et les tests d'interaction par double hybride



Carte du plasmide pET-15b

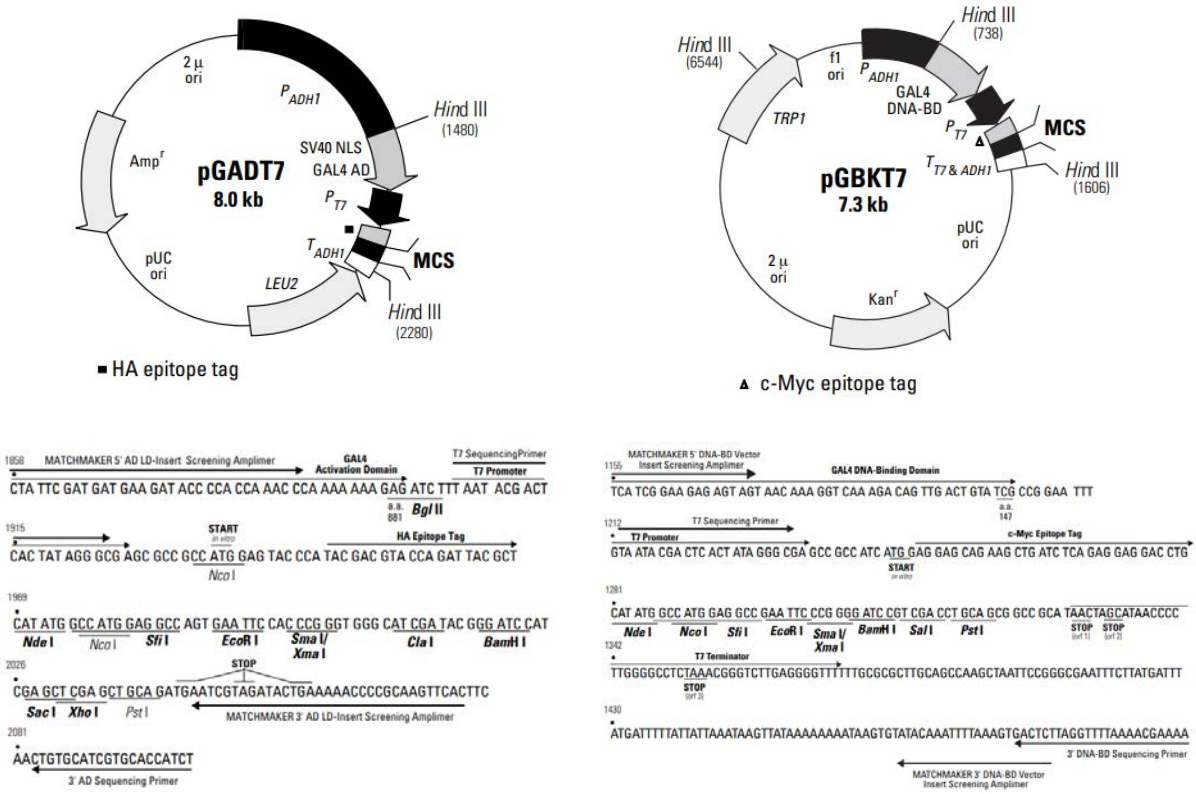


Carte du plasmide pBG102



Carte du plasmide pCARGHO1

Figure 62. Cartes des plasmides utilisés pour la production de protéines recombinantes.



Carte du plasmide pGADT7 **Carte du plasmide pGBKT7**

Figure 63. Cartes des plasmides utilisés pour les tests d'interaction en double hybride.

3.4 Etude de familles multigéniques par analyses phylogénétiques

Analyses phylogénétiques des protéines RAB14 GTPase chez les Agaricomycètes

Les séquences orthologues à la séquence protéique humaine RAB14 GTPase ont été récupérées chez 7 espèces de Basidiomycètes (*Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor*, *Gloephyllum trabeum*, *Coniophora puteana*, *Rhizopogon vinicolor*, *Pleurotus ostreatus* et *Serpula lacrymans*) sur le portail Mycocosm de JGI et chez *Homo sapiens* sur les bases de données Ensembl en utilisant l'outil BlastP et un seuil avec une E-value > 10^{-5} (Cunningham *et al.*, 2022; Grigoriev *et al.*, 2014). Un total de 113 séquences avec une E-value < 10^{-5} a été récupéré et utilisé pour la suite des analyses. Les alignements de séquences ont été réalisés avec MUSCLE en utilisant la méthode de cluster UPGMB. Les analyses phylogénétiques ont ainsi été conduites à partir de 113 séquences protéiques sur MEGA 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016). L'histoire évolutionnaire a été inférée par la méthode Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) et les distances évolutionnaires ont été calculées en utilisant la méthode JTT (Jones *et al.*, 1992). Les analyses ont été effectuées avec 500 bootstraps et toutes les positions ambiguës ont été enlevées pour chaque paire de séquences.

3.5 Clonage des séquences d'intérêt dans un vecteur d'expression

Amplification de fragments d'ADN et insertion dans un vecteur d'expression

L'ensemble des séquences codant pour les isoformes de *Pc*DENND6 et les RAB GTPases ont été amplifiées par PCR avec la polymérase Herculase II Fusion DNA (Agilent, Catalog #600675) à partir d'ADN complémentaire de *P. chrysosporium* ou de plasmides recombinants. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 50 µL et se composent de : un tampon de réaction Herculase II 5X, 0,24 mM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce (forward et reverse), 30 ng de matrice d'ADN et 0,5 µL d'ADN polymérase Herculase II Fusion. Les produits PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel agarose 1 % dans du tampon TBE 1X (Tris 9 mM, Borate 9 mM, EDTA 0,2 mM) et révélés par UV grâce à la présence de bromure d'éthidium (0,0005 %). Ces derniers ont été purifiés à l'aide du kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, code: 28-9034-71). Les produits PCR purifiés ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction appropriées pendant 1 heure à 37 °C et purifiés à l'aide du kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, code: 28-9034-71). Enfin, les produits PCR digérés et purifiés ont été ligués au plasmide d'intérêt digéré préalablement avec les enzymes de restriction correspondantes. Les réactions de ligature ont été incubées pendant une nuit à 4 °C en présence de T4 DNA ligase.

Transformation bactérienne et obtention des plasmides recombinants

Afin de sélectionner et d'amplifier les plasmides recombinants, des souches thermocompétentes DH5α d'*E. coli* ont été transformées avec les produits de ligature obtenus. La transformation des bactéries a été réalisée en 3 étapes : (1) une incubation des bactéries avec les produits de ligature pendant 30 minutes à 4 °C, (2) un choc thermique pendant 45 secondes à 42 °C, et (3) une incubation des bactéries transformées pendant 5 minutes à 4 °C. Les bactéries transformées ont ensuite été inoculées dans un milieu LB nutritif et incubées pendant 1 heure à 37 °C. Afin de sélectionner les bactéries ayant intégré les plasmides recombinants, l'ensemble de la suspension bactérienne a été étalée sur un milieu LB sélectif supplémenté avec un antibiotique et incubée pendant une nuit à 37 °C. Plusieurs colonies issues de l'étape de transformation ont été vérifiées par PCR et une colonie a été sélectionnée pour purifier les ADN plasmidiques recombinants. La purification des plasmides recombinants a été réalisée à l'aide du kit Illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare, code: 28-9042-70). La présence de l'insert dans les plasmides recombinants a ensuite été analysée par digestion avec les enzymes de restriction appropriées et confirmée après électrophorèse sur gel agarose 1 %. Enfin, les plasmides recombinants ont été séquencés selon la méthode Sanger (Genewiz compagny) afin de vérifier l'absence de mutation dans la séquence intégrée dans le plasmide recombinant.

3.6 Production des protéines recombinantes en système hétérologue chez *E. coli* et purification par chromatographie d'affinité

Transformation de souches d'expression d'*E. coli* par choc thermique et électrique

Pour réaliser des tests de production et solubilité des protéines recombinantes d'intérêt, une série de souches d'expression d'*E. coli* a été transformée par choc thermique ou électrique en fonction de leur compétence. Les souches Rosetta (DE3) pRARE2 et Rosetta (DE3) pRARE2 (-pLYS) sont thermocompétentes. Elles ont donc été transformées avec le même protocole que celui décrit plus haut pour la souche DH5α. Les souches BL21 (DE3) pSBET, BL21 (DE3) pRARE2, C41 (DE3), Origami2 (DE3), GroES GroEL (DE3) pSBET et C41 (DE3) pRARE2 sont électrocompétentes et ont été transformées par impulsion d'un choc électrique. Les bactéries électrocompétentes ont été déposées dans une cuve d'électroporation avec les ADN plasmidiques recombinants et ont été soumises à un choc électrique de 2 800 V pendant 5 ms. Cela permet la formation de micro-pores dans la membrane plasmique des bactéries et ainsi l'intégration des ADN plasmidiques recombinants. Les bactéries transformées ont ensuite été inoculées dans un milieu LB et incubées pendant 1 heure à 37 °C. Enfin, les bactéries transformées ont été étalées sur un milieu LB sélectif supplémenté avec les antibiotiques correspondants aux résistances portées par les plasmides.

Test de production et solubilité des protéines recombinantes

Avant de produire les protéines recombinantes à grande échelle (2,4 L de culture bactérienne), des tests de production et solubilité ont été réalisés afin d'optimiser les conditions de production des protéines recombinantes. Pour cela, une colonie de la souche d'expression bactérienne préalablement transformée a été inoculée dans une culture de 3 mL de LB et incubée pendant 3 à 4 heures à 37 °C. L'expression des protéines recombinantes a ensuite été induite par l'ajout de 0,1 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 4 heures à 37 °C. Dans le cas de tests de production et solubilité à 28 °C et 20 °C, les cultures bactériennes ont été supplémentées avec 0,5 % d'éthanol et incubées pendant 3 h à 4 °C avant induction. L'expression des protéines recombinantes a ensuite été induite par l'ajout de 0,1 mM d'IPTG pendant 12 heures à 28 °C ou 16 à 20 heures à 20 °C. Les cellules bactériennes ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans un tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 Mm. Les cellules ont été lysées par sonication et centrifugées. Afin de séparer les fractions solubles et insolubles, les surnageants ont été récupérés (fraction soluble) et les culots (fraction insoluble) ont été resuspendus dans de l'eau distillée. Un aliquot de 4 µL de chaque fraction incluant fraction totale (après sonication), fraction soluble et fraction insoluble a été prélevé. Les aliquots ont été resuspendus dans du tampon de Laemmli et chauffés pendant 10 minutes à 95 °C. La production des protéines recombinantes a ensuite été analysée par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide 15 %.

Production et purification des protéines His-Sumo-*Pc*DENND6

Les amorces et les plasmides utilisés pour l'amplification et le clonage des séquences codant les isoformes de *Pc*DENND6 sont indiqués dans le tableau 17. Les protéines recombinantes *Pc*DENND6 (isoforme longueur intermédiaire) ont été produites fusionnées à une étiquette poly-histidine-sumo en N-terminal chez la souche BL21 (DE3) pRARE2 d'*E. coli* et la version mutante (E234K) chez la souche Rosetta2 (DE3) pRARE2 -pLys. Afin d'améliorer la solubilité des protéines recombinantes *Pc*DENND6, les cultures bactériennes ont été supplémentées avec 0,5 % d'éthanol et incubées pendant 3 heures à 4 °C avant induction. L'expression des protéines recombinantes a ensuite été induite par l'ajout de 0,1 mM d'IPTG pendant 20 heures à 20 °C. Les cellules bactériennes ont été centrifugées pendant 25 minutes à 5000 rpm et les culots ont été resuspendus dans un tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 mM. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication et centrifugées à 20 000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C pour séparer les fractions solubles et insolubles. Les protéines recombinantes fusionnées à une étiquette poly-histidine-sumo ont ainsi été purifiées par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). La fraction soluble a été déposée sur une résine Ni-NTA agarose (Qiagen), préalablement équilibrée avec un tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 mM. Cette étape permet de fixer les protéines recombinantes étiquetées poly-histidine aux ions nickel présents dans la résine. Une étape de lavage a ensuite été réalisée avec le tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 mM et les protéines recombinantes ont été éluées dans le tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 250 mM. Pour s'affranchir des contaminants protéiques présents dans la fraction d'élution, les protéines recombinantes ont été concentrées et soumises à une chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex200 16/600 couplée à un système automatisé Aktä Purifier (GE Healthcare). Les protéines recombinantes ont été éluées dans un tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM. Les fractions contenant les protéines recombinantes ont ensuite été soumises à une réaction de clivage des étiquettes poly-histidine-sumo. Le clivage des étiquettes poly-histidine-sumo est réalisé par l'action des protéases HRV 3C qui reconnaissent le motif « LEVLFQGP » localisé entre l'étiquette et la protéine. Les protéines recombinantes ont ainsi été incubées avec les protéases HRV 3C et dialysées dans un tampon Tris 12,5 mM, NaCl 125 mM, 1,25 mM DTT pendant 16 heures à 4 °C afin d'optimiser les activités de clivage des protéases. Pour séparer les protéines recombinantes non étiquetées, les protéases HRV 3C et les étiquettes poly-histidine-sumo, une IMAC inverse a été réalisée. La solution de clivage a ainsi été déposée sur une résine Ni-NTA agarose (Qiagen), préalablement équilibrée avec un tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 mM. N'étant plus étiquetées, les protéines recombinantes *Pc*DENND6 ont été récupérées lors de l'étape de lavage (tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 Mm). A l'inverse, les protéases HRV 3C fusionnées à une étiquette poly-histidine et les étiquettes poly-histidine-sumo clivées ont été fixées aux ions nickel présents dans la résine et éluées lors de l'étape d'élution (tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 250 mM). Les protéines recombinantes ont été analysées après chaque étape de purification par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (10 et 15 %).

Production et purification des protéines His-*Pc*RAB4 et His-*Pc*RABba

Les amorces et les plasmides utilisés pour l'amplification et le clonage des séquences codant *Pc*RAB4 et *Pc*RABba sont indiqués dans le tableau 18. Les protéines recombinantes *Pc*RAB4 et *Pc*RABba ont été produites fusionnées à une étiquette poly-histidine en N-terminal chez la souche BL21 (DE3) psBET d'*E. coli*. A la phase exponentielle de croissance (densité optique d'environ 0,6), l'expression des protéines recombinantes a été induite par l'ajout de 0,1 mM d'IPTG pendant 4 heures à 37 °C. Les cellules bactériennes ont ensuite été centrifugées pendant 25 minutes à 5000 rpm et les culots ont été resuspendus dans un tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 mM. Les cellules bactériennes ont été lysées par sonication et centrifugées à 20 000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C pour séparer les fractions solubles et insolubles. Les protéines recombinantes fusionnées à une étiquette poly-histidine ont ainsi été purifiées par IMAC. La fraction soluble a été déposée sur une résine Ni-NTA agarose (Qiagen), préalablement équilibrée avec un tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 mM. Une étape de lavage a ensuite été réalisée avec le tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 20 mM et les protéines recombinantes ont été éluées dans le tampon Tris 30 mM NaCl 200 mM Imidazole 250 mM. La pureté des protéines recombinantes a été analysée par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide 15 %.

3.7 Caractérisation fonctionnelle des protéines recombinantes

Activité GTPase des protéines recombinantes His-*Pc*RAB4, His-*Pc*RABba, *Pc*DENND6 (WT et E234K)

Les activités GTPase intrinsèques des protéines recombinantes His-*Pc*RAB4, His-*Pc*RABba et *Pc*DENND6 (WT et E234K) ont été mesurées avec le kit GTPase-Glo™ Assay (Promega, Madison, WI) selon les instructions du fabricant. Pour initier les réactions GTPase, les protéines recombinantes ont été incubées dans un tampon GTPase/GAP supplémenté avec 10 µM de GTP et 1 mM de DTT pendant 1 heure à 25 °C. Les activités GTPases ont été mesurées par une série de dilution 2X à partir d'une concentration initale de GTPase à 2,5 µM. Un agent de réaction GTPase (GTPase-Glo™ Reagent 500X, ADP 5µM, tampon GTPase-Glo™) a été ajouté à chaque réaction et incubé pendant 30 minutes à 25 °C pour convertir le GTP restant en ATP. Un réactif permettant de convertir l'ATP restant en bioluminescence grâce à l'action de la luciférase et la présence de luciférine a ensuite été ajouté à chaque réaction et incubé pendant 10 minutes à 25 °C. La bioluminescence produite a été mesurée avec un lecteur de microplaques (BioTek Synergy HT).

