



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Thèse
pour l'obtention du titre de

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

présentée et soutenue publiquement par

Edgar MEUX
Le 7 décembre 2012

**Caractérisation structurale et enzymatique, cibles potentielles
et rôles physiologiques de glutathion transférase
à cystéine catalytique de *Phanerochaete chrysosporium***

JURY :

Pascal REY, Ingénieur-Chercheur, CEA Cadarache

Rapporteur

Pierre FRENDON, Professeur, Université Nice Sophia Antipolis

Rapporteur

Frédéric BOURGAUD, Professeur, Université de Lorraine

Examineur

Jean-Philippe REICHHELD, Directeur de Recherche, CNRS Perpignan

Examineur

Mélanie MOREL, Maître de Conférences, Université de Lorraine

Co-directeur de thèse

Eric GELHAYE, Professeur, Université de Lorraine

Co-directeur de thèse

Résumé : *Phanerochaete chrysosporium* est un champignon modèle étudié en particulier pour ses capacités ligninolytiques et son aptitude à dégrader un grand nombre de polymères aromatiques toxiques dérivés notamment des hydrocarbures polycycliques. Durant ces processus de dégradation, une multitude de composés hautement réactifs et toxiques pour les cellules vont dans un premier temps être générés puis dégradés ou excrétés hors de la cellule. Le séquençage complet du génome de *P. chrysosporium* a permis d'identifier plusieurs superfamilles d'enzymes impliquées dans les mécanismes de tolérance à ces composés toxiques. Parmi elles, les glutathion transférases sont présentes au sein de tous les règnes du vivant et constituent une superfamille multigénique jouant un rôle dans la protection cellulaire et la détoxification. Cependant, en dépit de nombreuses études réalisées en particulier chez les vertébrés, le rôle joué par ces enzymes dans la détoxification des dérivés aromatiques toxiques est encore inconnu chez les basidiomycètes. L'analyse comparative des séquences de GST présentes au sein des différents règnes du vivant révèle que les GST fongiques ont évolué différemment de leurs orthologues, notamment via l'extension de sous-classes très peu représentées chez les vertébrés. Parmi elles, les GST à cystéine catalytique représentent 30 % de cette superfamille d'enzymes chez *P. chrysosporium*. Trois isoformes fongiques ainsi qu'une protéine orthologue exprimée chez une bactérie lignivore ont été caractérisées *in vitro* tant au niveau biochimique que structural. Ces enzymes sont impliquées dans la déglutathionylation d'une grande variété de molécules électrophiles potentiellement toxiques et issues notamment de la dégradation de polymères aromatiques halogénés. La recherche de substrats a permis d'identifier plusieurs classes fonctionnelles. Cependant, l'activité des différentes isoformes s'effectue dans tous les cas via l'attaque directe du conjugué glutathionylé par la cystéine catalytique, qui est dans un deuxième temps régénérée par un réducteur. L'analyse comparée prouve également l'existence d'une nouvelle classe structurale et fonctionnelle appelée glutathionyl hydroquinone réductase absente chez les vertébrés. Ces protéines présentent un mode de dimérisation original ainsi que la capacité tout à fait particulière de déglutathioniler les quinones. Ces résultats suggèrent que les champignons ont développé des mécanismes de résistance en réponse à des contraintes environnementales, notamment via l'évolution de familles multigéniques telles que les GST à cystéine catalytique qui sont impliquées dans le métabolisme et la tolérance vis-à-vis d'une grande variété de composés d'origine exogène ou endogène.

Mots clés : *Phanerochaete chrysosporium*, famille multigénique, évolution, Glutathion transférases, cystéine, hydroquinone, détoxification

Abstract: *Phanerochaete chrysosporium* is a model fungus well studied for its lignolytic properties towards wood compounds and various toxic aromatic derivatives such as polycyclic aromatic hydrocarbons. These degradation processes lead first to the formation of highly reactive and toxic compounds, which are then catabolized or excreted outside the cell. Genomic data allowed the identification of genes coding for superfamilies of enzymes putatively involved in these tolerance mechanisms. Among them, glutathione transferases are present in all kingdoms and constitute a multigenic superfamily of enzymes involved in cell protection and detoxification. However, although numerous studies have been performed on vertebrate enzymes, the role of these enzymes in the detoxification of toxic aromatic compounds is still unknown in basidiomycetes. The comparative analysis of GST sequences from various kingdoms of life reveals that fungal GSTs have evolved differently from their orthologs, in particular through the expansion of sub-classes poorly represented in vertebrates. Among them, GSTs with a catalytic cysteine represent 30% of this superfamily of enzymes in *P. chrysosporium*. Three Cys containing fungal isoforms have been characterized at the biochemical and structural levels, including an orthologue from lignolytic bacteria. All these enzymes are involved in deglutathionylation processes using a wide range of aromatic halogenated electrophilic compounds, including potentially toxic derivatives arising from the degradation of halogenated aromatic polymers. This GSTs family can be organized in various functional groups based on their substrate specificities, but still the catalytic process remains the same with the direct attack of the glutathionylated compound by the catalytic cysteine which is then reduced and regenerated. The comparative analysis of three isoforms revealed a new structural and functional class called glutathionyl hydroquinone reductase absent in vertebrates. These proteins exhibit a new mode of dimerization as well as the ability to deglutathionylate quinones. These results suggest that fungi have developed resistance mechanisms in response to environmental stresses, notably through the evolution of multigenic families such as catalytic cysteine bearing GSTs which are likely involved in the metabolism and tolerance towards a wide range of exogenous or endogenous compounds.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*, multigenic family, Glutathione transferases, evolution, cysteine, hydroquinone, detoxification

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement les membres du jury, Pierre Frendo, Pascal Rey, Jean-Phillippe Reichheld et Frédéric Bourgaud pour avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. Pour leur aide indispensable dans différentes parties techniques de ce travail, j'adresse également un très grand merci aux personnes ayant collaboré avec moi au cours de ces trois dernières années, les Docteurs Stéphane Dumarcay, Claude Didierjean, Frédérique Favier, Philippe Gérardin, Gary Foster et Andy Bailey. Merci également à François Dupire pour sa disponibilité et son intérêt sincère envers mes travaux.

Mes plus grands remerciements sont adressés à mes deux directeurs de thèse géniaux, Mélanie Morel et Eric Gelhaye pour la confiance et la très grande autonomie qu'ils m'ont accordées depuis le commencement de ces travaux. Merci à vous deux pour m'avoir laissé la liberté de développer mes propres axes de recherche tout en m'apportant de nombreux conseils précieux ainsi que des ressources illimitées (enfin presque). Merci également pour votre réactivité et votre soutien durant cette période délicate de fin thèse. Le professionnalisme et la rigueur dont vous faites preuve au quotidien, n'ont d'égal que votre bonne humeur et votre disponibilité dont, croyez-moi, je mesure la rareté et que j'espère retrouver dans ma vie future. Sans oublier bien sûr votre don pour organiser des BBQ plus mémorables les uns que les autres. J'espère sincèrement m'être montré à la hauteur de vos attentes.

Sur un registre plus personnel, j'adresse un remerciement particulier aux Professeurs Nicolas Rouhier et Jean-Pierre Jacquot. En effet, quand on rencontre des personnes consciencieuses qui exercent leur métier avec conviction et ardeur, il convient de leur rendre hommage. Nico, il y a beaucoup trop de choses à dire ici. Tout simplement, merci pour m'avoir donné ma chance, sans toi cette thèse n'aurait certainement pas eu lieu. Cela a été un honneur pour moi de travailler à tes côtés depuis mes premiers pas au labo il y a maintenant plus de six ans. Merci infiniment pour ta sincère amitié, ta passion, ta culture de la gagne, et ta malchance au tarot. Jean-Pierre, merci pour ton amitié, tes conseils, tes blagues douteuses, ta disponibilité, ton amour de la pétanque tout terrain, tes goûts musicaux et ton amour du verbe qui ont contribué à rendre ces six dernières années inoubliables.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues et amis membres de l'unité que j'ai côtoyés ces dernières années : Arnaud, Kamel, Jérémy, Tiphaine, Yann, Anne, Henri, Ben (Timal), Andrew, ou encore Filipe. Mention particulière pour mon pote Benjamin, sans qui ces trois dernières années n'auraient certainement pas la même saveur. Benjy (pour les intimes), je regretterai

entre autres tous nos fous rires, nos séances de culture physique, nos soirées jeux, ou encore nos embuscades organisées à l'encontre des petits stagiaires. Merci également à PA pour son humour, sa gentillesse, sa voix juste, ses connaissances en aquariophilie, et son aide très précieuse durant cette période de fin de thèse.

J'adresse un immense merci aux membres de ma famille, agrandie par la vie, qui par leur soutien permanent m'auront permis de faire des études dans d'excellentes conditions.

Mes derniers mots sont pour Céline qui m'accompagne et me soutient quotidiennement depuis plus de huit ans. Même si ces dernières semaines, j'ai passé plus de temps avec mon manuscrit de thèse qu'avec toi, je sais que tu ne m'en tiens pas rigueur et je t'en remercie. Pour m'avoir épaulé et encouragé depuis le début, mais également pour tout ce que tu m'apportes dans la vie de tous les jours, je te dédie cette thèse.

ADN, Acide désoxyribonucléique

ADNc, ADN complémentaire

ARN, Acide ribonucléique

CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzène

CNV, Copy number variation

CytP450, Cytochrome P450 monooxygénase

DHA/MDHA,
Déhydroascorbate/Monodéhydroascorbate

DHAR, Déhydroascorbate réductase

dNTP, Désoxyribonucléotide triphosphate

Dsb, Disulfide bond protein

DTT, Dithiothréitol

GHR, Glutathionyl hydroquinone réductase

GR, Glutathion réductase NADPH-dépendante

Grx, Glutarédoxine

GSH/GSSG, Glutathion réduit et glutathion
disulfure

GST, Glutathion transférase

GSTFuA, GST fungal specific class A

GSTL, GST Lambda

GSTO, GST Oméga

HAP, Hydrocarbure polycyclique aromatique

HED, Hydroxyéthyl disulfide

HNE, 4-hydroxy-2-nonenal

HPLC, High-performance liquid chromatography

JGI, Joint Genome Institute

k_{cat}, Constante catalytique

kDa, Kilodalton

K_m, Constante d'affinité apparente de Michaelis-
Menten

mGST, GST microsomale

MAPEG, Membrane associated proteins in
eicosanoid and glutathione metabolism

PCR, Polymerase chain reaction

PDI, Protéine disulfure isomérase

pI, Point isoélectrique

pK_a, Constante d'équilibre

Site G/H, Site de reconnaissance du
glutathion/substrat

TCHQD, Tetrachloro hydroquinone déhalogénase

Trx, Thiorédoxine

WT, Wild type

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	14
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1. Implication des familles multigéniques au cours des processus évolutifs	20
1.1 Généralités sur les familles multigéniques	20
1.2 Duplication de gènes et émergence de nouvelles fonctions	22
1.3 Mécanismes de génération des gènes dupliqués	24
1.3.1 La recombinaison homologue non allélique	24
1.3.2 La rétrotransposition	25
1.3.3 La duplication complète du génome	26
1.4 Destins évolutifs des gènes dupliqués	27
1.4.1 Non-fonctionnalisation	28
1.4.2 Conservation de la fonction	29
1.4.3 Néo-fonctionnalisation	30
1.4.4 Sous-fonctionnalisation	32
1.5 Expansion des familles multigéniques et adaptations à l'environnement	34
2. Article 1: Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi	40
3. Les glutathion transférases	59
3.1 Historique et classification	59
3.2 Les GST cytosoliques	60
3.2.1 Organisation tridimensionnelle	61
3.2.2 Fonctions des GST cytosoliques	63
3.2.2.1- Transfert de glutathion et détoxication	63
3.2.2.2- L'exemple de la tolérance aux herbicides, insecticides et autres agents toxiques	64
3.2.2.3- Protection contre le stress oxydant	65
3.2.2.4- Réactions d'isomérisation	67
3.2.2.5- Liaison de ligands	68
3.2.2.6- Activité réductase glutathion dépendante	69
3.3 Evolution des GST	71
3.3.1 Evolution des GST à partir d'un ancêtre commun thiorédoxine	71
3.3.2 Evolution et diversification des GST cytosoliques	74
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	78
1. Variabilité des GST au sein du règne fongique	80
1.1 La classe des GSTFuA	80
1.2 La classe des Ure2p	81
1.3 Les classes à cystéine catalytique	82
2. Objectifs et champs d'investigation	84

RESULTATS	88
Article 2: Glutathione transferases of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> : a S-glutathionyl-p-hydroquinone reductases belongs to a new structural class	90
Article 3: Reduction of S-(glutathionyl)-benzoquinone by Glutathione hydroquinone reductases	108
Article 4: <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase Omega class	124
Article 5: New substrates and activity of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Omega Glutathione transferases	138
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	 154
1. Caractéristiques phylogéniques, mécanistiques et structurales des GST à cystéine catalytique de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	158
1.1 Prévalence des GST à cystéine catalytique chez les basidiomycètes et mise en évidence d'une nouvelle classe fongique	158
1.2 Propriétés mécanistiques et structurales des GST à cystéine catalytique de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	160
1.2.1 Adaptation du modèle de Frova	161
1.2.2 Relation structure-fonction et émergence d'une nouvelle fonction	162
2. Fonctions associées aux GST à cystéine catalytique dans la protection cellulaire	166
2.1 Glutathionylation et toxicité	166
2.2 Promiscuité des GST à cystéine catalytique, déglutathionylation et protection cellulaire	167
2.3 Pertinence biologique	170
3. Evolution adaptative et familles multigéniques	173
3.1 Perspectives à court terme	173
3.1.1 Définir les particularités structurales et fonctionnelles des différentes classes de GSTO	173
3.1.2 Identifier les substrats physiologiques des GST Oméga	174
3.1.3 Identifier les fonctions physiologiques des GST à cystéine catalytique	175
3.1 Perspectives à long terme	176
 REFERENCES	 180
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	204

INTRODUCTION

L'organisation des génomes actuels est le résultat de l'accumulation d'événements qui se sont produits dans le passé, au cours de l'évolution. Au sein des organismes, la majorité des gènes font partie de familles multigéniques de tailles variables. Dans l'état actuel des connaissances, l'existence de ces familles, caractérisées par des degrés variables d'identité entre les différents gènes qui les composent, résulte principalement d'événements de duplication et de divergence à partir d'un gène ancestral. Ces événements, considérés depuis les années 1970 comme moteur de l'évolution, ont entraîné une expansion des génomes, induisant notamment une augmentation du nombre d'enzymes métaboliques (Ohno 1970; Lynch and Conery 2000). La plasticité des génomes semble jouer un rôle primordial dans l'adaptation des organismes face à leur environnement, ainsi que dans le processus de spéciation, permettant par exemple l'utilisation de nouvelles sources de nutriments et d'énergie. L'évolution des familles d'enzymes est aussi à l'origine de l'adaptation de différents organismes face à l'introduction de composés anthropogéniques dans l'environnement (antibiotiques, pesticides, colorants, explosifs, etc). Parmi ces familles de gène, les glutathion transférases (GST) sont des enzymes multifonctionnelles présentes au sein de tous les règnes du vivant, dont les membres sont répartis en fonction de leur homologie de séquence peptidique en différentes classes. Aujourd'hui l'hypothèse couramment admise est que les GST ont évolué à partir d'un ancêtre commun de type thiorédoxine ou glutarédoxine. Le nombre de gènes codant pour les GST est très variable en fonction des espèces (17 chez *Homo sapiens*, 36 chez *Drosophila melanogaster*, 48 chez *Arabidopsis thaliana*). De plus la variabilité des GST se caractérise également par l'existence de différentes classes ubiquitaires ou présentes spécifiquement dans certains règnes. Cependant, les gènes codant les GST sont majoritairement regroupés en clusters au sein des génomes, suggérant des mécanismes évolutifs communs ayant conduit à une extension et à une variabilité de cette famille d'enzymes. Les glutathion transférases interviennent notamment dans la détoxification de composés nocifs d'origine exogène ou endogène que l'on appelle xénobiotiques ou endobiotiques (Bolton et al. 2000; Hayes et al. 2005). Ces enzymes catalysent classiquement l'attaque nucléophile d'une molécule de glutathion sur un composé électrophile, ce dernier pouvant ainsi être reconnu par des transporteurs spécifiques et internalisé dans la vacuole ou sécrété (DeRidder et al. 2002). Ces protéines sont bimodulaires, constituées d'un site de fixation et d'activation du glutathion (site G) relativement conservé, ainsi que d'un site de reconnaissance du substrat (site H) de nature très variable (Sheehan et al. 2001). Considérant l'ensemble des classes de GST, la variabilité du site H permet la prise en charge d'un grand nombre de molécules. En particulier, certaines GST sont impliquées à différents niveaux dans la

résistance face aux stress via des activités de type (i) glutathion transférase, (ii) peroxydase, (iii) thiol transférase, (iv) réductase glutathion dépendante. Elles jouent également un rôle dans la détoxification de métaux tels que le cadmium (Adamis et al. 2004), ou encore dans le métabolisme du 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) lui-même impliqué dans la signalisation d'un stress oxydatif (Hayes et al. 2005). Le séquençage des génomes de nombreux organismes et la phylogénie a permis de recenser 27 séquences codantes de GST, divisées en 6 classes chez le basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* (GTT, Ure2p, Oméga, Etherase-like, EF1By et MAK16) (Morel et al. 2009). Très peu de données sont disponibles concernant les GST fongiques bien que leurs implications dans la réponse aux stress et dans les processus de biodégradation semblent évidentes. Néanmoins, plusieurs classes sont largement étendues chez les basidiomycètes en comparaison avec d'autres mammifères et champignons (Oméga, Ure2p, Etherase-like) probablement en lien avec la capacité spécifique de ces organismes à dégrader et cataboliser des composés aromatiques (Kersten and Cullen 2007; Morel et al. 2009).