Activité GEF des versions sauvage et mutante (E234K) des protéines recombinantes *Pc*DENND6

GTPase-Glo™ Assay (Promega, Madison, WI)

Les activités GEF des protéines recombinantes *Pc*DENND6 ont été mesurées avec le kit GTPase-Glo™ Assay (Promega, Madison, WI) selon les instructions du fabricant. Les protéines GEFs ont été diluées dans un tampon GEF supplémenté avec 10 µM de GTP dans un volume de 5 µL à 5 µM. Pour initier les réactions GTPases et GEFs, 5 µL de GTPases dilués dans un tampon GTPase-GAP ont été ajoutés à chaque réaction avec des concentration finales à 0 µM, 1,25 µM, 2,5 µM et 10 µM. Les réactions ont été incubées pendant 60 minutes à 25 °C. Un agent de réaction GTPase (GTPase-Glo™ Reagent 500 X, ADP 5 µM, tampon GTPase-Glo™) a été ajouté à chaque réaction et incubé pendant 30 minutes à 25 °C pour convertir le GTP restant en ATP. Un réactif permettant de convertir l'ATP restant en bioluminescence grâce à l'action de la luciférase et la présence de luciférine a ensuite été ajouté à chaque réaction et incubé pendant 10 minutes à 25 °C. La bioluminescence produite a été mesurée avec un lecteur de microplaques (BioTek Synergy HT).

RhoGEF Exchange Assay Biochem (Cytoskeleton, Cat. # BK100)

Les activités GEFs des protéines recombinantes *Pc*DENND6 ont été mesurées avec le kit RhoGEF Exchange Assay Biochem (Cytoskeleton, Cat. # BK100) selon les instructions du fabricant. L'intensité de fluorescence émise par le fluorophore (N-MAR-GTP) a été suivie avec un fluorimètre (EnSight® multimode plate reader) avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission fixées à 485 nm et 535 nm respectivement. Les GTPases recombinantes ont été diluées dans un tampon de réaction d'échange dans un volume de 10 µL à une concentration finale de 3 µM. Les intensités de fluorescence émises ont été immédiatement suivies pendant 150 secondes (5 lectures). Un volume de 5 µL de protéine GEF a ensuite été ajouté à la réaction avec une concentration finale de 0,5 µM. Pour les réactions contrôles, les protéines GEFs ont été remplacées par de l'eau ultra-pure. Les lectures ont été prises toutes les 30 secondes pendant 30 minutes. Un contrôle positif a également été inclue avec des mesures d'activité GEFs de la protéine hDbs-His pour la GTPase Cdc42-His (protéines recombinantes fournies dans le kit).

3.8 Test d'interaction par double hybride chez *S. cerevisiae*

Méthode de co-transformation des levures

Les séquences codant pour les isoformes des protéines *Pc*DENND6 et les RAB GTPases d'intérêt ont été amplifiées par PCR et clonées dans les vecteurs pGADT7 et pGBKT7 en phase de lecture avec le domaine d'activation (nommé AD) et de liaison (nommé BD) de GAL4. Les amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences nucléotidiques d'intérêt sont indiquées dans les tableaux 19 et 20. Pour réaliser des tests d'interaction en double hybride, la souche de levure CY306 (MATa, ura3-52, his3-

200, ade2-101, lys2- 801, leu2-3, leu2-112, trp11-901, gal4-542, gal80-538, lys2::UASGAl1-TATAGAL1-HIS3, URA3::UASGal4 17MERS(x3)- TATACYC1-LacZ, trx1::KanMX4, trx2::KanMX4) (Vignols *et al.*, 2005) a été co-transformée avec les vecteurs recombinants pGADT7 et pGBKT7. La souche CY306 a été inoculée dans un milieu YNB -L -T (0.7 % d'extraits de levures -L -T, 2 % de glucose) supplémenté avec les acides aminés histidine, uracile, lysine, adénine, méthionine, leucine et tryptophane, et incubée pendant une nuit à 30 °C sous agitation à 190 rpm. A une DO comprise entre 0,8 et 1, les cellules de levure ont été centrifugées à 2 000 rpm pendant 5 minutes à 22 °C. Elles ont ensuite été lavées avec de l'eau ultra-pure stérile puis resuspendues dans une solution de LiAC (100 mM pH 7,5). Les levures ont à nouveau été centrifugées et le culot a été resuspendu dans 1,5 mL de LiAC (100 mM pH 7,5). Pour permettre l'intégration des plasmides recombinants dans les cellules de levures, 50 µL de levures ont été incubées avec 300 ng de chaque plasmide recombinant et 300 µL d'une solution fraîchement préparée (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, LiAc 100 mM pH 7,5 dans une solution de PEG 50 %) pendant 30 minutes à 28 °C sous agitation à 190 rpm. Les cellules ont alors été sujettes à un choc thermique pendant 20 minutes à 42 °C. Les levures transformées ont ensuite été resuspendues dans un milieu minimum YNB w/o (0.7 % d'extraits de levures w/o, 2 % de glucose) et centrifugées pendant 1 minute à 13 000 rpm. L'ensemble de la suspension de levure a été étalée sur un milieu minimum YNB w/o (0.7 % d'extraits de levures w/o, 2 % de glucose, et 2 % d'agar) sélectif supplémenté avec les acides aminés histidine, uracile, lysine, adénine et méthionine. Les cellules ayant intégrées les plasmides recombinants pGADT7 (gène codant pour la synthèse de leucine) et pGBKT7 (gène codant pour la synthèse de tryptophane) ont été sélectionnées par l'absence de leucine et tryptophane dans le milieu. Les levures transformées ont été incubées pendant 5 jours à 30 °C.

Test d'interaction par double hybride

Les levures co-transformées avec les plasmides recombinants pGADT7 et pGBKT7 ont été inoculées dans un milieu minimum YNB w/o supplémenté avec les acides aminés histidine, uracile, lysine, adénine et méthionine, et incubées pendant une nuit à 30 °C sous agitation à 190 rpm. Une étape de lavage des cellules a été réalisée avec de l'eau ultra-pure stérile et les cellules ont été resuspendues dans un milieu YNB w/o. Pour chaque souche de levure, la DO a été ajustée à 0,05. Afin de détecter des interactions putatives entre les protéines candidates, 7 µL de cellules (DO de 0,05) ont été déposées sur un milieu minimum YNB w/o supplémenté ou non en histidine. Pour évaluer la force de l'interaction entre les protéines candidates, les cellules ont été déposées également sur un milieu minimum YNB w/o supplémenté avec 2 et 5 mM de 3-aminotriazole (inhibiteur de la biosynthèse d'histidine). Des contrôles négatifs ont été réalisés avec les vecteurs natifs pGADT7/ pGBKT7 et les protéines candidates pour confirmer l'absence d'auto-activation. Les levures ont été incubées pendant 5 jours à 30 °C pour déterminer les interactions potentielles entre les protéines candidates.

Tableau 17. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour les isoformes de *Pc*DENND6 dans les vecteurs d'expression pET-15b, pCARGHO1 et pBG102. Les nucléotides indiqués en bleu correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction utilisées pour les clonages. Les nucléotides indiqués en vert correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction type IIS. Les nucléotides indiqués en orange ont été ajoutés pour conserver le cadre de lecture des séquences. Les nucléotides indiqués en rouge correspondent aux mutations souhaitées pour générer des variants.

Vecteur de clonage	ID des gènes (noms des protéines)	Séquences des amorces forward (5' – 3')	Enzyme de restriction	Séquences des amorces réverse (5' – 3')	Enzyme de restriction
pET-15b	AGR57_7124 (*Pc*DENND6) « pleine longueur »	CCCCATATGGCCGAGGAAGAAGACAT	NdeI	CCCGGTCTCGGATCCCTACGGGCCCATCGAGCTCC	BsaI/ BamHI
pCARGHO1		CCCGAATTCTATGGCCGAGGAAGAAGACAT	EcoRI	CCCAAGCTTCTACGGGCCCATCGAGCTCC	HindIII
pBG102		CCCGAATTCTATGGCCGAGGAAGAAGACAT	EcoRI	CCCAAGCTTCTACGGGCCCATCGAGCTCC	HindIII
pBG102	AGR57_7124 (*Pc*DENND6) « longueur intermédiaire »	CCCGAATTCTATGCACCCCTCCAAGGTGCCG	EcoRI	CCCAAGCTTCTACGGGCCCATCGAGCTCC	HindIII
pBG102	AGR57_7124 (*Pc*DENND6) « petite longueur »	CCCGAATTCTATGCTGGAAGTCGCTTGTCACAA	EcoRI	CCCAAGCTTCTACGGGCCCATCGAGCTCC	HindIII
pBG102	AGR57_7124 (E234K *Pc*DENND6) (GAA -> AAA) « longueur intermédiaire »	TGTCTCTTGCTCTGCAAACCAATACTGGTATAC	-	GTATACCAGTATTGGTTTGCAGAGCAAGAGACA	-

Tableau 18. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour *Pc*RAB4 et *Pc*RABba dans les vecteurs d'expression pET-15b. Les nucléotides indiqués en bleu correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction utilisées pour les clonages. Les nucléotides indiqués en vert correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction type IIS.

Vecteur de clonage	ID des gènes (noms des protéines)	Séquences des amorces forward (5' – 3')	Enzyme de restriction	Séquences des amorces réverse (5' – 3')	Enzyme de restriction
pET-15b	AGR57_102 (*Pc*RABba)	CCCCATATGTCTGGAGTAGCATGGCA	NdeI	CCCCGGATCCTCAACAACACCGTGACGTT	BamHI
	AGR57_10842 (*Pc*RAB4)	CCCCATATGGCCAATGACTATGAC	NdeI	CCCGGTCTCGGATCCTCAACAGCACTTGCTCCCAC	BsaI/ BamHI

Tableau 19. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour les isoformes de *Pc*DENND6 dans les vecteurs d'expression pGADT7 et pGBKT7. Les nucléotides indiqués en bleu correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction utilisées pour les clonages. Les nucléotides indiqués en orange ont été ajoutés pour conserver le cadre de lecture des séquences.

Vecteur de clonage	ID des gènes (noms des protéines)	Séquences des amorces forward (5' – 3')	Enzyme de restriction	Séquences des amorces réverse (5' – 3')	Enzyme de restriction
pGADT7/ pGBKT7	AGR57_7124 (*Pc*DENND6) « pleine longueur »	CCCCCATGGCTGCCGAGGAAGAAGACAT	NcoI	CCGAATTCCTACGGGCCCATCGAGCTCC	EcoRI
	AGR57_7124 (*Pc*DENND6) « longueur intermédiaire »	CCCCCATGGCTCACCCCTCCAAGGTGCCG	NcoI	CCGAATTCCTACGGGCCCATCGAGCTCC	EcoRI
	AGR57_7124 (*Pc*DENND6) « petite longueur »	CCCCCATGGCTCTGGAAGTCGCTTGTCACAA	NcoI	CCGAATTCCTACGGGCCCATCGAGCTCC	EcoRI

Tableau 20. Amorces utilisées pour amplifier et cloner les séquences codants pour *Pc*RAB4, *Pc*RABba et *Pc*RAB11 dans les vecteurs pGAD et pGBK. Les amorces designées pour mimer les variants de *Pc*RAB4 (S33N et Q78L), *Pc*RABba (S23N, T70L et T70Q) et *Pc*RAB11 (S24N et Q69L) sont également indiquées. Les nucléotides indiqués en bleu correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction utilisées pour les clonages. Les nucléotides indiqués en vert correspondent aux sites de reconnaissance des enzymes de restriction type IIS. Les nucléotides indiqués en rouge correspondent aux mutations souhaitées pour générer des variants.

Vecteur de clonage	ID des gènes (noms des protéines)	Séquences des amorces forward (5' – 3')	Enzyme de restriction	Séquences des amorces réverse (5' – 3')	Enzyme de restriction
pGAD/ pGBK	AGR57_10842 (*Pc*RAB4)	CCCCATATGGCCAATGACTATGAC	NdeI	CCCGGTCTCGGATCCTCAACAGCACTTGCTCCCAC	BsaI/ BamHI
	AGR57_10842 (*Pc*RAB4 S33N) (tcc -> aac)	GCGAAGCGGGAACAGGGAAAAACTGCTTGTTGCATCAATT	-	AATTGATGCAACAAGCAGTTTTTCCCTGTTCCCGCTTCGC	-
	AGR57_10842 (*Pc*RAB4 Q78L) (caa -> tta)	CTGTGGGACACGGCAGGTTTAGAACGCTTCAGGTC	-	GACCTGAAGCGTTCTAAACCTGCCGTGTCCCACAG	-
	AGR57_102 (*Pc*RABba)	CCCCATATGTCTGGAGTAGCATGGCA	NdeI	CCCCGGATCCTCAACAACACCGTGACGTT	BamHI
	AGR57_102 (*Pc*RABba S23N) (tct -> aat)	CGCTGCAGTTGGCAAGAATTCTCTGCTTGTCCGC	-	GCGGACAAGCAGAGAATTCTTGCCAACTGCAGCG	-
	AGR57_102 (*Pc*RABba T70L) (acg -> ctg)	TGGGACACTGCAGGGCTGGAGTCCTTCCGTTC	-	GAACGGAAGGACTCCAGCCCTGCAGTGTCCCA	-
	AGR57_102	TGGGACACTGCAGGGCAGGAGTCCTTCCGTTC	-	GAACGGAAGGACTCCTGCCCTGCAGTGTCCCA	-

	(*Pc*RABba T70Q) (acg -> cag)				
	AGR57_1359 (*Pc*RAB11)	CCCCATATGATGGCAGACCAGAGCAAC	NdeI	CCCCGGATCCCTAGCAACACTTGCTGC	BamHI
	AGR57_1359 (*Pc*RAB11 S24N) (tct -> aat)	GAGACTCCGGTGTCGGTAAAAATAACCTTCTCTCGCGATT	-	AATCGCGAGAGAAGGTTATTTTTACCGACACCGGAGTCTC	-
	AGR57_1359 (*Pc*RAB11 Q69L) (cag -> ttg)	GGGACACAGCCGGTTTGGAGCGCTACCG	-	CGGTAGCGCTCCAAACCGGCTGTGTCCC	-

DISCUSSION GÉNÉRALE

Durant leur croissance, les champignons dégradeurs de bois sont confrontés naturellement à un environnement hostile dû à la libération de molécules antifongiques présentes dans le bois. Ces molécules incluent à la fois des composés issus de la dégradation de la lignine et des molécules appelées extractibles contenant une grande diversité chimique. Pour se développer sur le bois et résister à l'activité antifongique de ces molécules, ces champignons présentent des familles multigéniques enrichies qui sont impliquées dans leur détoxication (ex : CytP450, GST) (Morel *et al.*, 2013). Cependant, les données dans la littérature restent principalement limitées à l'activité de ces enzymes. Dans le but d'élargir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la résistance des champignons à des molécules antifongiques, une stratégie de génétique directe a été développée au laboratoire chez le champignon modèle de dégradation du bois *P. chrysosporium* (Nguyen, 2020). Cette stratégie a permis de générer des collections de mutants résistants à diverses molécules antifongiques par mutagénèse par UV suivie par un crible des souches mutantes exposant un phénotype de résistance aux molécules d'intérêt. Durant mon projet de thèse, j'ai travaillé sur deux d'entre elles, une résistante aux extractibles d'un bois tropical appelé *B. guianensis* et l'autre résistante à une toxine dont le mécanisme d'action est connu, la rapamycine. Avant mon arrivée au laboratoire, les mutations causales responsables du phénotype de résistance des mutants ont été identifiées (Nguyen, 2020). Mon travail a été de valider la causalité des mutations identifiées dans le phénotype de résistance des mutants par des approches de complémentation fonctionnelle et/ou de gain de fonction et de caractériser l'activité des protéines codées par les gènes portant la mutation causale ainsi que leur capacité à interagir avec la molécule antifongique.