Les champignons saprophytes présentent un intérêt écologique notoire grâce à leur capacité à dégrader des molécules complexes comme par exemple la lignine ou de nombreux polluants. Ces processus font intervenir des systèmes enzymatiques variés. L'objectif de cette thèse était d'identifier puis de caractériser à différents niveaux des protéines fongiques de la famille des glutathion transférases, potentiellement impliquées dans ces processus de dégradation. Les isoformes à cystéine catalytique présentant une forte redondance chez *P. chrysosporium* et au sein des organismes saprophytes en général ont été particulièrement étudiées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Implication des familles multigéniques au cours des processus évolutifs

Les modifications de la structure des chromosomes sont des éléments moteurs essentiels à l'évolution des génomes. Différents types d'événements ont été décrits comme étant à l'origine de cette variabilité génomique. Il peut s'agir de délétion, de duplication, ou d'insertion de transposon. Ces remaniements permettent une flexibilité génomique importante pour la cellule, pouvant conférer à l'organisme un avantage sélectif, et ainsi être impliqués dans l'adaptabilité d'un organisme à son environnement. Au cours des divisions cellulaires, un chromosome ou une partie de chromosome (gène) peut se dupliquer, aboutissant à la présence en double exemplaire d'un gène ou d'un segment de chromosome. Ce processus peut se produire plusieurs fois, et ainsi plusieurs copies d'un même gène peuvent se trouver dans un même organisme sur un ou plusieurs chromosomes. Ces copies peuvent ensuite subir et accumuler des changements appelés mutations au cours du temps, et l'ensemble de ces copies est appelé famille multigénique. L'existence de ces familles multigéniques, de taille variable est connue depuis longtemps (Dayhoff 1974). Il existe plusieurs devenir possibles pour les gènes existant en copie multiple. Sous l'influence de la sélection, la modification des copies peut mener à une diversification de la fonction du gène initial, mais aussi à l'émergence de fonctions totalement nouvelles (Clark 1994; Walsh 1995; Walsh 2003; Wapinski et al. 2007; Beisswanger and Stephan 2008; Conant and Wolfe 2008). A l'inverse, on peut aussi assister à une perte de fonction des copies conduisant à la formation de pseudogène (gène non fonctionnel), voir même à l'élimination des copies.

1.1 Généralités sur les familles multigéniques

Une famille multigénique est donc un ensemble de gènes ayant évolué à partir d'un gène ancestral commun suite à différents types d'événements ayant modifié la structure des chromosomes. Chez les mammifères, on estime à environ 12 000 le nombre de familles multigéniques, et environ 80% de ces familles auraient au moins un représentant chez l'humain. En supposant que le génome humain contienne 22 000 gènes, cela implique que plus d'un gène sur deux appartient à l'une de ces familles. Les familles multigéniques peuvent comporter des centaines de gènes ou à l'inverse moins d'une dizaine de copies et sont impliquées dans un très

grand nombre de processus biologiques. Ce processus a donc entraîné une expansion génomique résultant en une augmentation du nombre d'enzymes métaboliques, permettant notamment l'utilisation de nouvelles sources de nutriments ou d'énergie et l'adaptation à un nouvel environnement (Conant and Wolfe 2007; Lin and Li 2011; Floudas et al. 2012; Hittinger 2012). L'évolution des familles d'enzymes permet également l'adaptation de différents organismes face aux composés toxiques anthropogéniques ou naturels présents dans l'environnement (antibiotiques, pesticides, colorants, explosifs, etc) via l'expansion et la diversification d'enzymes impliquées dans les mécanismes de détoxification (Doddapaneni et al. 2005; Stajich et al. 2010; Cresnar and Petric 2011).

L'évolution des familles multigéniques découle de l'évolution des génomes, conséquence notamment d'évènements ponctuels appelés mutations. Il existe une grande variété de mutations affectant l'ADN à différentes échelles, allant de la simple paire de bases jusqu'à de longs segments chromosomiques. Les mutations les plus fréquentes sont les mutations ponctuelles, c'est-à-dire les mutations portant sur une seule paire de bases. Ainsi, une substitution remplaçant une paire de bases par une autre peut se produire. Une mutation ponctuelle peut aussi être une délétion ou une insertion de paire de bases. Les mutations peuvent également concerner des séquences de plus grande taille (insertion, délétion, duplication ou inversion de quelques dizaines de paire de bases à quelques mégabases) ou affecter la structure du génome (translocation entre chromosomes de paires différentes). Le taux de mutation varie d'une région à l'autre d'un génome et peut être influencé par plusieurs facteurs, comme la présence de séquences répétées ou de motifs sensibles à l'action de certaines enzymes (Lynch and Conery 2000; Bailey and Eichler 2006; Lupski 2007). Lorsqu'une mutation se produit et qu'elle est transmise à la descendance d'un organisme, il y a introduction d'un nouvel allèle (ou d'une variante structurale) au sein de la population. Sa fréquence fluctuera au fil des générations en fonction de son impact sur la viabilité de l'individu et de l'espèce. Souvent le nouvel allèle disparaîtra complètement, mais parfois il sera fixé dans la population puis éventuellement dans l'espèce. En l'absence de sélection (évolution neutre), le taux de fixation reflète le taux de mutation. En présence de sélection positive (ou adaptative), il se retrouve augmenté tandis qu'en présence de sélection négative (ou purificatrice), il se retrouve diminué.

1.2 Duplication de gènes et émergence de nouvelles fonctions

Depuis les années 1930, la duplication de gènes est considérée comme un des mécanismes principaux intervenant dans l'acquisition de nouveau matériel génétique et plus généralement dans l'adaptation évolutive des génomes (Stephens 1951; Nei 1969). L'hypothèse stipule qu'après une duplication de gène, les deux gènes dits paralogues sont identiques et ainsi, un des deux gènes est relâché de toute pression sélective lui permettant ensuite d'évoluer sans nuire au bon fonctionnement de la cellule. Quand un gène existe en plusieurs exemplaires, il se trouve affranchi des contraintes imposées par la sélection naturelle. Les mutations peuvent donc s'y accumuler plus ou moins librement et donner naissance à des structures nouvelles dont certaines peuvent, le cas échéant, remplir des fonctions nouvelles (Jacob 1996). En 1970, Ohno conclut que la duplication de gènes est le seul moyen par lequel l'apparition d'un nouveau gène peut survenir (Ohno 1970). Cependant ce n'est que dans les années 1990 avec l'émergence de la génomique comparative, que l'importance et la prévalence des phénomènes de duplication dans l'évolution adaptative des génomes furent démontrées (Goffeau et al. 1996). La duplication doit alors être considérée comme la « mutation principale » rendant possible l'accumulation de sous-mutations sur les duplicats. Il s'agit du mécanisme de l'évolution qui est à la base de la variabilité des populations.

Tableau 1. Prévalence des duplications au sein des trois domaines du vivant

	Nombre de gènes codants	Nombre de paralogues (pourcentage de gènes dupliqués)	Références
Bactérie			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	677	298 (44)	(Himmelreich et al. 1996)
<i>Helicobacter pylori</i>	1590	266 (17)	(Tomb et al. 1997)
<i>Haemophilus influenza</i>	1709	284 (17)	(Rubin et al. 2000)
<i>Escherichia coli</i>	4288	1345 (31)	(Blattner et al. 1997)
Archae			
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2436	719 (30)	(Klenk et al. 1997)
Eucaryote			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6241	2458 (40)	(Blandin et al. 2000)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	18424	8971 (49)	(Rubin et al. 2000)
<i>Drosophila melanogaster</i>	13601	5536 (41)	(Rubin et al. 2000)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	25498	16574 (65)	(Arabidopsis-Genome 2000)
<i>Homo sapiens</i>	40580	15343 (38)	(Li et al. 2001)

L'analyse des génomes montre que la majorité des organismes étudiés à ce jour présente une proportion importante de gènes dupliqués (Tableau 1). Schématiquement, au sein des trois domaines du vivant, environ un tiers des gènes sont issus d'un évènement de duplication, cependant il existe des exceptions et notamment chez les plantes comme *Arabidopsis thaliana* chez qui cette proportion dépasse les deux tiers. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, environ 40 % des gènes sont issus de duplications, et font partie de familles multigéniques pouvant être constituées de 2 à plus de 102 membres (Blandin et al. 2000). Cependant il est fort possible que ces proportions soient sous-estimées tant la divergence entre deux séquences dupliquées au cours de l'évolution peut être importante.

1.3 Mécanismes de génération des gènes dupliqués

L'apparition de nouveaux gènes et la mise en place de familles multigéniques s'expliquent principalement par la duplication de gènes préexistants, qui peut se produire de différentes manières. Ces phénomènes qualifiés de réarrangements chromosomiques impliquent des échanges de matériel génétique entre deux régions de l'ADN, le plus souvent par un mécanisme appelé recombinaison homologue (Feuk et al. 2006). Ces réarrangements génétiques peuvent également avoir lieu par rétrotransposition, transposition duplicative ou encore lors de la duplication complète du génome, conduisant pour chaque mécanisme à des résultats différents.

1.3.1 La recombinaison homologue non allélique

Au cours des processus méiotiques, mitotiques ou lors de la réparation de l'ADN, un événement appelé recombinaison homologue non allélique ou inégale (unequal crossing-over) impliquant deux locus différents peut survenir. Ce mésappariement nécessite la présence de deux répétitions segmentaires, d'une longueur suffisante (quelques centaines de paires de bases) qui sont alignées à la place des copies aux positions alléliques habituelles (Waldman and Liskay 1988; Pfeiffer et al. 2000). Au cours de cet événement, un enjambement chromosomique survient au sein d'une même chromatide (intrachromatide), entre deux chromatides sœurs (intra-chromosomique), ou encore deux chromosomes différents (inter-chromosomique) (Stankiewicz and Lupski 2002). Le résultat est habituellement une paire de gènes répétés en tandem et situés sur le même chromosome (Figure 1A), cependant la présence de répétitions segmentaires en orientation contraire induit l'inversion du fragment qu'elles encadrent (Pentao et al. 1992; Small et al. 1997; Ji et al. 2000; Shaffer and Lupski 2000). En fonction de la position de cet enjambement chromosomique au sein des molécules d'ADN, la région dupliquée peut contenir une partie de gène, un gène entier ou encore plusieurs gènes (Bailey et al. 2002; Bailey and Eichler 2006). Dans ces deux derniers cas, les introns, s'ils sont présents au sein des gènes originels sont également retrouvés au sein des gènes dupliqués (Lynch and Force 2000). La recombinaison homologue non allélique est certainement l'événement génétique intervenant le plus fréquemment dans la duplication de gènes. Chez les eucaryotes, le taux moyen de duplication génique est estimé à environ 0.01 par gène par million d'années, une valeur comparable au taux de mutations des nucléotides (Lynch and Conery 2000). Néanmoins, à certains endroits du génome, le taux de recombinaison homologue non allélique peut être

jusqu'à 10 000 fois plus important, influencé principalement par la présence de répétitions locales (Bailey and Eichler 2006; Lupski 2007). Les duplications augmentent donc les probabilités de recombinaison homologue non allélique, entraînant ainsi une amplification du phénomène.

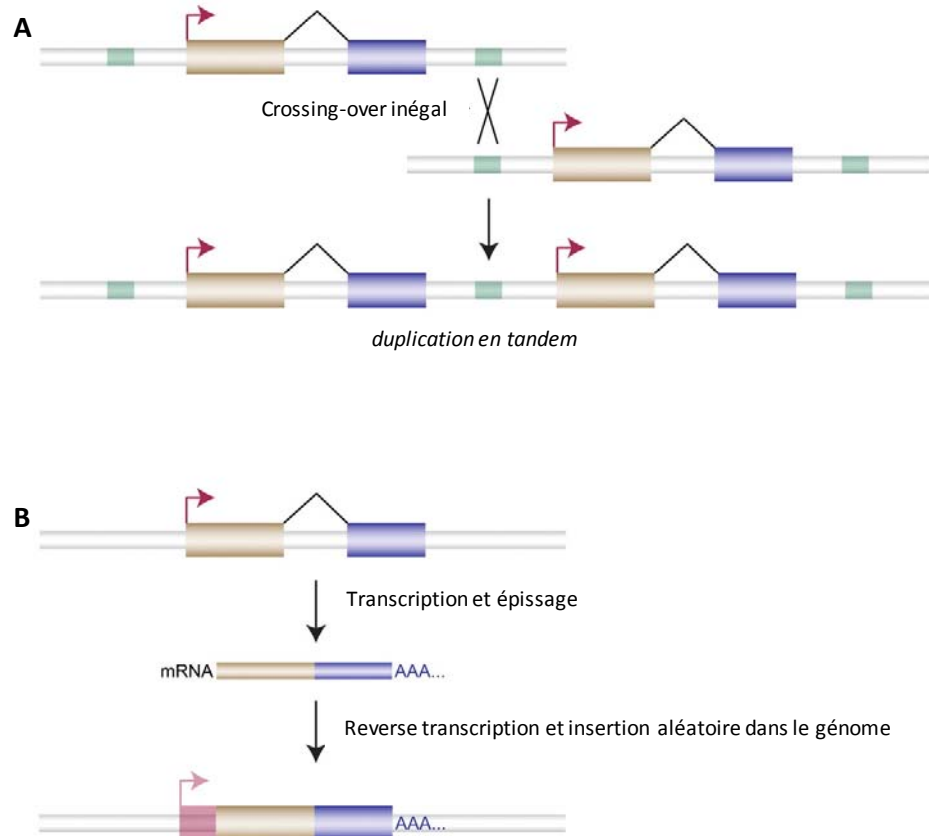


Figure 1. Modèles de duplication de gènes (A) par crossing-over inégal, ou (B) par rétrotransposition (Kaessmann 2010)

1.3.2 La rétrotransposition

Cette duplication est le résultat de la rétrotranscription d'un ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc) qui est ensuite inséré dans le génome. Chez les eucaryotes, le gène rétrotranscrit ne contient ni promoteur, ni intron mais possède une queue polyA (Rogers 1985; Vanin 1985). Contrairement à la recombinaison homologue ectopique, le résultat de cet événement est un gène qui n'est pas inséré à proximité du gène paralogue car l'insertion d'ADNc au sein du génome est plus ou moins aléatoire (Figure 1B). En d'autres termes, il est très rare de trouver des blocs de gènes dupliqués par rétrotransposition les uns à côté des autres. En

général, ce processus aboutit à un gène dupliqué mais non-fonctionnel, car seule la séquence codante est dupliquée. Cependant, dans certains cas, l'intégration peut se produire dans le sens adéquat, en aval d'un promoteur ou en aval d'un promoteur bidirectionnel (Awano et al. 2010; Tucker et al. 2010).