1. La mutagénèse : approche prometteuse pour étudier les mécanismes de résistance aux molécules antifongiques chez les champignons filamenteux

Une synthèse des techniques utilisées pour identifier le mécanisme d'action des molécules antifongiques est présentée dans la partie introductive de ce manuscrit et a été publiée sous la forme d'une revue (Noel *et al.*, 2023). Les molécules présentant des propriétés antifongiques peuvent être classées en 3 catégories selon leur mode d'action : toxine/toxicant, stressor et toxine-stressor. Pour chacune de ces molécules, un ensemble de réponses d'adaptation et de détoxication est observé chez les champignons. Les acteurs moléculaires et voies métaboliques impliqués dans ces réponses ont été déterminés notamment grâce à des analyses transcriptomiques, protéomiques et par le criblage de la collection de mutants de délétion de *S. cerevisiae* (collection contenant les délétions individuelles de 6 000 ORFs) (Dorsaz *et al.*, 2017; Piotrowski *et al.*, 2015; Prado *et al.*, 2015). A la différence des stressors et des toxine-stressors, les toxines/toxicants ciblent de manière spécifique une protéine (Mair *et al.*, 2016; Noel *et al.*, 2023). L'identification des cibles moléculaires des toxines/toxicants a été facilité grâce au développement de la méthode d'haploinsuffisance chez *S. cerevisiae* (Giaever *et al.*, 2004). Cette méthode est basée sur le criblage d'une banque de lignées diploïdes portant une mutation à l'état

hétérozygote pour chacun des gènes du génome de *S. cerevisiae*. La diminution du nombre de copies d'un gène chez cet organisme se traduit par une diminution de la quantité de protéine produite. Si cette protéine correspond à la cible de l'antifongique, le ratio protéine/toxine sera en faveur de la toxine et plus aucune protéine ne sera fonctionnelle, ce qui se traduira par une augmentation de la sensibilité de cette souche par rapport à une souche non délétée.

Cette méthode s'est avérée particulièrement puissante pour identifier les cibles moléculaires de molécules antifongiques, mais ces banques de mutants ne sont actuellement disponibles que pour les levures diploïdes *S. cerevisiae* et *Candida albicans* (Giaever *et al.*, 2004; Uhl *et al.*, 2003). Pour pallier ces limites, nous avons utilisé une stratégie de génétique directe, la mutagénèse par UV suivie de cribles phénotypiques basés sur la résistance à des composés antifongiques, dans l'objectif d'identifier les cibles d'une toxine et/ou des acteurs moléculaires impliqués dans la résistance à ces molécules chez le basidiomycète dégradeur de bois *P. chrysosporium*. Ce type de mutagénèse a été utilisé chez de nombreux organismes comme *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *S. cerevisiae* ou encore le poisson zèbre (Acevedo-Arozena *et al.*, 2008; Amsterdam et Hopkins, 2006; Brandriss, 1979; Østergaard et Yanofsky, 2004). Son principe repose sur la génération d'un ensemble de mutations dans le génome d'un organisme par l'action d'un agent mutagène qui peut être physique (ex : neutrons rapides, rayons gamma, rayons ultraviolets) ou chimique (ex : agents alkylants, azoture de sodium) (Bhoi *et al.*, 2022). Les mutants générés sont ensuite criblés sur la base d'un phénotype d'intérêt. Cette méthode a pour avantage d'identifier des acteurs moléculaires sans apriori et peut être utilisée chez des organismes pour lesquels les outils génétiques sont restreints. Cependant, il est nécessaire de valider la causalité de la mutation dans le phénotype d'intérêt en s'abstrayant des autres mutations générées dans le génome des mutants isolés. Cela nécessite de réaliser plusieurs tours de croisements entre la souche mutante et la souche sauvage de référence ou de transformer l'organisme d'étude ou un organisme hôte avec l'allèle d'intérêt portant la mutation causale. Dans les deux cas, l'isolation de la mutation conduit au phénotype d'intérêt si cette mutation est causale.

Au laboratoire, cette stratégie a d'abord été expérimentée avec deux molécules d'intérêt pharmaceutique, l'itraconazole et la rapamycine, pour lesquelles les mécanismes d'action et les cibles moléculaires sont connus (Nguyen, 2020). L'utilisation de séquençage en bulk et le séquençage des gènes codant les protéines ciblées par ces molécules a permis de valider la robustesse de cette stratégie chez *P. chrysosporium*. L'analyse des mutations causales chez les mutants générés a mis en évidence 76 % des mutants résistants aux extractibles de bois de *B. guianensis* avec au moins une mutation au sein du gène codant la protéine DENND6 et 80 % des mutants résistants à la rapamycine avec une mutation au sein d'un des gènes codant une de ses 3 cibles protéiques (FKBP12, TOR1 et TOR2). Ces résultats supportent ainsi l'avenir prometteur de cette approche pour identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la résistance des champignons à des molécules antifongiques.

Il est intéressant de noter qu'environ 20 % des mutants présentent un phénotype de résistance aux molécules testées mais ne présentent aucune mutation dans le gène d'intérêt, suggérant que la ou les mutation(s) causale(s) sont localisées à un autre locus et que d'autres mécanismes sont impliqués dans la résistance de *P. chrysosporium* à ces molécules antifongiques. A la différence des méthodes actuellement disponibles, cette stratégie offre la possibilité d'identifier plusieurs mécanismes de résistance qui sont acquis par la présence d'une ou plusieurs mutation(s) causale(s). Cela inclut par exemple la présence d'une mutation au sein d'un gène codant la protéine cible d'une molécule ou au sein d'un promoteur ou d'un facteur de transcription conduisant à une modulation de l'expression d'un ou plusieurs gènes impliqués dans l'adaptation ou la détoxication de ces molécules (Davidse, 1986; Sánchez-Torres et Tuset, 2011; Sang *et al.*, 2018).

L'identification des cibles des antifongiques est une étape indispensable à l'utilisation de ces molécules et l'identification des sites d'action pourrait permettre de prédire les éventuels phénomènes d'acquisition de résistance des champignons à ces molécules. L'acquisition de résistance des champignons aux molécules antifongiques pose à l'heure actuelle de sérieux problèmes dans les secteurs agricoles et médicaux. L'utilisation massive de fongicides à site spécifique (azoles) a conduit à une forte pression de sélection chez les champignons pathogènes et ainsi à la génération de mutations leur permettant de résister et de survivre aux fongicides appliqués (Burks *et al.*, 2021). Ces mécanismes de résistance s'expliquent par la présence de mutation(s) au sein des gènes codant les protéines cibles des fongicides, une surexpression des gènes codant ces protéines cibles et une surexpression des transporteurs d'efflux de molécules (ex : transporteurs ABC) (Mair *et al.*, 2016; Sánchez-Torres et Tuset, 2011; Sang *et al.*, 2018). L'utilisation de la mutagénèse constitue ainsi une bonne approche pour identifier ces mécanismes.

Cette stratégie de mutagénèse aléatoire génère également une série allélique pour un gène d'intérêt. L'étude des protéines codées par ces derniers nous offre ainsi la possibilité d'analyser les effets des mutations sur l'activité des protéines et d'identifier si un défaut de fitness est associé à ces mutations (Lalève *et al.*, 2014). Cette méthode permet ainsi d'identifier des mutations potentiellement viables qui pourraient être sélectionnées par les organismes dans l'environnement.

2. Importance et limite du champignon modèle *P. chrysosporium*

P. chrysosporium est un champignon dégradeur de bois dont le répertoire génétique est spécifique à son mode trophique et a évolué pour permettre à ce champignon de résister à l'hostilité de son habitat et en particulier à la présence des extractibles du bois (Morel *et al.*, 2013; Morel-Rouhier, 2021). Ceci est démontré notamment par l'extension de famille multigénique chez les champignons dégradeurs de bois en comparaison aux champignons présentant un autre type trophique, dont les membres sont impliqués dans les processus de détoxication de ces molécules (CytP450 et GST). En ce sens, l'utilisation d'un

organisme modèle présentant un mode trophique éloigné des champignons dégradeurs de bois tel que *S. cerevisiae* pourrait conduire à une perte d'information sur les machineries moléculaires impliquées dans la détoxication de ces molécules.

A l'heure actuelle, la majorité des études faites *in vivo* a été réalisée chez des Ascomycètes dû à un manque d'outils génétiques développés chez les Basidiomycètes. Avant les années 2000, la transformation génétique de *P. chrysosporium* a été réalisée par génération de protoplastes grâce à l'utilisation d'un cocktail enzymatique nommé « novozyme 234 » (Gold *et al.*, 1983). Cependant, l'arrêt de sa commercialisation a conduit à l'abandon de cette approche par la communauté scientifique dû au manque d'alternative efficace à ce cocktail enzymatique. Pour valider la causalité des mutations dans le phénotype de résistance des mutants générés, des expériences de complémentation fonctionnelle ou de gain de fonction ont donc été réalisées chez *S. cerevisiae*.

Dans le cas de la rapamycine, trois cibles protéiques sont connues chez *S. cerevisiae* et leurs orthologues ont été identifiés chez *P. chrysosporium* par homologie de séquence (Heitman *et al.*, 1991; Nguyen *et al.*, 2020). La complémentation fonctionnelle d'un mutant de *S. cerevisiae* par un allèle identifié chez une lignée mutante de *P. chrysosporium* a ainsi permis de valider l'utilisation d'un organisme modèle pour confirmer la causalité des mutations identifiées chez *P. chrysosporium* (chapitre II – Noel *et al.*, unpublished). Dans le cas des extractibles de bois de *B. guianensis*, la mutation causale a été identifiée dans un gène codant pour une protéine DENND6 chez *P. chrysosporium*. Précédemment, la sensibilité de *S. cerevisiae* aux extractibles acétoniques de bois de *B. guianensis* a été mise en évidence (Perrot *et al.*, 2018). Cependant, les analyses phylogénétiques des protéines DENND ont suggéré l'absence d'orthologue phylogénétiquement proche de cette protéine chez les Ascomycètes incluant l'espèce *S. cerevisiae* (chapitre I – Noel *et al.*, unpublished). Des expériences de gain de fonction ont été réalisées chez *S. cerevisiae* par l'expression d'un des allèles mutant du gène codant pour la protéine DENND6 de *P. chrysosporium* (résultats non présentés). Cependant, aucun phénotype de résistance aux extractibles n'a été observé avec la production de ce variant chez la levure. Ceci peut être dû au mécanisme d'action des protéines DENND qui régulent des étapes du trafic membranaire par leur activité avec des protéines RAB GTPases (Marat *et al.*, 2011). Ainsi, il est possible que la machinerie moléculaire associée à la protéine *Pc*DENND6 soit absente ou trop divergente chez *S. cerevisiae*, et donc la production d'un variant de *Pc*DENND6 seule ne permet pas la résistance aux extractibles. Ces deux exemples démontrent ainsi l'importance et les limites qui peuvent être associées à l'utilisation d'un organisme modèle, pour lequel le mode trophique est éloigné de l'organisme d'étude.

Durant ce projet de thèse, une méthode pour transformer le champignon *P. chrysosporium* a été mise au point grâce à l'utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*. L'expression d'un des allèles mutants codant pour une protéine variante de *Pc*DENND6 a ainsi permis de confirmer la causalité d'une de ces

mutations dans le phénotype de résistance de *P. chrysosporium* aux extractibles de bois de *B. guianensis* (chapitre I – Noel *et al.*, unpublished). Cette méthode de transformation résulte cependant en une intégration aléatoire du gène d'intérêt qui peut être associée à une grande variabilité des transformants générés. Ceci est expliqué par des différences du niveau d'expression du gène intégré qui peut être dû à la fois au locus d'intégration et à la variation du nombre de copies intégrées (Vonk et Ohm, 2021). Un second point à prendre en compte est également la présence d'une copie sauvage dans l'organisme d'étude transformé, nécessitant ainsi un effet dominant de l'allèle muté vis-à-vis de l'allèle sauvage. Une des perspectives de ce projet sera donc d'intégrer de manière ciblée un gène d'intérêt dans le génome de *P. chrysosporium*, permettant l'obtention de mutants de délétion et l'analyse de mutations causales non-dominantes chez ce dernier. En résumé, si nous sommes arrivés à mettre en place une stratégie de génétique inverse et obtenir des transformants, il manque encore un certain nombre d'outils génétiques pour pouvoir travailler aussi efficacement chez *P. chrysosporium* que chez d'autres champignons.

3. Les extractibles : outils d'étude pour développer de nouveaux produits antifongiques

Un besoin de nouveaux produits antifongiques émerge face à la résistance des champignons aux fongicides utilisés et aux risques environnementaux qui leurs sont associés (Lucas *et al.*, 2015; Preston, 2000; Schultz *et al.*, 2007). Pour répondre à ces besoins, une des approches possibles constitue l'utilisation de molécules naturellement produites par les plantes. Les plantes contiennent une grande diversité chimique de molécules qui sont associées à de multiples propriétés (ex : anti-oxydante, antifongique, chélatrice de métaux) et qui peuvent agir comme des toxines, stressors ou des toxines-stressors. Dans le bois, ces molécules sont appelées extractibles et sont impliquées dans sa résistance et sa durabilité face aux attaques fongiques (Kirker *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2012). L'étude de ces extraits pourrait ainsi permettre d'identifier l'action synergique de molécules avec différentes propriétés et de développer de nouveaux produits antifongiques pour lesquels l'apparition de résistance serait limitée.

Le rôle des extractibles dans la durabilité du bois a été associé à trois types de propriétés : (1) fongicide, (2) anti-oxydante et (3) chélatrice de métaux (Schultz et Nicholas, 2002). Bien que les molécules présentant des propriétés anti-oxydante ou chélatrice de métaux peuvent ne pas posséder d'activité fongicide individuellement, l'utilisation de ces molécules en combinaison avec un toxicant/toxine pourrait accentuer l'activité fongicide de cette dernière.

Pour dégrader le bois, les champignons utilisent des systèmes de dégradation extracellulaires oxydatifs dont l'activité nécessite la présence de ROS et d'ions métalliques. Ceci est valable pour les champignons de pourriture brune qui utilisent la réaction de Fenton (Arantes *et al.*, 2012) et les champignons de pourriture blanche qui sécrètent des peroxydases (Hatakka, 1994; Riley *et al.*, 2014). Ces processus sont

impliqués dans la modification et/ou la dégradation de la lignine, permettant aux champignons d'accéder aux ressources carbonées du bois pour se développer. La présence de molécules anti-oxydantes et chélatrices de métaux pourrait ainsi avoir un effet synergique avec des molécules antifongiques par l'inhibition des systèmes de dégradation des champignons, résultant en leur incapacité à récupérer des ressources carbonées pour se développer.
La capacité des champignons à se développer sur le bois est également dépendante de ses propriétés hydrophobes. En ce sens, l'utilisation de composés hydrophobes (ex : terpénoïdes, acides gras) dans les produits antifongiques pourrait permettre de diminuer l'adhésion des champignons à leur substrat et d'en augmenter ainsi les propriétés de préservation (Freeman *et al.*, 2005; Morel-Rouhier, 2021).

L'application combinée de molécules anti-oxydantes et chélatrices de métaux sur du bois de tremble et de peuplier jaune a permis de mettre en évidence leurs rôles synergiques avec un toxicant dans la protection de ces essences face à des attaques de champignon de pourriture brune (*Gloephyllum trabeum*) et blanche (*Trametes versicolor*) (Schultz et Nicholas, 2002). Il est intéressant de noter que parmi les composés testés, certains ne possèdent pas ou de très faibles activités fongicides dans un milieu gélosé. C'est le cas par exemple du 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol (BHT), de l'acide tannique et du propyl gallate qui sont des anti-oxydants et du chélateur de métaux acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Les auteurs suggèrent ainsi que la durabilité naturelle des bois est due à la présence de molécules fongicides, anti-oxydantes et chélatrices de métaux, permettant une protection synergique du bois face aux attaques fongiques. D'autres études ont permis de mettre en évidence le rôle d'anti-oxydants, de chélateurs de métaux et de composés hydrophobes dans la protection du bois en l'absence d'un toxicant ou d'une toxine (Freeman *et al.*, 2005; Mabicka *et al.*, 2005). C'est le cas par exemple d'un extrait combinant une molécule avec une faible activité antimicrobienne (2-hydroxypyridine-N-oxide), un chélateur de métaux (EDTA) et un anti-oxydant phénolique (Irganox 1076) (Mabicka *et al.*, 2005) ou d'un extrait contenant uniquement des molécules hydrophobes (Freeman *et al.*, 2005).