1.3.3 La duplication complète du génome

L'augmentation du nombre de copies d'un gène peut également survenir lors de la duplication complète du génome. Ce mécanisme a déjà été décrit chez les plantes, les animaux ou encore les champignons (Stebbins 1950; Otto and Whitton 2000; Maere et al. 2005; Jaillon et al. 2007; Wapinski et al. 2007; Ma et al. 2009). Cette forme de duplication de gène est probablement un des mécanismes évolutifs les plus importants puisqu'il engendre de la redondance à tous les gènes présents dans le génome. La duplication totale du génome peut d'ailleurs jouer un rôle important dans la spéciation chez divers groupes. L'analyse comparative de génomes de levures a mis en évidence l'existence d'évènements de duplication totale du génome au cours du processus évolutifs des ascomycètes (Wolfe and Shields 1997; Dujon et al. 2004; Kellis et al. 2004). Chez *S. cerevisiae*, lorsque 2 régions dupliquées présentent une forte syntonie, une seule région correspondante existe au sein du génome de *Kluyveromyces waltii*. Une duplication complète du génome de *S. cerevisiae* s'est produite il y a environ 100 millions d'années après la séparation des 2 espèces. Néanmoins, la plupart des signatures génomiques témoignant de cet évènement ont été altérées au cours de l'évolution suite à des remaniements chromosomiques. Par ailleurs, la plupart des gènes dupliqués ont disparu, la copie unique restante pouvant appartenir à l'un ou à l'autre des segments, mais préservant un ordre local des gènes identique à celui de *K. waltii*. Bien que ce phénomène chez les champignons soit à l'heure actuelle essentiellement illustré par l'exemple de la levure, il existe d'autres preuves indiquant que la duplication complète du génome a joué un rôle déterminant dans l'histoire évolutive des champignons, comme chez les plantes ou les animaux (Hansen 1978; Ramsey and Schemske 1998; Makalowski 2001; McLysaght et al. 2002; Dehal and Boore 2005; Tobiasson and Seifert 2006; Jaillon et al. 2007). Cependant même si la dynamique des génomes supprime au cours du temps les signatures chromosomiques de tels évènements, il est possible de mettre en évidence d'anciennes duplications génome entier si relativement peu de réarrangements sont survenus au cours de l'évolution (Aury et al. 2006).

1.4 Destins évolutifs des gènes dupliqués

L'apparition de gènes paralogues peut donc se faire par la duplication d'un seul gène, d'un segment composé de plusieurs gènes contigus, d'un chromosome entier ou encore d'un génome entier. Les duplications sont considérées comme moteur de l'évolution, même s'il existe alors deux gènes de séquence identique, et donc de fonction identique (redondance). Les paralogues ainsi formés peuvent ensuite évoluer de différentes manières. Une des deux copies ayant une valeur sélective neutre aura une probabilité très faible d'être retenue. Ceci suggère qu'une proportion importante de duplications va être rapidement perdue. En revanche, si la copie dupliquée est fixée, le gène peut suivre plusieurs scénarios évolutifs différents (Figure 2).

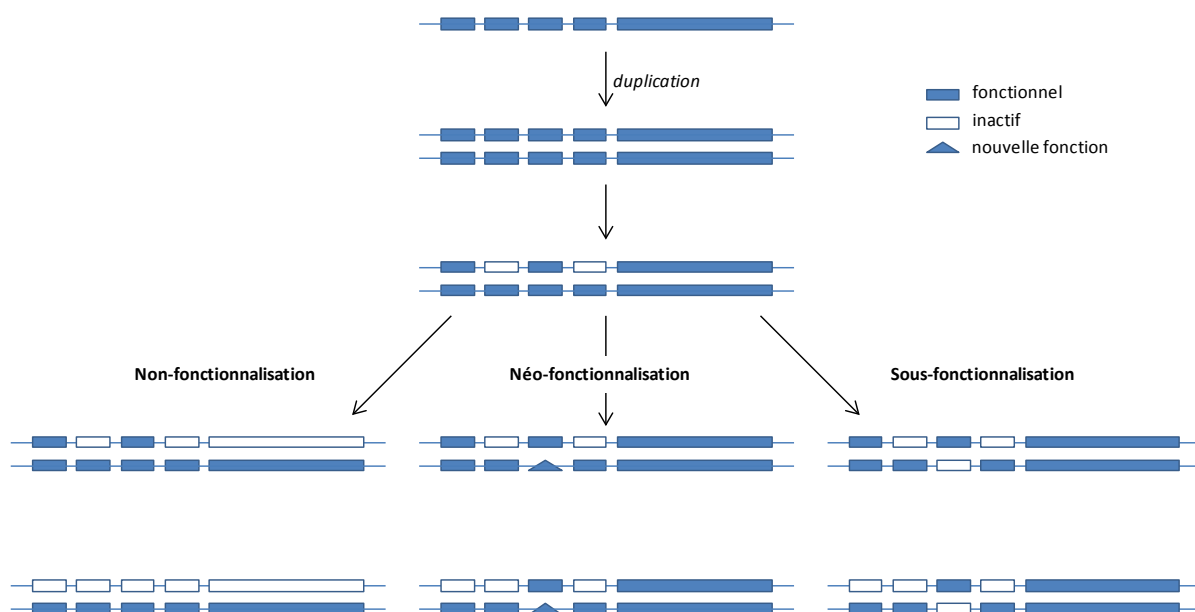


Figure 2. Evolution des gènes dupliqués au cours de l'évolution d'après Force et al. 1999

Au cours de l'évolution, l'accumulation de mutations aléatoires peut conduire à l'inactivation fonctionnelle des régions régulatrices (petit rectangle) ou du gène (rectangle allongé), aboutissant alors à la formation d'un pseudogène (non-fonctionnalisation). Dans le cas d'un processus de sous-fonctionnalisation, l'évolution a conduit à un partage de la fonction du gène initial entre les deux paralogues. La fonction initiale d'un gène est alors répartie dans les deux copies qui peuvent être fixées dans la population. Dans certains cas, les mutations aléatoires entraînent une modification fonctionnelle des produits des gènes aboutissant à de nouvelles fonctions, qui si elles confèrent un avantage à l'organisme, seront conservées ou fixées au cours de l'évolution.

1.4.1 Non-fonctionnalisation

La duplication de gène conduit à l'existence de deux copies identiques et fonctionnelles du gène, mais une seule est réellement utile au fonctionnement de l'organisme. La présence d'un paralogue est donc redondante. En d'autres termes, les mutations déstabilisant la structure et la fonction d'une des copies ne sont ni délétères, ni éliminées par la sélection. Progressivement, l'accumulation de mutations va alors entraîner la formation d'un pseudogène, c'est-à-dire d'une copie de gène qui n'est plus exprimée ou dont la protéine correspondante n'est plus fonctionnelle. De ce fait, le plus souvent, l'une des copies dégénérera en pseudogène par non-fonctionnalisation (Walsh 1995; Lynch et al. 2001). La présence de pseudogènes est également expliquée comme le résultat d'événements de rétrotransposition. En effet, ils n'ont généralement pas de séquences promotrices, et sont donc considérés comme inactifs. Il a été estimé qu'un pseudogène perd environ la moitié de son information génétique en 400 millions d'années (Graur et al. 1989). Ce taux de suppression lente assure que les génomes contiennent de nombreux pseudogènes qui peuvent être utilisés pour étudier leur évolution. Cependant, bien que les pseudogènes soient supposés avoir perdu les fonctions originales de leurs gènes parents, des études récentes indiquent qu'ils pourraient avoir des fonctions régulatrices en tant qu'ARN interférents (Czech et al. 2008; Ghildiyal et al. 2008; Kawamura et al. 2008; Okamura et al. 2008; Sasidharan and Gerstein 2008).

Sur le plan évolutif, la duplication de gène suivie par la perte ou la dégénérescence d'une des copies peut également jouer un rôle dans la séparation reproductive entre deux populations qui n'en formaient initialement qu'une seule. Cette théorie avancée dans les années 30 stipule que deux populations descendantes d'un ancêtre commun chez lequel un gène donné a été dupliqué peuvent évoluer de manière différente (Dobzhansky 1937). En effet, chaque population peut perdre sélectivement une des deux copies au fil de l'évolution sans engendrer de conséquence notable. En revanche, le croisement entre les deux populations peut engendrer des individus non viables, privés de toute copie fonctionnelle du gène. Bien que difficile à prouver, cette théorie a récemment été appuyée par une étude expliquant l'incompatibilité reproductive entre deux souches sauvages d'*A. thaliana* (Bikard et al. 2009). Le croisement entre les souches Columbia et Cap Verde Island entraîne la présence de descendants non viables, imputable à l'absence d'un gène impliqué dans la biosynthèse de l'histidine (HPA) (Muralla et al. 2007; Bikard et al. 2009). L'examen du génome des plantes a montré que ce gène essentiel s'est dupliqué, au cours de l'évolution (Figure 3A). Cependant les duplicats ont évolué différemment dans les deux

souches avec l'inactivation de la copie présente sur le chromosome 1 chez Columbia, à l'inverse de la copie présente sur le chromosome 5 perdue chez Cap Verde Island (Figure 3B) (Simon et al. 2008; Bikard et al. 2009). A la première génération d'hybrides de ces deux populations, tous les individus possèdent une copie active du gène, mais les gamètes issus de ces hybrides peuvent en être dépourvus (Figure 3C). Les descendants qui se retrouvent dépourvus d'un gène actif, ne sont pas viables et meurent au début de leur développement. Sur le plan de l'évolution, il existe bien un début de séparation reproductive entre ces deux souches d'une même espèce. Considérant le nombre de pseudogènes au sein de certains génomes, ces résultats suggèrent que des modifications génétiques naturelles provenant de variations structurales peuvent jouer un rôle important dans la mise en place d'incompatibilités génétiques entre individus d'une même espèce.

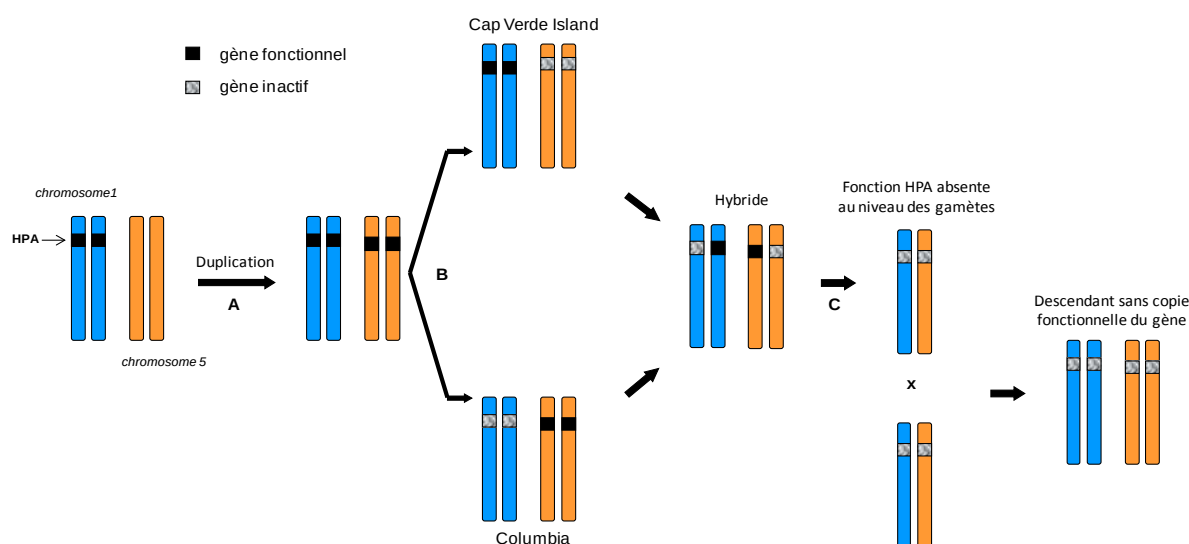


Figure 3. Non-fonctionnalisation du gène HPA (histidinol phosphate amino transferase) et incompatibilité reproductive entre deux souches d'*A. thaliana* (d'après Bikard et al. 2009)

1.4.2 Conservation de la fonction

La première manière par laquelle un gène dupliqué peut être maintenu dans le génome est la conservation de gène durant laquelle les deux paralogues conservent la fonction initiale. Ceci peut survenir quand une quantité supérieure de protéine produite par ces deux gènes dupliqués est immédiatement bénéfique pour l'organisme, conférant ainsi un avantage sélectif. On parle alors d'une « augmentation du dosage génique ». Ce scénario semble être surtout retrouvé dans le cadre de l'acquisition, par certains organismes, d'une capacité de résistance à des produits toxiques ou à des infections. De récentes expériences sur une population de

Plasmodium falciparum, le parasite responsable du paludisme, ont mis en évidence une corrélation entre la résistance à un médicament (metoquinine) et l'augmentation du nombre de copies d'un gène nommé *pfmdr1* (Price et al. 2004). Ce gène code pour un transporteur impliqué dans l'expulsion, par le parasite, de nombreuses molécules toxiques. En avoir plusieurs copies constitue donc un avantage pour la population concernée. Suite à l'analyse des génomes de plantes, une autre hypothèse propose que deux gènes paralogues puissent être conservés dans le génome comme une copie de sauvegarde. Ainsi le génome se prémunit face aux conséquences d'une mutation délétère impactant une fonction cruciale pour l'organisme (Chapman et al. 2006). Cette hypothèse est cependant en contradiction avec le principe selon lequel une copie d'un gène n'est maintenue au cours de l'évolution que si elle confère un avantage pour l'organisme (Clark 1994).

1.4.3 Néo-fonctionnalisation

L'un des processus les plus importants sur le plan évolutif pour les séquences dupliquées est l'émergence d'une nouvelle fonction. Selon le modèle créé par Ohno en 1970, la fixation de mutations pour l'une des copies peut aussi aboutir à une modification de fonction (Ohno 1970). A l'origine, ce processus est neutre puisque la fonction initiale est conservée par l'une des deux copies, la deuxième est donc « libre » d'évoluer. La création d'une nouvelle fonction à partir d'un gène dupliqué peut nécessiter une ou au contraire un nombre important de mutations conduisant à la substitution d'un ou plusieurs acides aminés (Asenjo et al. 1994; Zhang et al. 1998). Cependant, si la fonction modifiée par la ou les mutations successives est bénéfique pour l'organisme, alors la présence de deux gènes, dont un codant la protéine de fonction initiale et l'autre codant la protéine de nouvelle fonction, sera désormais préservée par la sélection.

Chez les primates, ce processus a été décrit pour deux gènes appartenant à la famille des Ribonucléases A (Zhang et al. 1998). Au cours de l'évolution, suite à la duplication d'un gène codant pour une ribonucléase A appelée EDN pour 'eosinophil-derived neurotoxin', l'un des deux paralogues va accumuler rapidement des mutations, conduisant à l'émergence d'une nouvelle protéine nommée ECP (eosinophil cationic protein). Contrairement à EDN, cette nouvelle protéine a une très faible activité RNase mais présente des propriétés antibactériennes et antiparasitaires (Slifman et al. 1986; Rosenberg 1995). Des analyses moléculaires suggèrent fortement que cette nouvelle propriété résulte de l'accumulation de substitutions d'arginine à la place d'autres acides aminés après l'évènement de duplication, conférant à la protéine la

capacité de créer des pores au sein des membranes cellulaires des bactéries (Figure 4) (Young et al. 1986; Zhang et al. 1998).

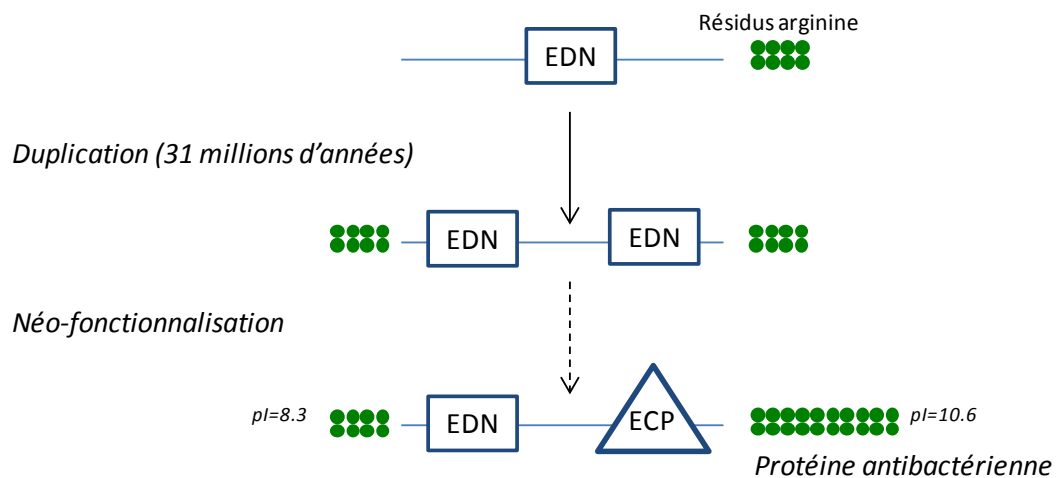


Figure 4. Néo-fonctionnalisation et émergence d'une nouvelle fonction (Zhang et al. 1998)

Chez les primates, suite à la duplication de la protéine EDN, l'un des deux paralogues va accumuler rapidement des mutations, et en particulier des substitutions d'acides aminés en arginine, conduisant à l'émergence d'une nouvelle protéine (ECP). L'accumulation d'acides aminés polaires au cours de l'évolution est à l'origine de nouvelles propriétés antibactériennes pour la protéine ECP.