Durant ce projet, nous nous sommes intéressés aux propriétés antifongiques des extractibles acétoniques de bois de *B. guianensis*. Ces extraits sont composés à la fois de molécules avec des propriétés antifongiques (moracine N et 6-O-méthyl moracine N), anti-oxydantes (oxyresvératrol) et hydrophobes (ex : β-sitostérol), suggérant une potentielle action synergique de ces molécules pour préserver le bois de *B. guianensis* (Royer *et al.*, 2012). Les concentrations minimales inhibitrices (MIC) des molécules de l'extrait ont été évaluées individuellement et ont mis en évidence les molécules de moracine N et 6-O-méthyl moracine N avec les activités antifongiques les plus fortes. Les MICs de ces molécules additionnées avec d'autres molécules de l'extrait (ex : oxyresvératrol) ont été mesurées mais n'ont pas indiqué la présence d'effets synergiques dans les conditions testées. Cependant, ces molécules présentent des propriétés inhibant les activités de dégradation du bois des champignons ou encore ses capacités d'adhésion à son substrat. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la synergie de ces molécules

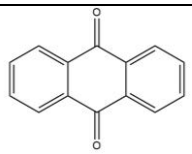
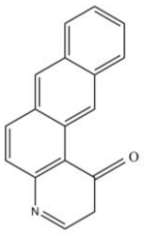
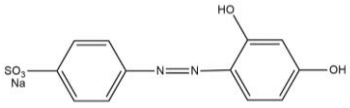
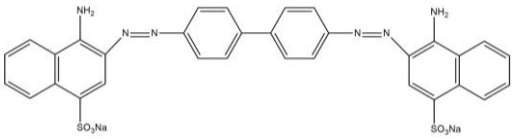
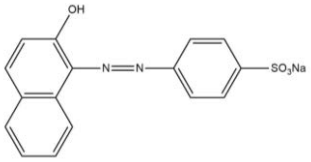
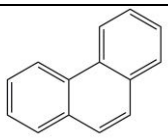
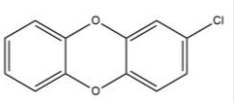
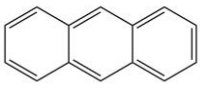
avec celles présentant des propriétés antifongiques directement sur du bois plutôt que dans un milieu gélosé ou liquide.

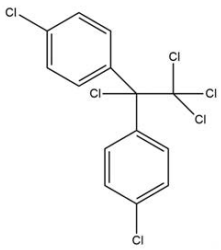
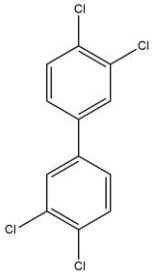
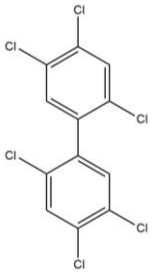
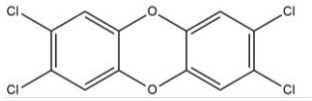
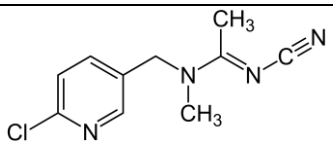
Lors de ce projet, nous avons montré que la résistance des champignons aux extractibles de bois de *B. guianensis* leur confèrent un avantage pour dégrader ce bois mais également le bois de hêtre et de peuplier (chapitre I – Noel *et al.*, unpublished). Ceci est particulièrement intéressant car cela suggère que la mutation générée dans la protéine DENND6 altère un processus permettant la résistance aux propriétés antifongiques globales de ces essences. En ce sens, il serait intéressant de déterminer si ces mutants possèdent un avantage pour minéraliser des essences de bois traitées avec des molécules présentant des propriétés anti-oxydantes et chélatrices de métaux en comparaison à la souche sauvage. Ces résultats pourraient ainsi nous permettre de déterminer si la mutation causale identifiée permet un mécanisme de résistance générale à divers composés phénoliques ou si elle est impliquée dans la résistance à l'activité antifongique individuelle de molécules présentes dans les extractibles de ces essences.

4. Génération de mutants de *P. chrysosporium* et applications en bioremédiation

L'industrialisation des secteurs pharmaceutiques, agricoles, forestiers et du textile a conduit à la génération et l'accumulation de molécules toxiques dans l'environnement. Cela inclut par exemple des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des composés phénoliques, des médicaments, des pesticides et des colorants. La persistance de ces molécules et leur présence dans la chaîne alimentaire présente ainsi des risques pour l'environnement et la santé humaine. Ces molécules présentent une structure chimique complexe qui est similaire à celles des extractibles présents dans le bois. Une des approches possibles dans la bioremédiation de ces molécules est l'utilisation des basidiomycètes dégradeurs de bois qui possèdent la capacité à dégrader naturellement des composés aromatiques complexes présents dans leur environnement (Brazkova *et al.*, 2022). Parmi ces basidiomycètes, le champignon *P. chrysosporium* a été évalué pour ses capacités à dégrader des colorants (azoïques et polymériques), des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des organohalides ou encore des insecticides (Tableau 21). La dégradation de ces molécules a été analysée après une période d'incubation avec ce champignon ou avec ses enzymes de dégradation (peroxydases). En effet, les systèmes extracellulaires oxydatifs de ces champignons intéressent grandement les secteurs industriels dû à leur capacité à dégrader de manière non sélective des composés aromatiques phénoliques et non phénoliques.

Tableau 21. Exemple de composés polluants qui sont dégradés par des souches de l'espèce *P. chrysosporium*.

Classe des composés	Nom chimique	Structure	Référence
Colorant polymérique	anthraquinone chromophore		(Glenn et Gold, 1983)
	anthrapyridone chromophore		
	nitroaniline chromophore		
Colorant azoïque	Tropaelin O		(Cripps *et al.*, 1990)
	Congo red		
	Orange II		
Hydrocarbure aromatique polycyclique	phénanthrène		(Bumpus, 1989)
	2-chlorodibenzo[p]dioxin		(Hammel *et al.*, 1991)
	anthracène		

Organohalide	1,1,-bis(4-chlorophényl)-2,2,2-trichloroéthane		(Bumpus *et al.*, 1985)
	3,4,3',4'-tetrachlorobiphényl		
	2,4,5,2',-4',5'-hexachlorobiphényl		
	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin		
Insecticide	acétamipride		(Wang *et al.*, 2019)

Les mutants générés dans ce projet ont la particularité d'être résistants aux extractibles de bois d'une espèce durable. Il est intéressant de préciser que ces mutants semblent également être résistants aux extractibles d'autres essences, au vu des résultats obtenus lors des essais de minéralisation de peuplier et de hêtre. Il est donc possible que la résistance à ces molécules confère également aux mutants une résistance à des polluants dont la bioremédiation est essentielle. Ces mutants pourraient ainsi constituer de nouveaux outils biologiques en industrie pour bioremédier les molécules polluantes qui sont générées par leurs activités. Il est également envisageable de créer des mutants pour des applications de bioremédiation spécifique suivant la stratégie que nous avons établie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acevedo-Arozena, A., Wells, S., Potter, P., Kelly, M., Cox, R. D., and Brown, S. D. M. (2008). ENU mutagenesis, a way forward to understand gene function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *9*, 49-69. https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164224

Adamo, M., Comtet-Marre, S., Büttner, E., Kellner, H., Luis, P., Vallon, L., Prego, R., Hofrichter, M., Girlanda, M., Peyret, P., and Marmeisse, R. (2022). Fungal dye-decolorizing peroxidase diversity : Roles in either intra- or extracellular processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(8), 2993-3007. https://doi.org/10.1007/s00253-022-11923-0

Adav, S. S., Ravindran, A., and Sze, S. K. (2012). Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by Phanerochaete chrysosporium on different lignocellulosic biomass. *Journal of Proteomics*, *75*(5), 1493-1504. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.020

Agger, J. W., Isaksen, T., Várnai, A., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G. T., Ludwig, R., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., and Westereng, B. (2014). Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(17), 6287-6292. https://doi.org/10.1073/pnas.1323629111

Akel, E., Metz, B., Seiboth, B., and Kubicek, C. P. (2009). Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei). *Eukaryotic Cell*, *8*(12), 1837-1844. https://doi.org/10.1128/EC.00162-09

Akhtar, M., Blanchette, R. A., and Kent Kirk, T. (1997). Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. In K.-E. L. Eriksson, W. Babel, H. W. Blanch, Ch. L. Cooney, S.-O. Enfors, K.-E. L. Eriksson, A. Fiechter, A. M. Klibanov, B. Mattiasson, S. B. Primrose, H. J. Rehm, P. L. Rogers, H. Sahm, K. Schügerl, G. T. Tsao, K. Venkat, J. Villadsen, U. von Stockar, and C. Wandrey (Éds.), *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (p. 159-195). Springer. https://doi.org/10.1007/BFb0102074

Alcalde, M. (2007). Laccases : Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. In J. Polaina and A. P. MacCabe (Éds.), *Industrial Enzymes : Structure, Function and Applications* (p. 461-476). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_26

Amore, A., Giacobbe, S., and Faraco, V. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, *14*(4), 230-249. https://doi.org/10.2174/1389202911314040002

Amsterdam, A., and Hopkins, N. (2006). Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends in Genetics: TIG*, *22*(9), 473-478. https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.011

Amthor, J. S. (2003). Efficiency of lignin biosynthesis : A quantitative analysis. *Annals of Botany*, *91*(6), 673-695. https://doi.org/10.1093/aob/mcg073

Ander, P., and Eriksson, K.-E. (1977). Selective Degradation of Wood Components by White-Rot Fungi. *Physiologia Plantarum*, *41*(4), 239-248. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1977.tb04877.x

Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., and 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

Andrade, A. C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J. G. M., and Waard, M. A. D. (2000). The ABC transporter AtrB from Aspergillus nidulans mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology (Reading, England)*, *146 (Pt 8)*, 1987-1997. https://doi.org/10.1099/00221287-146-8-1987

Arantes, V., Jellison, J., and Goodell, B. (2012). Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(2), 323-338. https://doi.org/10.1007/s00253-012-3954-y

Aro, N., Pakula, T., and Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(4), 719-739. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006

Arst, H. N., Tollervey, D., Dowzer, C. E., and Kelly, J. M. (1990). An inversion truncating the creA gene of Aspergillus nidulans results in carbon catabolite derepression. *Molecular Microbiology*, *4*(5), 851-854. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00656.x

Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M., and Legge, R. L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, *19*(6), 771-783. https://doi.org/10.1007/s10532-008-9185-3

Bailey, C., and Arst, H. N. (1975). Carbon catabolite repression in Aspergillos nidulans. *European Journal of Biochemistry*, *51*(2), 573-577. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb03958.x

Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K. A., Moen, M. A., and Hammel, K. E. (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Letters*, *354*(3), 297-300. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01146-x

Bao, W., Usha, S. N., and Renganathan, V. (1993). Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *300*(2), 705-713. https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1098

Barbier, M., Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Dumarçay, S., Gérardin, P., Morel-Rouhier, M., Sormani, R., and Gelhaye, E. (2020). Glutathione Transferases : Surrogate Targets for Discovering Biologically Active Compounds. *Journal of Natural Products*, *83*(10), 2960-2966. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00480

Barr, F., and Lambright, D. G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(4), 461-470. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.04.007

Basenko, E. Y., Pulman, J. A., Shanmugasundram, A., Harb, O. S., Crouch, K., Starns, D., Warrenfeltz, S., Aurrecoechea, C., Stoeckert, C. J., Kissinger, J. C., Roos, D. S., and Hertz-Fowler, C. (2018). FungiDB : An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, *4*(1), 39. https://doi.org/10.3390/jof4010039

Benocci, T., Aguilar-Pontes, M. V., Zhou, M., Seiboth, B., and de Vries, R. P. (2017). Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 152. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0841-x

Benz, J. P., Chau, B. H., Zheng, D., Bauer, S., Glass, N. L., and Somerville, C. R. (2014). A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in Neurospora crassa reveals carbon source-specific cellular adaptations. *Molecular Microbiology*, *91*(2), 275-299. https://doi.org/10.1111/mmi.12459

Berka, R. M., Kodama, K. H., Rey, M. W., Wilson, L. J., and Ward, M. (1991). The development of Aspergillus niger var. Awamori as a host for the expression and secretion of heterologous gene products. *Biochemical Society Transactions*, *19*(3), 681-685. https://doi.org/10.1042/bst0190681

Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Chan, T.-F., Ai, W., and Zheng, X. F. S. (2002). Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(4), 1246-1252. https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1246-1252.2002

Bertrand Teponno, R., Kusari, S., and Spiteller, M. (2016). Recent advances in research on lignans and neolignans. *Natural Product Reports*, *33*(9), 1044-1092. https://doi.org/10.1039/C6NP00021E

Bhetariya, P. J., Sharma, N., Singh, P., Tripathi, P., Upadhyay, S. K., and Gautam, P. (2017). Human Fungal Pathogens and Drug Resistance Against Azole Drugs. In G. Arora, A. Sajid, and V. C. Kalia (Éds.), *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer* (p. 387-428). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3_18

Bhoi, A., Yadu, B., Chandra, J., and Keshavkant, S. (2022). Mutagenesis : A coherent technique to develop biotic stress resistant plants. *Plant Stress*, *3*, 100053. https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100053

Biely, P., Mastihubová, M., Tenkanen, M., Eyzaguirre, J., Li, X.-L., and Vršanská, M. (2011). Action of xylan deacetylating enzymes on monoacetyl derivatives of 4-nitrophenyl glycosides of β-D-xylopyranose and α-L-arabinofuranose. *Journal of Biotechnology*, *151*(1), 137-142. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.074

Bissaro, B., Kodama, S., Nishiuchi, T., Díaz-Rovira, A. M., Hage, H., Ribeaucourt, D., Haon, M., Grisel, S., Simaan, A. J., Beisson, F., Forget, S. M., Brumer, H., Rosso, M.-N., Guallar, V., O'Connell, R., Lafond, M., Kubo, Y., and Berrin, J.-G. (2022). Tandem metalloenzymes gate plant cell entry by pathogenic fungi. *Science Advances*, *8*(51), eade9982. https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9982

Blanchette, R. A. (1991). Delignification by Wood-Decay Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, *29*(1), 381-403. https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.002121

Blanchette, R. A. (2000). A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *International Biodeterioration* and *Biodegradation*, *46*(3), 189-204. https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00077-9

Borchers, A.-C., Langemeyer, L., and Ungermann, C. (2021). Who's in control? Principles of Rab GTPase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. *The Journal of Cell Biology*, *220*(9), e202105120. https://doi.org/10.1083/jcb.202105120

Bourbonnais, R., and Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, *267*(1), 99-102. https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-w

Brandriss, M. C. (1979). Isolation and preliminary characterization of Saccharomyces cerevisiae proline auxotrophs. *Journal of Bacteriology*, *138*(3), 816-822. https://doi.org/10.1128/jb.138.3.816-822.1979

Brazkova, M., Koleva, R., Angelova, G., and Yemendzhiev, H. (2022). Ligninolytic enzymes in Basidiomycetes and their application in xenobiotics degradation. *BIO Web of Conferences*, *45*, 02009. https://doi.org/10.1051/bioconf/20224502009

Brown, N. A., Ries, L. N. A., and Goldman, G. H. (2014). How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. *Fungal Genetics and Biology: FG* and *B*, *72*, 48-63. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.012

Brunow, G., and Lundquist, K. (2010). Functional Groups and Bonding Patterns in Lignin (Including the Lignin-Carbohydrate Complexes). In *Lignin and Lignans : Advances in Chemistry* (p. 267-299). https://doi.org/10.1201/EBK1574444865-c7

Bumpus, J. A. (1989). Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(1), 154-158.

Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D., and Aust, S. D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science (New York, N.Y.)*, *228*(4706), 1434-1436. https://doi.org/10.1126/science.3925550

Burks, C., Darby, A., Londoño, L. G., Momany, M., and Brewer, M. T. (2021). Azole-resistant Aspergillus fumigatus in the environment : Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. *PLOS Pathogens*, *17*(7), e1009711. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009711

Caffall, K. H., and Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, *344*(14), 1879-1900. https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021

Calo, S., Shertz-Wall, C., Lee, S. C., Bastidas, R. J., Nicolás, F. E., Granek, J. A., Mieczkowski, P., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., Cardenas, M. E., and Heitman, J. (2014). Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature*, *513*(7519), 555-558. https://doi.org/10.1038/nature13575

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., and Martínez, Á. T. (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

Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., and Martínez, A. T. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(15), 10324-10330. https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10324

Cameron, M. D., Timofeevski, S., and Aust, S. D. (2000). Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *54*(6), 751-758. https://doi.org/10.1007/s002530000459

Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., and Gübitz, G. M. (2001). Indigo degradation with purified laccases from Trametes hirsuta and Sclerotium rolfsii. *Journal of Biotechnology*, *89*(2-3), 131-139. https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00303-0

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy) : An expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, *37*(suppl_1), D233-D238. https://doi.org/10.1093/nar/gkn663

Carpita, N. C., and Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants : Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *3*(1), 1-30. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1993.tb00007.x

Cheng, L., Rossman, K. L., Mahon, G. M., Worthylake, D. K., Korus, M., Sondek, J., and Whitehead, I. P. (2002). RhoGEF Specificity Mutants Implicate RhoA as a Target for Dbs Transforming Activity. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(19), 6895-6905. https://doi.org/10.1128/MCB.22.19.6895-6905.2002

Cheng, S.-S., Lin, C.-Y., Gu, H.-J., and Chang, S.-T. (2011). Antifungal Activities and Chemical Composition of Wood and Leaf Essential Oils from Cunninghamia konishii. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, *31*(3), 204-217. https://doi.org/10.1080/02773813.2010.515049

Choi, H., Cho, J., Jin, Q., Woo, E.-R., and Lee, D. G. (2012). Antifungal property of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9′-O-β-d-glucoside and its pore-forming action in plasma membrane of Candida albicans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1818*(7), 1648-1655. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.026

Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, *177*(3), 143-155. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.012

Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., and Prakash, O. (2020). Phytochemicals in Cancer Treatment : From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Frontiers in Pharmacology*, *10*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01614

Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H., and Vyas, B. R. M. (2005). Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Enzyme and Microbial Technology*, *2-3*(36), 327-332. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.006

Chung, N., and Aust, S. D. (1995). Inactivation of lignin peroxidase by hydrogen peroxide during the oxidation of phenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *316*(2), 851-855. https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1114

Coradetti, S. T., Craig, J. P., Xiong, Y., Shock, T., Tian, C., and Glass, N. L. (2012). Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(19), 7397-7402. https://doi.org/10.1073/pnas.1200785109

Coradetti, S. T., Xiong, Y., and Glass, N. L. (2013). Analysis of a conserved cellulase transcriptional regulator reveals inducer-independent production of cellulolytic enzymes in Neurospora crassa. *MicrobiologyOpen*, *2*(4), 595-609. https://doi.org/10.1002/mbo3.94

Corbett, N. H. (1965). Micro-morphological studies on the degradation of lignified cell walls by Ascomycetes and Fungi Imperfecti. *Journal of the Institute of Wood Science*, *14*, 18-29.

Craig, J. P., Coradetti, S. T., Starr, T. L., and Glass, N. L. (2015). Direct Target Network of the Neurospora crassa Plant Cell Wall Deconstruction Regulators CLR-1, CLR-2, and XLR-1. *mBio*, *6*(5), e01452-15. https://doi.org/10.1128/mBio.01452-15

Cray, J. A., Stevenson, A., Ball, P., Bankar, S. B., Eleutherio, E. C. A., Ezeji, T. C., Singhal, R. S., Thevelein, J. M., Timson, D. J., and Hallsworth, J. E. (2015). Chaotropicity : A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, *33*, 228-259. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.010

Cripps, C., Bumpus, J. A., and Aust, S. D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(4), 1114-1118. https://doi.org/10.1128/aem.56.4.1114-1118.1990

Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., … Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D988-D995. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049

Da, X., Nishiyama, Y., Tie, D., Hein, K. Z., Yamamoto, O., and Morita, E. (2019). Antifungal activity and mechanism of action of Ou-gon (Scutellaria root extract) components against pathogenic fungi. *Scientific Reports*, *9*(1), 1683. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38916-w

Daly, P., Peng, M., Casado López, S., Lipzen, A., Ng, V., Singan, V. R., Wang, M., Grigoriev, I. V., de Vries, R. P., and 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/10.1016/j.jbiotec.2019.11.014

Daly, P., Peng, M., Di Falco, M., Lipzen, A., Wang, M., Ng, V., Grigoriev, I. V., Tsang, A., Mäkelä, M. R., and de Vries, R. P. (2019). Glucose-Mediated Repression of Plant Biomass Utilization in the White-Rot Fungus Dichomitus squalens. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(23), e01828-19. https://doi.org/10.1128/AEM.01828-19

Daly, P., van Munster, J. M., Archer, D. B., and Raulo, R. (2015). *Transcriptional regulation and responses in filamentous fungi exposed to lignocellulose*. https://doi.org/10.2174/97816810807411150101

Dashtban, M., Schraft, H., and Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, *5*(6), 578-595. https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578

Dassanayake, R. S., Acharya, S., Abidi, N., Dassanayake, R. S., Acharya, S., and Abidi, N. (2018). Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides : Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications. In *Advanced Sorption Process Applications*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.80898

de la Serna, I., Ng, D., and Tyler, B. M. (1999). Carbon Regulation of Ribosomal Genes in Neurospora crassa Occurs by a Mechanism Which Does Not Require Cre-1, the Homologue of the Aspergillus Carbon Catabolite Repressor, CreA. *Fungal Genetics and Biology*, *26*(3), 253-269. https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1121

Decker, S. R., Siika-Aho, M., and Viikari, L. (2009). Enzymatic depolymerization of plant cell wall hemicelluloses. *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*, 352-373.

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., and 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), e2017381118. https://doi.org/10.1073/pnas.2017381118

Del Sorbo, G., Andrade, A. C., Van Nistelrooy, J. G., Van Kan, J. A., Balzi, E., and De Waard, M. A. (1997). Multidrug resistance in Aspergillus nidulans involves novel ATP-binding cassette transporters. *Molecular and General Genetics: MGG*, *254*(4), 417-426. https://doi.org/10.1007/s004380050434

Delmas, S., Pullan, S. T., Gaddipati, S., Kokolski, M., Malla, S., Blythe, M. J., Ibbett, R., Campbell, M., Liddell, S., Aboobaker, A., Tucker, G. A., and Archer, D. B. (2012). Uncovering the Genome-Wide Transcriptional Responses of the Filamentous Fungus Aspergillus niger to Lignocellulose Using RNA Sequencing. *PLOS Genetics*, *8*(8), e1002875. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002875

Demuyser, L., and Van Dijck, P. (2019). Can Saccharomyces cerevisiae keep up as a model system in fungal azole susceptibility research? *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in*

Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, *42*, 22-34. https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.02.002

Deroy, A., Saiag, F., Kebbi-Benkeder, Z., Touahri, N., Hecker, A., Morel-Rouhier, M., Colin, F., Dumarcay, S., Gérardin, P., and Gelhaye, E. (2015). The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi. *PLOS ONE*, *10*(10), e0137083. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137083

de Vries, R. P., and Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *65*(4), 497-522, table of contents. https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001

Dimarogona, M., Topakas, E., and Christakopoulos, P. (2012). Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *2*, e201209015. https://doi.org/10.5936/csbj.201209015

Diouf, P. N., Delbarre, N., Perrin, D., Gérardin, P., Rapin, C., Jacquot, J. P., and Gelhaye, E. (2002). Influence of tropolone on Poria placenta wood degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(9), 4377-4382. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4377-4382.2002

Dixon, D. M., and Walsh, T. J. (1996). Antifungal Agents. In S. Baron (Éd.), *Medical Microbiology* (4th éd.). University of Texas Medical Branch at Galveston. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8263/

Doddapaneni, H., Chakraborty, R., and Yadav, J. S. (2005). Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium : Evidence for gene duplications and extensive gene clustering. *BMC Genomics*, *6*(1), 92. https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-92

Dorsaz, S., Snäkä, T., Favre-Godal, Q., Maudens, P., Boulens, N., Furrer, P., Ebrahimi, S. N., Hamburger, M., Allémann, E., Gindro, K., Queiroz, E. F., Riezman, H., Wolfender, J.-L., and Sanglard, D. (2017). Identification and Mode of Action of a Plant Natural Product Targeting Human Fungal Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(9), e00829-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00829-17

Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., and Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database : Functions and literature. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D571-D577. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045

Du, J., Li, S., and Zhao, H. (2010). Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from Neurospora crassa and Pichia stipitis. *Molecular BioSystems*, *6*(11), 2150-2156.

Durand, H., Clanet, M., and Tiraby, G. (1988). Genetic improvement of Trichoderma reesei for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*, *10*(6), 341-346. https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90012-9

Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F. O., Baker, S. E., Barry, K., Bendiksby, M., Blumentritt, M., Coutinho, P. M., Cullen, D., de Vries, R.

P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihrmark, K., Kauserud, H., … Watkinson, S. C. (2011). The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6043), 762-765. https://doi.org/10.1126/science.1205411

Eriksson, K.-E., Blanchette, R. A., Ander, P., and 1941-. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag.

Falcão, L., and Araújo, M. E. M. (2018). Vegetable Tannins Used in the Manufacture of Historic Leathers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*(5), 1081. https://doi.org/10.3390/molecules23051081

Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., and Casati, P. (2012). Flavonoids : Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, *3*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2012.00222

Fernández-González, A. J., Valette, N., Kohler, A., Dumarçay, S., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2018). Oak extractive-induced stress reveals the involvement of new enzymes in the early detoxification response of Phanerochaete chrysosporium. *Environmental Microbiology*, *20*(10), 3890-3901. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14409

Ferrari, R., Gautier, V., and Silar, P. (2021). Chapter Three—Lignin degradation by ascomycetes. In M. Morel-Rouhier and R. Sormani (Éds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 99, p. 77-113). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.006

Ferreira, P., Carro, J., Serrano, A., and Martínez, A. T. (2015). A survey of genes encoding H2O2-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. *Mycologia*, *107*(6), 1105-1119. https://doi.org/10.3852/15-027

Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., and Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *19*, 1-13. https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000100001

Fleissner, A., Sopalla, C., and Weltring, K.-M. (2002). An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of Gibberella pulicaris to phytoalexins and virulence on potato tubers. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, *15*(2), 102-108. https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.2.102

Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martínez, A. T., Otillar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Ferreira, P., Findley, K., … Hibbett, D. S. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6089), 1715-1719. https://doi.org/10.1126/science.1221748

Freeman, M., Nicholas, D., and Schultz, T. (2005). *Non-Arsenical Wood Protection : Alternatives for CCA, Creosote, and Pentachlorophenol*.

Giaever, G., Flaherty, P., Kumm, J., Proctor, M., Nislow, C., Jaramillo, D. F., Chu, A. M., Jordan, M. I., Arkin, A. P., and Davis, R. W. (2004). Chemogenomic profiling : Identifying the functional

interactions of small molecules in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(3), 793-798. https://doi.org/10.1073/pnas.0307490100

Gielkens, M. M., Visser, J., and de Graaff, L. H. (1997). Arabinoxylan degradation by fungi : Characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from Aspergillus niger and Aspergillus tubingensis. *Current Genetics*, *31*(1), 22-29. https://doi.org/10.1007/s002940050172

Gilbertson, R. L. (1980). Wood-Rotting Fungi of North America. *Mycologia*, *72*(1), 1-49. https://doi.org/10.1080/00275514.1980.12021153

Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., and Bogel-Łukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol : A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4775-4800. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088

Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., and Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Review of Microbiology*, *67*, 477-498. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044

Glenn, J. K., and Gold, M. H. (1983). Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(6), 1741-1747.

Glenn, J. K., and Gold, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *242*(2), 329-341. https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90217-6

Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., and Gold, M. H. (1983). An extracellular H2O2-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *114*(3), 1077-1083. https://doi.org/10.1016/0006-291x(83)90672-1

Gold, M. H., Cheng, T. M., and Alic, M. (1983). Formation, Fusion, and Regeneration of Protoplasts from Wild-Type and Auxotrophic Strains of the White Rot Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *46*(1), 260-263.

González, A., Hall, M. N., Lin, S.-C., and Hardie, D. G. (2020). AMPK and TOR : The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metabolism*, *31*(3), 472-492. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.015

Goodell, B. (2020). Fungi Involved in the Biodeterioration and Bioconversion of Lignocellulose Substrates. In J. P. Benz and K. Schipper (Éds.), *Genetics and Biotechnology* (p. 369-397). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-49924-2_15

Goodwin, D. C., Aust, S. D., and Grover, T. A. (1995). Evidence for veratryl alcohol as a redox mediator in lignin peroxidase-catalyzed oxidation. *Biochemistry*, *34*(15), 5060-5065. https://doi.org/10.1021/bi00015a017

Goyal, A., Sharma, A., Kaur, J., Kumari, S., Garg, M., Sindhu, R. K., Rahman, M. H., Akhtar, M. F., Tagde, P., Najda, A., Banach-Albińska, B., Masternak, K., Alanazi, I. S., Mohamed, H. R. H., El-Kott, A. F., Shah, M., Germoush, M. O., Al-Malky, H. S., Abukhuwayjah, S. H., … Abdel-Daim, M. M. (2022). Bioactive-Based Cosmeceuticals : An Update on Emerging Trends. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(3), 828. https://doi.org/10.3390/molecules27030828

Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otillar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., and Shabalov, I. (2014). MycoCosm portal : Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, *42*(Database issue), D699-704. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183

Guadix-Montero, S., and Sankar, M. (2018). Review on Catalytic Cleavage of C–C Inter-unit Linkages in Lignin Model Compounds : Towards Lignin Depolymerisation. *Topics in Catalysis*, *61*(3), 183-198. https://doi.org/10.1007/s11244-018-0909-2

Guerra, A., Mendonça, R., and Ferraz, A. (2003). Molecular weight distribution of wood components extracted from Pinus taeda biotreated by Ceriporiopsis subvermispora. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*(1), 12-18. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00099-1

Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M. J., and Martínez, A. T. (1994). Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus Pleurotus. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(6), 1783-1788. https://doi.org/10.1128/aem.60.6.1783-1788.1994

Hage, H., and Rosso, M.-N. (2021). Evolution of Fungal Carbohydrate-Active Enzyme Portfolios and Adaptation to Plant Cell-Wall Polymers. *Journal of Fungi*, *7*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/jof7030185

Hai, P. Q., Nozaki, K., Amano, Y., and Kanda, T. (2000). Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from Irpex lacteus and its adsorption on cellulose. *Journal of Applied Glycoscience (Japan)*.

Haider, K., and Trojanowski, J. (1975). Decomposition of specifically 14C-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as models for lignin degradation by soft and white rot fungi. *Archives of Microbiology*, *105*(1), 33-41. https://doi.org/10.1007/BF00447109

Hallac, B. B., and Ragauskas, A. J. (2011). Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *5*(2), 215-225. https://doi.org/10.1002/bbb.269

Hammel, K. E., Green, B., and Gai, W. Z. (1991). Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(23), 10605-10608. https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10605

Hammel, K. E., Tien, M., Kalyanaraman, B., and Kirk, T. K. (1985). Mechanism of oxidative C alpha-C beta cleavage of a lignin model dimer by Phanerochaete chrysosporium ligninase. Stoichiometry and involvement of free radicals. *The Journal of Biological Chemistry*, *260*(14), 8348-8353.

Harvey, P. J., and Palmer, J. M. (1990). Oxidation of phenolic compounds by ligninase. *Journal of Biotechnology*, *13*(2), 169-179. https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90102-H

Harvey, P. J., Schoemaker, H. E., and Palmer, J. M. (1986). Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by Phanerochaete chrysosporium. *FEBS Letters*, *195*(1), 242-246. https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80168-5

Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi : Production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, *13*(2-3), 125-135. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00039.x

Hatakka, A., and Hammel, K. E. (2011). Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. In M. Hofrichter (Éd.), *Industrial Applications* (p. 319-340). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8_15

Hedenström, E., Fagerlund-Edfeldt, A., Edman, M., and Jonsson, B.-G. (2016). Resveratrol, piceatannol, and isorhapontigenin from Norway spruce (Picea abies) debarking wastewater as inhibitors on the growth of nine species of wood-decaying fungi. *Wood Science and Technology*, *50*(3), 617-629.

Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, *253*(5022), 905-909. https://doi.org/10.1126/science.1715094

Henriksson, G., Johansson, G., and Pettersson, G. (2000). A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology*, *78*(2), 93-113. https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00206-6

Hibbett, D. S., and Donoghue, M. J. (2001). Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Systematic Biology*, *50*(2), 215-242.

Higuchi, T. (2006). Look back over the studies of lignin biochemistry. *Journal of Wood Science*, *52*(1), Article 1. https://doi.org/10.1007/s10086-005-0790-z

Hirai, H., Shibata, H., Kawai, S., and Nishida, T. (2006). Role of 1-hydroxybenzotriazole in oxidation by laccase from Trametes versicolor. Kinetic analysis of the laccase-1-hydroxybenzotriazole couple. *FEMS Microbiology Letters*, *265*(1), 56-59. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00474.x

Hofrichter, M. (2002). Review : Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, *30*(4), 454-466. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2

Hori, C., Igarashi, K., Katayama, A., and Samejima, M. (2011). Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium grown on cellulose. *FEMS Microbiology Letters*, *321*(1), 14-23. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02307.x

Hu, L., Wang, D., Liu, L., Chen, J., Xue, Y., and Shi, Z. (2013). Ca2+ Efflux Is Involved in Cinnamaldehyde-Induced Growth Inhibition of Phytophthora capsici. *PLOS ONE*, *8*(10), e76264. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076264

Hutagalung, A. H., and Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, *91*(1), 119-149. https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009

Ilmén, M., Thrane, C., and Penttilä, M. (1996). The glucose repressor gene cre1 of Trichoderma : Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molecular* and *General Genetics: MGG*, *251*(4), 451-460. https://doi.org/10.1007/BF02172374

Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, *127*(2), 111-127. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00130-1

Jansson, M. B., and Nilvebrant, N.-O. (2009). 7. Wood Extractives. In *7. Wood Extractives* (p. 147-172). De Gruyter. https://doi.org/10.1515/9783110213409.147

Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., Clément, C., and Courot, E. (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors (Oxford, England)*, *36*(5), 331-341. https://doi.org/10.1002/biof.108

Jensen, K. A., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E., and Hammel, K. E. (1996). Manganese-Dependent Cleavage of Nonphenolic Lignin Structures by Ceriporiopsis subvermispora in the Absence of Lignin Peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(10), 3679-3686. https://doi.org/10.1128/aem.62.10.3679-3686.1996

Jiao, W., Ding, W., Rollins, J. A., Liu, J., Zhang, Y., Zhang, X., and Pan, H. (2023). Cross-Talk and Multiple Control of Target of Rapamycin (TOR) in Sclerotinia sclerotiorum. *Microbiology Spectrum*, *11*(2), e00013-23.

Johannes, C., and Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(2), 524-528. https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.524-528.2000

Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, *8*(3), 275-282. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275

Jouanin, L., and Lapierre, C. (2006). Avantages et limites d'Arabidopsis thaliana pour l'étude des premières étapes de la lignification. *Cahiers Agricultures*, *15*(2), Article 2.

Jun, H., Kieselbach, T., and Jönsson, L. J. (2011). Enzyme production by filamentous fungi : Analysis of the secretome of Trichoderma reesei grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 68. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68

Kamei, I. (2020). Wood-Rotting Fungi for Biofuel Production. In G. Salehi Jouzani, M. Tabatabaei, and M. Aghbashlo (Éds.), *Fungi in Fuel Biotechnology* (p. 123-147). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44488-4_6

Kameshwar, A. K. S., and Qin, W. (2017). Metadata Analysis of Phanerochaete chrysosporium Gene Expression Data Identified Common CAZymes Encoding Gene Expression Profiles Involved in Cellulose and Hemicellulose Degradation. *International Journal of Biological Sciences*, *13*(1), 85-99. https://doi.org/10.7150/ijbs.17390

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., … Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature*, *444*(7115), Article 7115. https://doi.org/10.1038/nature05248

Kapich, A. N., Jensen, K. A., and Hammel, K. E. (1999). Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. *FEBS Letters*, *461*(1), 115-119. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01432-5

Kasai, N., Ikushiro, S., Hirosue, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Uchida, Y., Wariishi, H., Ohta, M., and Sakaki, T. (2010). Atypical kinetics of cytochromes P450 catalysing 3′-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *The Journal of Biochemistry*, *147*(1), 117-125. https://doi.org/10.1093/jb/mvp155

Kasai, N., Ikushiro, S., Hirosue, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., Ohta, M., and Sakaki, T. (2009). Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3′-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *387*(1), 103-108. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.134

Kawamura, F., Ohara, S., and Nishida, A. (2004). *Antifungal activity of constituents from the heartwood of Gmelina arborea : Part 1. Sensitive antifungal assay against Basidiomycetes*. *58*(2), 189-192. https://doi.org/10.1515/HF.2004.028

Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., Yang, G.-M., Choi, H. Y., and Cho, S.-G. (2016). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(4), 569. https://doi.org/10.3390/ijms17040569

Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., and Gérardin, P. (2015). Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Annals of Forest Science*, *72*(2), Article 2. https://doi.org/10.1007/s13595-014-0428-7

Kelly, E. E., Horgan, C. P., Adams, C., Patzer, T. M., Shúilleabháin, D. M. N., Norman, J. C., and McCaffrey, M. W. (2010). Class I Rab11-family interacting proteins are binding targets for the Rab14 GTPase. *Biology of the Cell*, *102*(1), 51-62. https://doi.org/10.1042/BC20090068

Kersten, P., and Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Fungal Genetics and Biology*, *44*(2), 77-87. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.07.007

Kersten, P. J., and Kirk, T. K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H2O2 production by Phanerochaete chrysosporium. *Journal of Bacteriology*, *169*(5), 2195-2201.

Kh, K., J, D., H, P., and Jm, B. (2002). Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of Trametes villosa in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Research*, *36*(19). https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00198-7

Khanbabaee, K., and van Ree, T. (2001). Tannins : Classification and definition. *Natural Product Reports*, *18*(6), 641-649. https://doi.org/10.1039/b1010611

Kilpeläinen, A., Peltola, H., Ryyppö, A., and Kellomäki, S. (2005). Scots pine responses to elevated temperature and carbon dioxide concentration : Growth and wood properties. *Tree Physiology*, *25*(1), 75-83. https://doi.org/10.1093/treephys/25.1.75

Kim, S. J., Ishikawa, K., Hirai, M., and Shoda, M. (1995). Characteristics of a newly isolated fungus, Geotrichum candidum Dec 1, which decolorizes various dyes. *Journal of Fermentation and Bioengineering (Japan)*.

Kirker, G. T., Bishell, A. B., Lebow, S., and Clausen, C. A. (2013). Transferable Durability : Enhancing decay resistance of non-durable species with extractives from durable wood species. *In: Proceedings IRG Annual Meeting,The International Research Group on Wood Protection, Section 1, Biology; IRG/WP 13-10808; 2013. 12 p.*, 1-12.

Kirker, G. T., Blodgett, A. B., Arango, R. A., Lebow, P. K., and Clausen, C. A. (2013). The role of extractives in naturally durable wood species. *International Biodeterioration* and *Biodegradation*, *82*, 53-58. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.007

Koch, D., Rai, A., Ali, I., Bleimling, N., Friese, T., Brockmeyer, A., Janning, P., Goud, B., Itzen, A., Müller, M. P., and Goody, R. S. (2016). A pull-down procedure for the identification of unknown GEFs for small GTPases. *Small GTPases*, *7*(2), 93-106. https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1156803

Kolpak, F. J., and Blackwell, J. (1976). Determination of the Structure of Cellulose II. *Macromolecules*, *9*(2), 273-278. https://doi.org/10.1021/ma60050a019

Kowalczyk, J. E., Peng, M., Pawlowski, M., Lipzen, A., Ng, V., Singan, V., Wang, M., Grigoriev, I. V., and Mäkelä, M. R. (2019). The White-Rot Basidiomycete Dichomitus squalens Shows Highly Specific Transcriptional Response to Lignocellulose-Related Aromatic Compounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00229

Kriznik, A., Yéléhé-Okouma, M., Lec, J.-C., Groshenry, G., Le Cordier, H., Charron, C., Quinternet, M., Mazon, H., Talfournier, F., Boschi-Muller, S., Jouzeau, J.-Y., and Reboul, P. (2019). CRDSAT Generated by pCARGHO : A New Efficient Lectin-Based Affinity Tag Method for Safe, Simple, and Low-Cost Protein Purification. *Biotechnology Journal*, *14*(4), 1800214. https://doi.org/10.1002/biot.201800214

Kuo, D., Nie, M., and Courey, A. J. (2014). SUMO as a solubility tag and in vivo cleavage of SUMO fusion proteins with Ulp1. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1177*, 71-80. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1034-2_6

Lalève, A., Gamet, S., Walker, A.-S., Debieu, D., Toquin, V., and Fillinger, S. (2014). Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from Botrytis cinerea highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environmental Microbiology*, *16*(7), 2253-2266. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12282

Langston, J. A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., and Sweeney, M. D. (2011). Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(19), 7007-7015. https://doi.org/10.1128/AEM.05815-11

Latté, K. P., and Kolodziej, H. (2000). Antifungal Effects of Hydrolysable Tannins and Related Compounds on Dermatophytes, Mould Fungi and Yeasts. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *55*(5-6), 467-472. https://doi.org/10.1515/znc-2000-5-625

Leisola, M. S. A., Schmidt, B., Thanei-Wyss, U., and Fiechter, A. (1985). Aromatic ring cleavage of veratryl alcohol by Phanerochaete chrysosporium. *FEBS Letters*, *189*(2), 267-270. https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81037-1

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 41. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41

Lewis, N. G., and Davin, L. B. (1999). Lignans: biosynthesis and function. *Comprehensive natural products chemistry*, *1*, 639-712.

Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., and Liu, S. (2020). Developing Aspergillus niger as a cell factory for food enzyme production. *Biotechnology Advances*, *44*, 107630. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630

Li, L., Zhu, T., Song, Y., Luo, X., Feng, L., Zhuo, F., Li, F., and Ren, M. (2019). Functional Characterization of Target of Rapamycin Signaling in Verticillium dahliae. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00501

Li, Y., Qi, B., and Wan, Y. (2014). Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *167*, 324-330. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.035

Li, Z.-S., Szczypka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D. J., and Rea, P. A. (1996). The Yeast Cadmium Factor Protein (YCF1) Is a Vacuolar Glutathione S-Conjugate Pump (∗). *Journal of Biological Chemistry*, *271*(11), 6509-6517. https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6509

Linford, A., Yoshimura, S., Bastos, R. N., Langemeyer, L., Gerondopoulos, A., Rigden, D. J., and Barr, F. A. (2012). Rab14 and Its Exchange Factor FAM116 Link Endocytic Recycling and Adherens Junction Stability in Migrating Cells. *Developmental Cell*, *22-540*(5), 952-966. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.010

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, *42*(Database issue), D490-495. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., and Fraaije, B. A. (2015). Chapter Two—The Evolution of Fungicide Resistance. In S. Sariaslani and G. M. Gadd (Éds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 90, p. 29-92). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization : Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *66*(3), 506-577, table of contents. https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

Ma, Z., Yan, X., Zhao, L., Zhou, J., Pang, W., Kai, Z., and Wu, F. (2016). Combretastatin A-4 and Derivatives : Potential Fungicides Targeting Fungal Tubulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(4), 746-751. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05119

Mabicka, A., Dumarçay, S., Rouhier, N., Linder, M., Jacquot, J. P., Gérardin, P., and Gelhaye, E. (2005). Synergistic wood preservatives involving EDTA, irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *55*(3), 203-211. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.01.002

Machado, A. S., Valadares, F., Silva, T. F., Milagres, A. M. F., Segato, F., and Ferraz, A. (2020). The Secretome of Phanerochaete chrysosporium and Trametes versicolor Grown in Microcrystalline Cellulose and Use of the Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 826. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00826

MacRae, W. D., and Towers, G. H. N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, *23*(6), 1207-1220. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80428-8

Mahajan, S., and Master, E. R. (2010). Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by Phanerochaete carnosa grown on spruce and microcrystalline cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(6), 1903-1914. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2516-4

Mair, W. J., Deng, W., Mullins, J. G. L., West, S., Wang, P., Besharat, N., Ellwood, S. R., Oliver, R. P., and Lopez-Ruiz, F. J. (2016). Demethylase Inhibitor Fungicide Resistance in Pyrenophora teres f. Sp. Teres Associated with Target Site Modification and Inducible Overexpression of Cyp51. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01279

Mäkelä, M. R., Dilokpimol, A., Koskela, S. M., Kuuskeri, J., de Vries, R. P., and Hildén, K. (2018). Characterization of a feruloyl esterase from Aspergillus terreus facilitates the division of fungal enzymes from Carbohydrate Esterase family 1 of the carbohydrate-active enzymes (CAZy) database. *Microbial Biotechnology*, *11*(5), 869-880. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13273

Mäkelä, M. R., Hildén, K. S., and de Vries, R. P. (2014). 8 Degradation and Modification of Plant Biomass by Fungi. In M. Nowrousian (Éd.), *Fungal Genomics* (p. 175-208). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45218-5_8

Mäkelä, M. R., Marinović, M., Nousiainen, P., Liwanag, A. J. M., Benoit, I., Sipilä, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., and Hildén, K. S. (2015). Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. *Advances in Applied Microbiology*, *91*, 63-137. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.001

Malviya, M. (2012). *ECOFRIENDLY TREATMENT OF AZO DYES : BIODECOLORIZATIOIN USING BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM TEXTIE WASTEWATER*. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3214.6083

Mani-López, E., Cortés-Zavaleta, O., and López-Malo, A. (2021). A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. *SN Applied Sciences*, *3*(1), 44. https://doi.org/10.1007/s42452-020-04102-1

Marat, A. L., Dokainish, H., and McPherson, P. S. (2011). DENN Domain Proteins : Regulators of Rab GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(16), 13791-13800. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.217067

Marian, I. M., Vonk, P. J., Valdes, I. D., Barry, K., Bostock, B., Carver, A., Daum, C., Lerner, H., Lipzen, A., Park, H., Schuller, M. B. P., Tegelaar, M., Tritt, A., Schmutz, J., Grimwood, J., Lugones, L. G., Choi, I.-G., Wösten, H. A. B., Grigoriev, I. V., and Ohm, R. A. (2022). The Transcription Factor Roc1 Is a Key Regulator of Cellulose Degradation in the Wood-Decaying Mushroom Schizophyllum commune. *MBio*, *13*(3), e0062822. https://doi.org/10.1128/mbio.00628-22

Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C. P., Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, A. T., Kersten, P., Hammel, K. E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Splinter BonDurant, S., Larrondo, L. F., Canessa, P., Vicuna, R., … Cullen, D. (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus Postia placenta supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(6), 1954-1959. https://doi.org/10.1073/pnas.0809575106

Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus Phanerochaete chrysosporium strain RP78. *Nature Biotechnology*, *22*(6), 695-700. https://doi.org/10.1038/nbt967

Martínez-Sotres, C., López-Albarrán, P., Cruz-de-León, J., García-Moreno, T., Rutiaga-Quiñones, J. G., Vázquez-Marrufo, G., Tamariz-Mascarúa, J., and Herrera-Bucio, R. (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of Dalbergia congestiflora Pittier heartwood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *69*, 38-40. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.11.016

Martínez-Sotres, C., Rutiaga-Quiñones, J. G., Herrera-Bucio, R., Gallo, M., and López-Albarrán, P. (2015). Molecular docking insights into the inhibition of laccase activity by medicarpin. *Wood Science and Technology*, *49*(4), 857-868.

Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., and Homolka, L. (2016). Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases : A review. *Chemosphere*, *149*, 373-382. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.022

Mathé, C., Fawal, N., Roux, C., and Dunand, C. (2019). In silico definition of new ligninolytic peroxidase sub-classes in fungi and putative relation to fungal life style. *Scientific Reports*, *9*(1), 20373. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56774-4

Mathieu, Y., Prosper, P., Buée, M., Dumarçay, S., Favier, F., Gelhaye, E., Gérardin, P., Harvengt, L., Jacquot, J.-P., Lamant, T., Meux, E., Mathiot, S., Didierjean, C., and Morel, M. (2012). Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(46), 39001-39011. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402776

Mathieu, Y., Prosper, P., Favier, F., Harvengt, L., Didierjean, C., Jacquot, J.-P., Morel-Rouhier, M., and Gelhaye, E. (2013). Diversification of Fungal Specific Class A Glutathione Transferases in Saprotrophic Fungi. *PLOS ONE*, *8*(11), e80298. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080298

Mauzeroll, J., and Bard, A. J. (2004). Scanning electrochemical microscopy of menadione-glutathione conjugate export from yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(21), 7862-7867. https://doi.org/10.1073/pnas.0402556101

McCrae, S. I., Leith, K. M., Gordon, A. H., and Wood, T. M. (1994). Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus Aspergillus awamori : Isolation and characterization of a feruloyl esterase and a p-coumaroyl esterase. *Enzyme and Microbial Technology*, *16*(10), 826-834. https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90055-8

McRae, J. M., and Kennedy, J. A. (2011). Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency : A review of current research. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *16*(3), 2348-2364. https://doi.org/10.3390/molecules16032348

Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gérardin, P., Jacquot, J.-P., Dumarçay, S., and Gelhaye, E. (2013). New substrates and activity of Phanerochaete chrysosporium Omega glutathione transferases. *Biochimie*, *95*(2), 336-346. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.003

Mhlongo, S. I., den Haan, R., Viljoen-Bloom, M., and van Zyl, W. H. (2015). Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance. *Enzyme and Microbial Technology*, *81*, 16-22. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.07.005

Mihara, R., Barry, K. M., Mohammed, C. L., and Mitsunaga, T. (2005). Comparison of antifungal and antioxidant activities of Acacia mangium and A. auriculiformis heartwood extracts. *Journal of Chemical Ecology*, *31*(4), 789-804. https://doi.org/10.1007/s10886-005-3544-x

Miró, N., and González, N. (2022). Actividades exocelulares producidas por Phanerochaete chrysosporium, Trametes elegans y Pleurotus sp. En bagazo de caña y corteza de pino / Nolba Miró. *SERBIULA (sistema Librum 2.0)*.

Miyauchi, S., Rancon, A., Drula, E., Hage, H., Chaduli, D., Favel, A., Grisel, S., Henrissat, B., Herpoël-Gimbert, I., Ruiz-Dueñas, F. J., Chevret, D., Hainaut, M., Lin, J., Wang, M., Pangilinan, J., Lipzen, A., Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Riley, R., … Rosso, M.-N. (2018). Integrative visual omics of the white-rot fungus Polyporus brumalis exposes the biotechnological potential of its oxidative enzymes for delignifying raw plant biomass. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 201. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1198-5

Monteiro, C. de A., Santos, J. R. A. dos, Monteiro, C. de A., and Santos, J. R. A. dos. (2019). Phytochemicals and Their Antifungal Potential against Pathogenic Yeasts. In *Phytochemicals in Human Health*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.87302

Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J.-P., and Gelhaye, E. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microbial Biotechnology*, *6*(3), 248-263. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12015

Morel-Rouhier, M. (2021). Chapter Four—Wood as a hostile habitat for ligninolytic fungi. In M. Morel-Rouhier and R. Sormani (Éds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 99, p. 115-149). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.001

Morel-Rouhier, M., Ngadin, A., Droux, M., Jacquot, J.-P., and Gelhaye, E. (2009). The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *66*, 3711-3725. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0104-5

Morgenstern, I., Klopman, S., and Hibbett, D. S. (2008). Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. *Journal of Molecular Evolution*, *66*(3), 243-257. https://doi.org/10.1007/s00239-008-9079-3

Morin, E., Kohler, A., Baker, A. R., Foulongne-Oriol, M., Lombard, V., Nagye, L. G., Ohm, R. A., Patyshakuliyeva, A., Brun, A., Aerts, A. L., Bailey, A. M., Billette, C., Coutinho, P. M., Deakin, G., Doddapaneni, H., Floudas, D., Grimwood, J., Hildén, K., Kües, U., … Martin, F. (2012). Genome sequence of the button mushroom Agaricus bisporus reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(43), 17501-17506. https://doi.org/10.1073/pnas.1206847109

Nagy, L. G., Riley, R., Bergmann, P. J., Krizsán, K., Martin, F. M., Grigoriev, I. V., Cullen, D., and Hibbett, D. S. (2017). Genetic Bases of Fungal White Rot Wood Decay Predicted by Phylogenomic Analysis of Correlated Gene-Phenotype Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(1), 35-44. https://doi.org/10.1093/molbev/msw238

Nascimento, M. S., Santana, A. L. B. D., Maranhão, C. A., Bieber, L. S. O. and L., Nascimento, M. S., Santana, A. L. B. D., Maranhão, C. A., and Bieber, L. S. O. and L. (2013). Phenolic Extractives and Natural Resistance of Wood. In *Biodegradation—Life of Science*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/56358

Nguyen, D. V. (2020). *Isolation et caractérisation de mutants de Phanerochaete chrysosporium résistants à différents composés antifongiques* [These de doctorat, Université de Lorraine]. https://www.theses.fr/2020LORR0045

Nguyen, D. V., Roret, T., Fernandez-Gonzalez, A., Kohler, A., Morel-Rouhier, M., Gelhaye, E., and Sormani, R. (2020). Target Of Rapamycin pathway in the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *PloS One*, *15*(2), e0224776. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224776

Olkkonen, V. M., and Stenmark, H. (1997). Role of Rab GTPases in membrane traffic. *International Review of Cytology*, *176*, 1-85. https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61608-3

Østergaard, L., and Yanofsky, M. F. (2004). Establishing gene function by mutagenesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *39*(5), 682-696. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02149.x

Pereira, H., Graça, J., and Rodrigues, J. (2004). Wood Chemistry in Relation to Quality. *Cheminform*, *35*. https://doi.org/10.1002/chin.200446298

Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. (2001). Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins11Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology*, *313*(4), 889-901. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5072

Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Beauchene, J., Gérardin, P., Dumarçay, S., Sormani, R., Morel-Rouhier, M., and Gelhaye, E. (2020). A reverse chemical ecology approach to explore wood natural durability. *Microbial Biotechnology*, *13*(5), 1673-1677. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13540

Perrot, T., Schwartz, M., Saiag, F., Salzet, G., Dumarçay, S., Favier, F., Gérardin, P., Girardet, J.-M., Sormani, R., Morel-Rouhier, M., Amusant, N., Didierjean, C., and Gelhaye, E. (2018). Fungal Glutathione Transferases as Tools to Explore the Chemical Diversity of Amazonian Wood Extractives. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *6*(10), 13078-13085. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02636

Pettersen. (1984). *Chemical Composition of Wood Pettersen 1984 | PDF | Chemistry | Physical Sciences*. Scribd.

Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Spring, J.-L. (2004). Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *65*(6), 297-303. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.03.002

Phillips, C. M., Beeson, W. T. I., Cate, J. H., and Marletta, M. A. (2011). Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by Neurospora crassa. *ACS Chemical Biology*, *6*(12), 1399-1406. https://doi.org/10.1021/cb200351y

Phillips, C. M., Iavarone, A. T., and Marletta, M. A. (2011). Quantitative Proteomic Approach for Cellulose Degradation by Neurospora crassa. *Journal of Proteome Research*, *10*(9), 4177-4185. https://doi.org/10.1021/pr200329b

Piotrowski, J. S., Okada, H., Lu, F., Li, S. C., Hinchman, L., Ranjan, A., Smith, D. L., Higbee, A. J., Ulbrich, A., Coon, J. J., Deshpande, R., Bukhman, Y. V., McIlwain, S., Ong, I. M., Myers, C. L., Boone, C., Landick, R., Ralph, J., Kabbage, M., and Ohya, Y. (2015). Plant-derived antifungal agent poacic acid targets β-1,3-glucan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(12), E1490-E1497. https://doi.org/10.1073/pnas.1410400112

Pollegioni, L., Tonin, F., and Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal*, *282*(7), 1190-1213. https://doi.org/10.1111/febs.13224

Prado, R. S., Bailão, A. M., Silva, L. C., de Oliveira, C. M. A., Marques, M. F., Silva, L. P., Silveira-Lacerda, E. P., Lima, A. P., Soares, C. M., and Pereira, M. (2015). Proteomic profile response of Paracoccidioides lutzii to the antifungal argentilactone. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 616. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00616

Preston. (2000). Wood preservation. Trends of today that will influence the industry tomorrow. *Forest Products Journal*, *50*(9), 12-19.

Prévéral, S., Gayet, L., Moldes, C., Hoffmann, J., Mounicou, S., Gruet, A., Reynaud, F., Lobinski, R., Verbavatz, J.-M., Vavasseur, A., and Forestier, C. (2009). A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans : Heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(8), 4936-4943. https://doi.org/10.1074/jbc.M808130200

Qian, B., Liu, X., Ye, Z., Zhou, Q., Liu, P., Yin, Z., Wang, W., Zheng, X., Zhang, H., and Zhang, Z. (2021). Phosphatase-associated protein MoTip41 interacts with the phosphatase MoPpe1 to mediate crosstalk between TOR and cell wall integrity signalling during infection by the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. *Environmental Microbiology*, *23*(2), 791-809. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15136

Ralph, J., Lapierre, C., and Boerjan, W. (2019). Lignin structure and its engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 240-249. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019

Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., and Christensen, J. H. (2004). Lignins : Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews*, *3*(1-2), 29-60. https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4

Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., and Rao, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(12), 5062-5069. https://doi.org/10.1128/AAC.01050-10

Ravanal, M. C., Callegari, E., and Eyzaguirre, J. (2010). Novel Bifunctional α-l-Arabinofuranosidase/Xylobiohydrolase (ABF3) from Penicillium purpurogenum. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(15), 5247-5253. https://doi.org/10.1128/AEM.00214-10

Redondo-Blanco, S., Fernández, J., López-Ibáñez, S., Miguélez, E. M., Villar, C. J., and Lombó, F. (2020). Plant Phytochemicals in Food Preservation : Antifungal Bioactivity: A Review. *Journal of Food Protection*, *83*(1), 163-171. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-163

Ridley, B. L., O'Neill, M. A., and Mohnen, D. (2001). Pectins : Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, *57*(6), 929-967. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3

Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otillar, R., Lindquist, E. A., Sun, H., LaButti, K. M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S. E., Pisabarro, A. G., Walton, J. D., … Grigoriev, I. V. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(27), 9923-9928. https://doi.org/10.1073/pnas.1400592111

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell*, *122*(5), 735-749. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., RodrÍguez-Vázquez, R., and Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, *27*(3), 67-82. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001

Rivera-Molina, F. E., and Novick, P. J. (2009). A Rab GAP cascade defines the boundary between two Rab GTPases on the secretory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(34), 14408-14413. https://doi.org/10.1073/pnas.0906536106

Romero, E., Ferreira, P., Martínez, Á. T., and Martínez, M. J. (2009). New oxidase from Bjerkandera arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1794*(4), 689-697. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.013

Roy, B. P., Dumonceaux, T., Koukoulas, A. A., and Archibald, F. S. (1996). Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus Trametes versicolor. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(12), 4417-4427. https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4417-4427.1996

Royer, M., Rodrigues, A. M. S., Herbette, G., Beauchêne, J., Chevalier, M., Hérault, B., Thibaut, B., and Stien, D. (2012). Efficacy of Bagassa guianensis Aubl. Extract against wood decay and human pathogenic fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *70*, 55-59. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.016

Ryabova, O., Vrsanská, M., Kaneko, S., van Zyl, W. H., and Biely, P. (2009). A novel family of hemicellulolytic alpha-glucuronidase. *FEBS Letters*, *583*(9), 1457-1462. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.057

Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., and Mäkelä, M. R. (2014). Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *78*(4), 614-649. https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14

Saha, B. C. (2000). Alpha-L-arabinofuranosidases : Biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, *18*(5), 403-423. https://doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00044-6

Saitou, N., and 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

Samal, A., Craig, J. P., Coradetti, S. T., Benz, J. P., Eddy, J. A., Price, N. D., and Glass, N. L. (2017). Network reconstruction and systems analysis of plant cell wall deconstruction by Neurospora crassa. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 225. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0901-2

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, *27*(2), 185-194. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001

Sánchez-Torres, P., and Tuset, J. J. (2011). Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant Penicillium digitatum strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology*, *59*(2), 159-165. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.017

Sang, H., Hulvey, J. P., Green, R., Xu, H., Im, J., Chang, T., and Jung, G. (2018). A Xenobiotic Detoxification Pathway through Transcriptional Regulation in Filamentous Fungi. *mBio*, *9*(4), e00457-18. https://doi.org/10.1128/mBio.00457-18

Saykhedkar, S., Ray, A., Ayoubi-Canaan, P., Hartson, S. D., Prade, R., and Mort, A. J. (2012). A time course analysis of the extracellular proteome of Aspergillus nidulans growing on sorghum stover. *Biotechnology for Biofuels*, *5*(1), 52. https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-52

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G. (1993). Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus Coniophora puteana (Schum ex Fr.) Karst. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *300*(2), 559-563. https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1077

Schmitz, K., Protzko, R., Zhang, L., and Benz, J. P. (2019). Spotlight on fungal pectin utilization—From phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(6), 2507-2524. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09622-4

Schultz, T. P., Boldin, W. D., Fisher, T. H., Nicholas, D. D., Mcmurtrey, K. D., and Pobanz, K. (1992). Structure-fungicidal properties of some 3- and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry*, *31*(11), 3801-3806. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97531-9

Schultz, T. P., and Nicholas, D. D. (2000). Naturally durable heartwood : Evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, *54*(1), 47-52. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00622-6

Schultz, T. P., and Nicholas, D. D. (2002). Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry*, *61*(5), 555-560. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00267-4

Schultz, T. P., Nicholas, D. D., and Preston, A. F. (2007). A brief review of the past, present and future of wood preservation. *Pest Management Science*, *63*(8), 784-788. https://doi.org/10.1002/ps.1386

Schwartz, M., Perrot, T., Aubert, E., Dumarçay, S., Favier, F., Gérardin, P., Morel-Rouhier, M., Mulliert, G., Saiag, F., Didierjean, C., and Gelhaye, E. (2018). Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot Trametes versicolor. *Scientific Reports*, *8*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26601-3

Seibert. (2016). *The Renaissance of Neurospora crassa : How a Classical Model System is Used for Applied Research | Semantic Scholar*.

Shertz, C. A., Bastidas, R. J., Li, W., Heitman, J., and Cardenas, M. E. (2010). Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. *BMC Genomics*, *11*(1), 510. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-510

Sjöström, E. (1993). Chapter 4—LIGNIN. In E. Sjöström (Éd.), *Wood Chemistry (Second Edition)* (p. 71-89). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092589-9.50008-5

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5705), 2206-2211. https://doi.org/10.1126/science.1102765

Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., and Dawson, J. H. (1996). Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews*, *96*(7), 2841-2888. https://doi.org/10.1021/cr9500500

Sordon, S., Popłoński, J., and Huszcza, E. (2016). Microbial Glycosylation of Flavonoids. *Polish Journal of Microbiology*, *65*(2), 137-151. https://doi.org/10.5604/17331331.1204473

Stergiopoulos, I., Zwiers, L.-H., and De Waard, M. A. (2002). Secretion of Natural and Synthetic Toxic Compounds from Filamentous Fungi by Membrane Transporters of the ATP-binding Cassette and Major Facilitator Superfamily. *European Journal of Plant Pathology*, *108*(7), 719-734. https://doi.org/10.1023/A:1020604716500

Sternberg, D., and Mandels, G. R. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in Trichoderma reesei by sophorose. *Journal of Bacteriology*, *139*(3), 761-769.