Cependant, dans de nombreux cas, la néo-fonctionnalisation correspond à une spécialisation de la fonction ancestrale. C'est notamment le cas des opsines qui sont impliquées dans la vision des couleurs. A l'origine une vision dichromatique reposait sur deux gènes codant deux protéines photoréceptrices. Après duplication, l'un des paralogues a divergé induisant une modification du maximum de la longueur d'onde d'absorption. Ainsi une spécialisation du rouge et du vert est à l'origine de la vision trichromatique chez les humains et les grands singes. En effet, chez l'être humain ainsi que chez les singes d'Afrique (Macaque, Chimpanzé), la vision trichromatique repose sur l'existence de trois gènes codant pour trois protéines photoréceptrices. Les gènes codant pour les opsines sensibles au rouge et au vert sont situés sur le chromosome X, tandis que le gène codant pour la protéine sensible au bleu est sur le chromosome 7. L'arbre phylogénétique de quelques primates permet de dater la dernière duplication à l'origine des gènes "rouge" et "vert" portés par le chromosome X (Figure 5). On constate qu'à la différence de l'Homme et des singes d'Afrique, les singes d'Amérique (Ouistiti, Tamarin) ne possèdent qu'un seul gène codant pour une opsine sur le chromosome X. On en

déduit que la dernière duplication ayant affecté le gène présent sur le chromosome X a eu lieu dans une période comprise entre 40 Ma et 23 Ma (Yokoyama and Yokoyama 1989; Hanna et al. 1997; Hunt et al. 1998; Dulai et al. 1999).

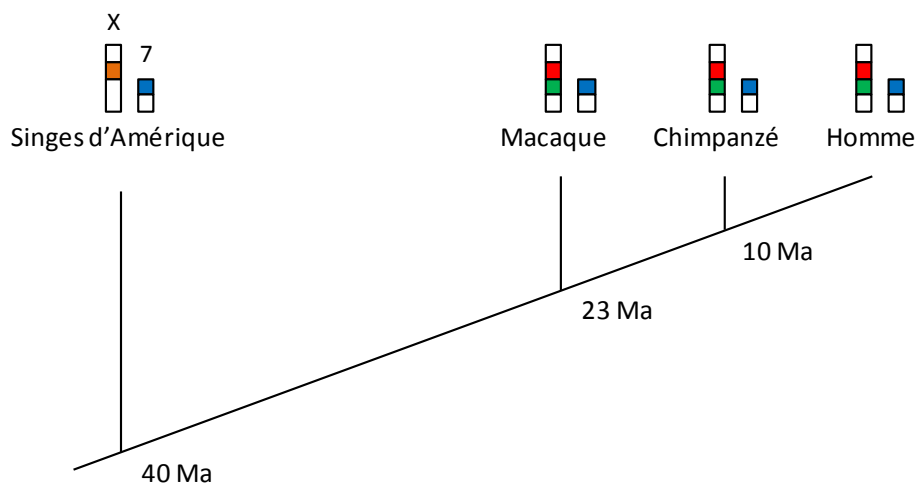


Figure 5. Néo-fonctionnalisation et spécialisation de la fonction préexistante

1.4.4 Sous-fonctionnalisation

Le modèle d'Ohno implique que dans une très grande majorité des cas, l'une des copies doit devenir un pseudogène, la non-fonctionnalisation étant beaucoup plus probable que la néo-fonctionnalisation. Une autre alternative à ces deux modèles a récemment été proposée afin d'expliquer la prévalence des gènes dupliqués fixés au sein des génomes (Jensen 1976; Hughes 1994). Ce processus appelé sous-fonctionnalisation divise les tâches qui étaient accomplies par le gène ancestral entre les deux gènes paralogues, qui deviennent alors complémentaires et nécessaires. Ainsi les deux copies sont fixées dans la population (Lynch and Force 2000). Ce processus concerne aussi bien les régions régulatrices et fonctionnelles des gènes, assurant ainsi leur maintien.

Par exemple, chez les tétrapodes, la famille de gènes *engrailed* est composée de deux gènes (*En1* et *En2*) qui sont impliqués en amont de nombreux mécanismes de développement (Joyner and Martin 1987; Gardner and Barald 1992). Il a été démontré que cette famille

comportait deux gènes supplémentaires chez le poisson *Danio rerio* (Ekker et al. 1992; Amores et al. 1998). Après plusieurs études phylogénétiques, il est à présent admis que les gènes *eng1* et *eng1b* de *D. rerio* sont deux paralogues issus vraisemblablement de la duplication du gène ancestral *En1*, tout comme *eng2* et *eng3* qui seraient issus de la duplication de *En2* (Holland et al. 1997; Force et al. 1999). En effet, l'exploitation de la syntenie découlant de la comparaison du génome de *D. rerio* avec plusieurs génomes de mammifères, confirme la duplication d'un long segment chromosomique au cours de l'évolution des poissons à nageoires rayonnées (Logan et al. 1989; Ozcelik et al. 1992; Stock et al. 1996; Zardoya et al. 1996; Amores et al. 1998; Postlethwait et al. 1998; Force et al. 1999). Des études d'expression permettent d'expliquer la présence et la conservation de ces gènes supplémentaires. En effet, *eng1* est exprimé spécifiquement dans l'appendice pectoral au cours du développement embryonnaire et *eng1b* dans le cerveau, contrairement à l'unique gène orthologue (*En1*) présent chez la souris ou encore la poule qui est quant à lui exprimé dans les deux tissus (Figure 6) (Joyner and Martin 1987; Davis et al. 1991; Gardner and Barald 1992). L'hypothèse alors formulée stipule qu'au cours de l'évolution chacun des deux paralogues aurait accumulé des mutations non fonctionnelles au sein d'une des régions régulatrices de ces gènes, et ainsi la présence de ces deux copies serait devenue vitale pour le développement de ces poissons. Bien que ces régions régulatrices, n'aient pas encore été identifiées, ceci pourrait donc être un exemple de

préservation de gène par sous-fonctionnalisation.

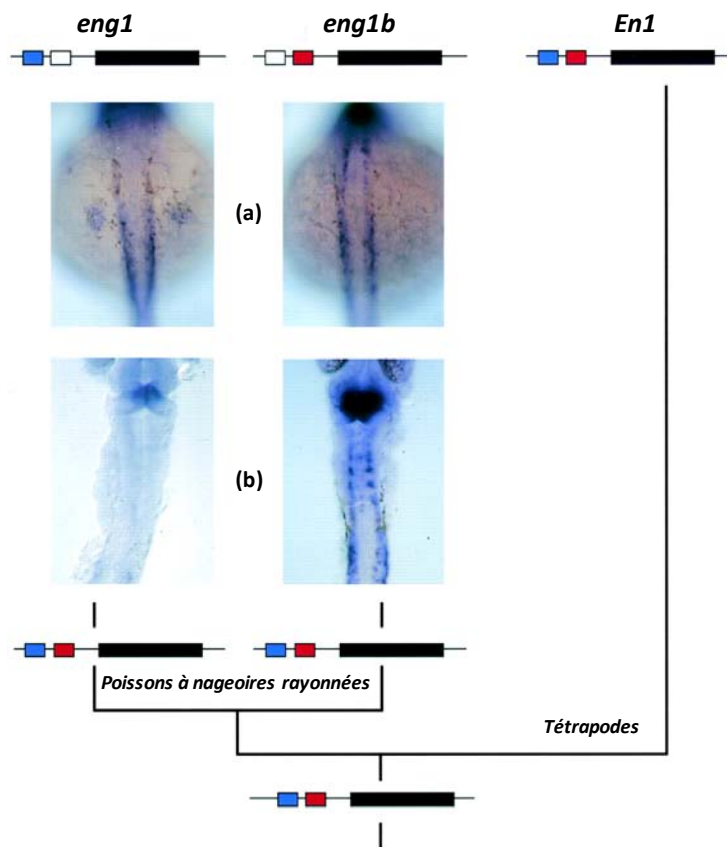


Figure 6. Profil d'expression des gènes *eng1* et *eng1b* au cours du développement embryonnaire chez *D. rerio* (Force et al. 1999).

Expression spécifique de *eng1* dans l'appendice pectorale (a) tandis que *eng1b* est exprimé dans le cerveau (b). Les rectangles colorés correspondent aux régions régulatrices, en bleu (expression pectorale), rouge (expression cérébrale), ou blanc lorsque la fonction est inactive.