Stewart, P., Gaskell, J., and Cullen, D. (2000). A homokaryotic derivative of a Phanerochaete chrysosporium strain and its use in genomic analysis of repetitive elements. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(4), 1629-1633. https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1629-1633.2000

Stracka, D., Jozefczuk, S., Rudroff, F., Sauer, U., and Hall, M. N. (2014). Nitrogen source activates TOR (target of rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(36), 25010-25020. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574335

Stricker, A. R., Grosstessner-Hain, K., Würleitner, E., and Mach, R. L. (2006). Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in Hypocrea jecorina. *Eukaryotic Cell*, *5*(12), 2128-2137. https://doi.org/10.1128/EC.00211-06

Sun, J., and Glass, N. L. (2011). Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in Neurospora crassa. *PloS One*, *6*(9), e25654. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025654

Sun, J., Tian, C., Diamond, S., and Glass, N. L. (2012). Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in Neurospora crassa. *Eukaryotic Cell*, *11*(4), 482-493. https://doi.org/10.1128/EC.05327-11

Sun, Y., Qian, Y., Zhang, J., Yao, C., Wang, Y., Liu, H., and Zhong, Y. (2022). Development of a novel expression platform for heterologous protein production via deleting the p53-like regulator Vib1 in Trichoderma reesei. *Enzyme and Microbial Technology*, *155*, 109993. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.109993

Suzuki, H., Igarashi, K., and Samejima, M. (2008). Real-time quantitative analysis of carbon catabolite derepression of cellulolytic genes expressed in the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(1), 99-106. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1539-6

Suzuki, H., Igarashi, K., and Samejima, M. (2010). Cellotriose and cellotetraose as inducers of the genes encoding cellobiohydrolases in the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(18), 6164-6170. https://doi.org/10.1128/AEM.00724-10

Suzuki, H., MacDonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., Henrissat, B., Wiebenga, A., vanKuyk, P. A., Barry, K., Lindquist, E., LaButti, K., Lapidus, A., Lucas, S., Coutinho, P., Gong, Y., Samejima, M., Mahadevan, R., Abou-Zaid, M., … Master, E. R. (2012). Comparative genomics of the white-rot fungi, Phanerochaete carnosa and P. chrysosporium, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. *BMC Genomics*, *13*(1), 444. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-444

Syed, K., Shale, K., Pagadala, N. S., and Tuszynski, J. (2014). Systematic Identification and Evolutionary Analysis of Catalytically Versatile Cytochrome P450 Monooxygenase Families Enriched in Model Basidiomycete Fungi. *PLOS ONE*, *9*(1), e86683. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086683

Syed, K., and Yadav, J. S. (2012). P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *Critical Reviews in Microbiology*, *38*(4), 339-363. https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.682050

Takahama, U. (1995). Oxidation of hydroxycinnamic acid and hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase. Interactions among p-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiologia Plantarum*, *93*(1), 61-68. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1995.930110.x

Tamura, K., Ohbayashi, N., Maruta, Y., Kanno, E., Itoh, T., and Fukuda, M. (2009). Varp Is a Novel Rab32/38-binding Protein That Regulates Tyrp1 Trafficking in Melanocytes. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(12), 2900-2908. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1161

Tani, S., Kawaguchi, T., and Kobayashi, T. (2014). Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(11), 4829-4837. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5707-6

Teeri, T., and Henriksson, G. (2009). 11. Enzymes Degrading Wood Components. In *11. Enzymes Degrading Wood Components* (p. 245-272). De Gruyter. https://doi.org/10.1515/9783110213409.245

Thuillier, A., Ngadin, A. A., Thion, C., Billard, P., Jacquot, J.-P., Gelhaye, E., and Morel, M. (2011). Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. *International Journal of Evolutionary Biology*, *2011*, 938308. https://doi.org/10.4061/2011/938308

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

Tian, C., Beeson, W. T., Iavarone, A. T., Sun, J., Marletta, M. A., Cate, J. H. D., and Glass, N. L. (2009). Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus Neurospora crassa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(52), 22157-22162. https://doi.org/10.1073/pnas.0906810106

Tien, M., and Kirk, T. K. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds. *Science (New York, N.Y.)*, *221*(4611), 661-663. https://doi.org/10.1126/science.221.4611.661

Todd, R. B., Zhou, M., Ohm, R. A., Leeggangers, H. A., Visser, L., and de Vries, R. P. (2014). Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. *BMC Genomics*, *15*(1), 214. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-214

Tohge, T., and Fernie, A. R. (2017). An Overview of Compounds Derived from the Shikimate and Phenylpropanoid Pathways and Their Medicinal Importance. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *17*(12), 1013-1027. https://doi.org/10.2174/1389557516666160624123425

Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., and Fernie, A. R. (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 62. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00062

Townsend, T. G., and Solo-Gabriele, H. (Éds.). (2006). Nonarsenical Wood Protection : Alternatives for Chromated Copper Arsenate, Creosote and Pentachlorophenol*. In *Environmental Impacts of Treated Wood*. CRC Press.

Uhl, M. A., Biery, M., Craig, N., and Johnson, A. D. (2003). Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen C.albicans. *The EMBO Journal*, *22*(11), 2668-2678. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg256

Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, *31*(3), 113-123. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.01.002

van den Brink, J., and de Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(6), 1477-1492. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2

Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martinez, D., and Cullen, D. (2009). Transcriptome and secretome analyses of Phanerochaete chrysosporium reveal complex patterns of gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(12), 4058-4068. https://doi.org/10.1128/AEM.00314-09

Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S. D., Blanchette, R. A., Martinez, D., Grigoriev, I., Kersten, P. J., and Cullen, D. (2010). Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi Postia placenta and Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(11), 3599-3610. https://doi.org/10.1128/AEM.00058-10

van Peij, N. N., Visser, J., and de Graaff, L. H. (1998). Isolation and analysis of xlnR, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in Aspergillus niger. *Molecular Microbiology*, *27*(1), 131-142. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00666.x

Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. (2011). Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(4), 444-450. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.022

Vignols, F., Bréhélin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., and Meyer, Y. (2005). A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(46), 16729-16734. https://doi.org/10.1073/pnas.0506880102

Vlasenko, E., Schülein, M., Cherry, J., and Xu, F. (2010). Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. *Bioresource Technology*, *101*(7), 2405-2411. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.057

Voda, K., Boh, B., and Vrtacnik, M. (2004). A quantitative structure-antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. *Journal of Molecular Modeling*, *10*(1), 76-84. https://doi.org/10.1007/s00894-003-0174-5

Volc, J., Kubátová, E., Daniel, G., and Prikrylová, V. (1996). Only C-2 specific glucose oxidase activity is expressed in ligninolytic cultures of the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *Archives of Microbiology*, *165*(6), 421-424. https://doi.org/10.1007/s002030050348

Vonk, P. J., and Ohm, R. (2021). *Targeted gene knock-in reduces variation between transformants in the mushroom-forming fungus Schizophyllum commun*. https://doi.org/10.12688/openreseurope.14262.1

Vu, V. V., Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D., and Marletta, M. A. (2014). Determinants of Regioselective Hydroxylation in the Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(2), 562-565. https://doi.org/10.1021/ja409384b

Walters, D., Raynor, L., Mitchell, A., Walker, R., and Walker, K. (2004). Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia*, *157*(1), 87-90. https://doi.org/10.1023/b:myco.0000012222.68156.2c

Wang, J., Ohno, H., Ide, Y., Ichinose, H., Mori, T., Kawagishi, H., and Hirai, H. (2019). Identification of the cytochrome P450 involved in the degradation of neonicotinoid insecticide acetamiprid in Phanerochaete chrysosporium. *Journal of Hazardous Materials*, *371*, 494-498. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.042

Wariishi, H., Akileswaran, L., and Gold, M. H. (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium : Spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry*, *27*(14), 5365-5370. https://doi.org/10.1021/bi00414a061

Wariishi, H., and Gold, M. H. (1989). Lignin peroxidase compound III. *FEBS Letters*, *243*(2), 165-168. https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80122-X

Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Kinetic mechanism and role of chelators. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(33), 23688-23695.

Whittaker, M. M., Kersten, P. J., Nakamura, N., Sanders-Loehr, J., Schweizer, E. S., and Whittaker, J. W. (1996). Glyoxal Oxidase from Phanerochaete chrysosporium Is a New Radical-Copper Oxidase (∗). *Journal of Biological Chemistry*, *271*(2), 681-687. https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.681

Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J. P. (2001). Pectin : Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, *47*(1-2), 9-27.

Wong, D. (2008). Enzymatic Deconstruction of Backbone Structures of the Ramified Regions in Pectins. *The Protein Journal*, *27*(1), 30-42. https://doi.org/10.1007/s10930-007-9105-0

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

Woźniak, M. (2022). Antifungal Agents in Wood Protection-A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(19), 6392. https://doi.org/10.3390/molecules27196392

Wu, C.-C., Wu, C.-L., Huang, S.-L., and Chang, H.-T. (2012). Antifungal activity of Liriodenine from Michelia formosana heartwood against wood-rotting fungi. *Wood Science and Technology*, *46*(4), 737-747. https://doi.org/10.1007/s00226-011-0428-9

Wu, V. W., Thieme, N., Huberman, L. B., Dietschmann, A., Kowbel, D. J., Lee, J., Calhoun, S., Singan, V. R., Lipzen, A., Xiong, Y., Monti, R., Blow, M. J., O'Malley, R. C., Grigoriev, I. V., Benz, J. P., and Glass, N. L. (2020). The regulatory and transcriptional landscape associated with carbon utilization in a filamentous fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(11), 6003-6013. https://doi.org/10.1073/pnas.1915611117

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, *124*(3), 471-484. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016

Wymelenberg, A. V., Minges, P., Sabat, G., Martinez, D., Aerts, A., Salamov, A., Grigoriev, I., Shapiro, H., Putnam, N., Belinky, P., Dosoretz, C., Gaskell, J., Kersten, P., and Cullen, D. (2006). Computational analysis of the Phanerochaete chrysosporium v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genetics and Biology*, *43*(5), 343-356. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.01.003

Yang, L. N., He, M. H., Ouyang, H. B., Zhu, W., Pan, Z. C., Sui, Q. J., ... and Zhan, J. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus Alternaria alternata to fungicides with different modes of action. *BMC microbiology*, *19*, 1-10.

Yen, T.-B., Chang, H.-T., Hsieh, C.-C., and Chang, S.-T. (2008). Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from Calocedrus macrolepis var. Formosana (Florin) heartwood. *Bioresource Technology*, *99*(11), 4871-4877. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.037

Yoav, S., Salame, T. M., Feldman, D., Levinson, D., Ioelovich, M., Morag, E., Yarden, O., Bayer, E. A., and Hadar, Y. (2018). Effects of cre1 modification in the white-rot fungus Pleurotus ostreatus PC9 : Altering substrate preference during biological pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 212. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1209-6

Zálešák, F., Bon, D. J.-Y. D., and Pospíšil, J. (2019). Lignans and Neolignans : Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacological Research*, *146*, 104284. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284

Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B. M., Divne, C., Nicholls, P., and Haltrich, D. (2006). Cellobiose dehydrogenase—A flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotropic fungi. *Current Protein and Peptide Science*, *7*(3), 255-280. https://doi.org/10.2174/138920306777452367

Zannini, F., Couturier, J., Keech, O., and Rouhier, N. (2017). In Vitro Alkylation Methods for Assessing the Protein Redox State. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1653*, 51-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7225-8_4

Zhan, J., and Leslie Gunatilaka, A. A. (2006). Selective 4′-O-methylglycosylation of the pentahydroxy-flavonoid quercetin by Beauveria bassiana ATCC 7159. *Biocatalysis and Biotransformation*, *24*(5), 396-399. https://doi.org/10.1080/10242420600792169

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., and Xu, J.-R. (2013). Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, *14*(1), 274. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-274

Znameroski, E. A., Coradetti, S. T., Roche, C. M., Tsai, J. C., Iavarone, A. T., Cate, J. H. D., and Glass, N. L. (2012). Induction of lignocellulose-degrading enzymes in Neurospora crassa by cellodextrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(16), 6012-6017. https://doi.org/10.1073/pnas.1118440109

Znameroski, E. A., and Glass, N. L. (2013). Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 6. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-6

Znameroski, E. A., Li, X., Tsai, J. C., Galazka, J. M., Glass, N. L., and Cate, J. H. D. (2014). Evidence for transceptor function of cellodextrin transporters in Neurospora crassa. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(5), 2610-2619. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533273

Zuccaro, A., Lahrmann, U., Güldener, U., Langen, G., Pfiffi, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F., and Kogel, K.-H. (2011). Endophytic Life Strategies Decoded by Genome and Transcriptome Analyses of the Mutualistic Root Symbiont Piriformospora indica. *PLOS Pathogens*, *7*(10), e1002290. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002290

Zwiers, L.-H., Stergiopoulos, I., Gielkens, M. M. C., Goodall, S. D., and De Waard, M. A. (2003). ABC transporters of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, *269*(4), 499-507. https://doi.org/10.1007/s00438-003-0855-x

Résumé :

Parmi les Basidiomycètes, certains champignons sont spécialisés dans la dégradation du bois. La dégradation du bois par ces champignons conduit à la libération de molécules, appelées extractibles, dont certaines possèdent des propriétés antifongiques. Pour se développer en présence de ces molécules, les champignons dégradeurs de bois ont mis en place des systèmes de détoxication. La majorité des connaissances acquises sur ces mécanismes se restreint au fonctionnement général du Xénome. Cette limitation est principalement dû à un manque d'outils génétiques disponibles chez les Basidiomycètes, dont le champignon dégradeur de bois modèle *Phanerochaete chrysosporium*. Pour contourner cet obstacle, des collections de mutants résistants à des molécules antifongiques ont été produites chez *P. chrysosporium*. Ces mutants ont été générés par exposition aux UV et ont été sélectionnés sur leur phénotype de résistance à ces composés. La stratégie a été établie avec une toxine, la rapamycine, comme preuve de concept et expérimentée avec des extractibles de bois antifongiques. La caractérisation des mutants résistants à la rapamycine a permis d'identifier le mécanisme d'action de cette toxine chez *P. chrysosporium*. Cette molécule inhibe l'activité de la protéine kinase TOR, enzyme impliquée dans une voie de signalisation contrôlant la croissance chez les eucaryotes. La caractérisation des mutants résistants aux extractibles de bois de *Bagassa guianensis* a permis de démontrer que la résistance aux extractibles d'un bois confère un avantage au champignon pour le minéraliser. Cette caractérisation a mis en évidence un lien de causalité entre une mutation dans le gène codant une protéine DENND6 et le phénotype de résistance acquis par les mutants. La capacité de ces mutants à résister à des molécules antifongiques et à dégrader des molécules aromatiques complexes pourrait ainsi offrir de nouveaux outils biologiques dans le domaine de la bioremédiation.

Mots clés : Champignons dégradeurs de bois – *Phanerochaete chrysosporium* – stratégie de génétique directe – molécules antifongiques – extractibles de bois – rapamycine.

Summary :

Among the Basidiomycetes, some fungi are specialized in the degradation of wood. The degradation of wood by these fungi leads to the release of molecules, called extractives, some of which have antifungal properties. To grow in the presence of these molecules, wood-degrading fungi possess detoxification systems. Most of the knowledge acquired on these mechanisms is limited to the general functioning of the Xenome. This limitation is mainly due to a lack of genetic tools available in Basidiomycetes, including the model wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. To overcome this limit, collections of mutants resistant to antifungal molecules were produced in *P. chrysosporium*. These mutants were generated by exposure to UV and were selected on their resistance phenotype to these compounds. The strategy was established with a toxin, rapamycin, as proof of concept and tested with antifungal wood extractives. The characterization of rapamycin resistant mutants allowed to identify the mechanism of action of this toxin in *P. chrysosporium*. This molecule inhibits the activity of the TOR protein kinase, an enzyme involved in a signalling pathway controlling growth in eukaryotes. The characterization of mutants resistant to *Bagassa guianensis* wood extractives demonstrated that resistance to wood extractives confers an advantage to the fungus to mineralize it. This characterization revealed a causal link between a mutation in the gene coding for a DENND6 protein and the resistance phenotype acquired by the mutants. The ability of these mutants to resist to antifungal molecules and degrade complex aromatic molecules could offer new biological tools for bioremediation.

Key words : Wood-degrading fungi – *Phanerochaete chrysosporium* – forward genetic strategy – antifungal molecules – wood extractives – rapamycin.