1.5 Expansion des familles multigéniques et adaptations à l'environnement

La variabilité des génomes est à l'origine d'une hétérogénéité phénotypique et revêt une grande importance pour l'adaptation des organismes face aux changements environnementaux. L'émergence de familles multigéniques peut conférer plusieurs avantages sélectifs et adaptatifs. En effet, c'est une source importante d'innovation génétique et de nouvelles fonctions. La prévalence de la duplication génique au sein des trois domaines du vivant reflète ainsi l'importance de l'émergence des familles multigéniques au cours de l'évolution. Les données provenant des différents projets de séquençage de génomes permettent de relier les variations génotypiques communément définies comme CNV (Copy Number Variation) de certaines familles de gènes avec leurs conséquences phénotypiques au sein d'une population donnée. Au sein des hémiascomycètes un lien a été établi entre la capacité de certains organismes à se développer sur des milieux riches en glucose avec l'émergence de voies fermentaires (Barnett et al. 2000; Lin and Li 2011; Hittinger 2012). En effet, les hémiascomycètes ayant divergé le plus tard (*S. cerevisiae*, *Candida glabrata*) ont développé une voie de fermentation du glucose efficace, à l'inverse des levures ayant divergé plus tôt (*Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*) qui préfèrent oxyder le glucose via les voies énergétiques mitochondriales (Merico et al. 2007). Au cours de l'évolution de ces levures, plusieurs événements de duplication ont entraîné une expansion des transporteurs membranaires d'oses, à l'origine d'une disponibilité plus importante de ces composés pour ces organismes (Figure 7). La relation de causalité directe entre l'expansion du nombre de copies de ces transporteurs et l'émergence d'une nouvelle voie énergétique au sein de cette lignée a été appuyée par plusieurs études de génomique comparative (Barnett et al. 2000; Conant and Wolfe 2007; Souciet et al. 2009; Lin and Li 2011; Hittinger 2012).



	Natural Habitats	Sensor Group	Transporter Group								Sum
			VIII	VII	VI	V	IV	III	II	I	
<u><i>S. cerevisiae</i>*</u>	fruits, wines	2	1	4	2	1	1	3	3	3	18
<u><i>S. paradoxus</i>*</u>	tree exudate	2	1	4	2	1	2	3	3	3	19
<u><i>S. mikatae</i>*</u>	decayed leaf	2	1	4	2	1	2	3	3	3	19
<u><i>S. bayanus</i>*</u>	fruit juice	2	1	4	3	2	0	2	3	3	18
<u><i>S. castellii</i></u>	various	2	1	0	2	1	0	0	10	2	16
<u><i>C. glabrata</i></u>	human, juice	2	1	0	0	2	0	0	4	3	10
<i>K. polysporus</i>	soil	1	1	0	0	2	0	0	0	2	5
<i>Z. rouxii</i>	sauce, vinegar	1	1	0	1	0	0	0	1	1	4
<i>K. thermotolerans</i>	various	4	1	0	1	0	0	1	1	1	5
<i>K. waltii</i>	tree	2	0	4	1	0	0	0	1	1	7
<i>S. kluyveri</i>	soil	2	2	0	1	1	2	0	1	1	8
<i>K. lactis</i>	dairies	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2
<i>A. gossypii</i>	crop	1	1	0	0	0	0	0	0	3	4
<i>D. hansenii</i>	various	2	1	3							4
<i>C. albicans</i>	human, animals	2	0	3							3
<i>P. stipitis</i>	insect larva	2	0	4							4
<i>Y. lipolytica</i>	various	2	1								1

Figure 7. Evolution du nombre de copies de transporteurs d'oses au cours de l'évolution des hémiascomycètes (Lin and Li 2011)

Les organismes fermentaires sont soulignés et un évènement de duplication du génome survenu au cours de l'évolution des hémiascomycètes est représenté par une étoile. Les transporteurs sont répartis en huit groupes (I à VIII) et le total des gènes présents par organisme est indiqué dans la colonne 'Sum'.

L'adaptation des microorganismes saprophytes à leurs niches écologiques est également le résultat de phénomènes d'expansion et de diversification de familles multigéniques. Les microorganismes saprophytes sont des acteurs majeurs dans les cycles géochimiques globaux, en particulier grâce à leur capacité à mobiliser le carbone et l'azote à partir de composés organiques complexes. En raison de leur potentiel biotechnologique, des recherches récentes ont porté sur les systèmes sécrétés par les champignons de pourriture du bois, mettant ainsi en évidence une myriade d'enzymes fongiques impliquées dans la dégradation des polysaccharides et de la lignine (Glenn et al. 1983; Tien and Kirk 1983; Kuwahara et al. 1984; Kirk and Farrell 1987; Tien and Tu 1987; Kersten and Cullen 2007; Hammel and Cullen 2008; Floudas et al. 2012; Hittinger 2012). Au cours de l'évolution, les champignons de pourriture blanche ont développé un arsenal d'enzymes (hydrolases, peroxydases, oxydases) leur permettant de dégrader la lignine. Parmi ces familles, l'expansion du nombre de copies de gènes codant notamment pour des peroxydases extracellulaires (lignine-peroxydase, manganèse-peroxydase) a joué un rôle

déterminant dans l'acquisition de ce phénotype spécifique (Figure 8). En effet, absents ou présents en unique copie chez les champignons de pourriture brune qui dégradent le bois essentiellement grâce à la réaction de Fenton, ces gènes peuvent atteindre jusqu'à 26 copies chez *Trametes versicolor* un champignon de pourriture blanche (Kirk and Farrell 1987; Tien and Tu 1987; Hammel and Cullen 2008). Par ailleurs, lorsqu'ils sont présents au sein d'organismes non-ligninolytiques, ces gènes sont mutés pour les régions responsables de l'activité ligninolytique (Larrondo et al. 2005; Hammel and Cullen 2008). Ainsi la génomique comparative a permis d'établir un lien entre l'expansion des lignines peroxydases chez les champignons de pourriture blanche et l'émergence d'une nouvelle activité ligninolytique (Floudas et al. 2012; Hittinger 2012).

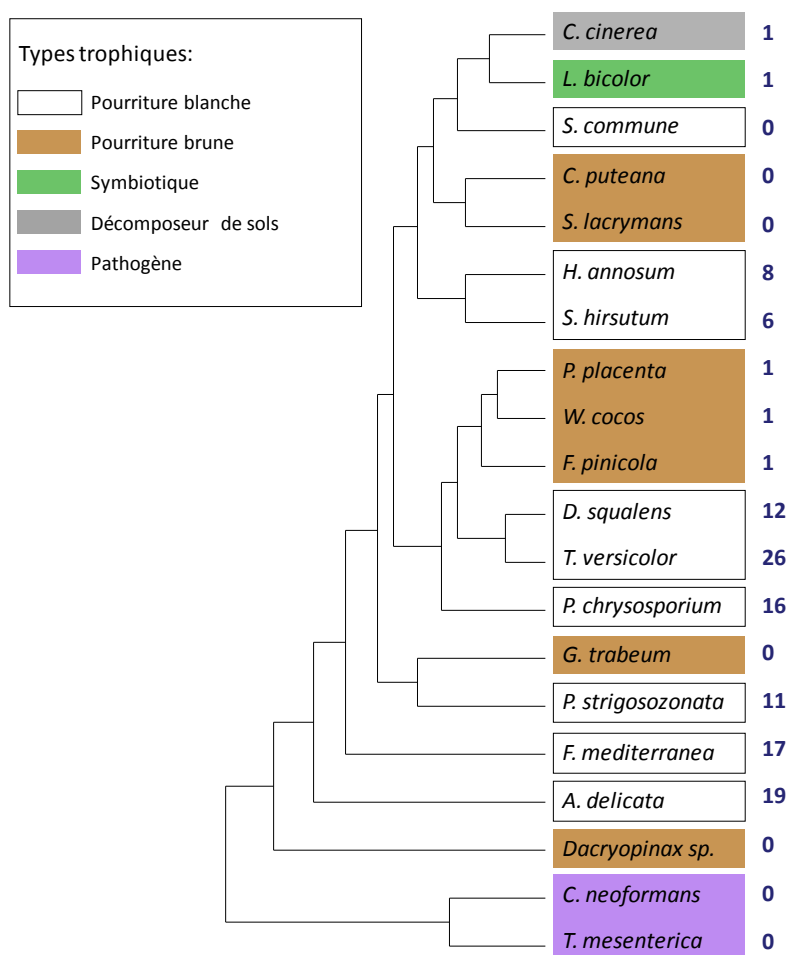


Figure 8. Variations du nombre de peroxydases extracellulaires impliquées dans la dégradation de la lignine au cours de l'évolution des basidiomycètes (Floudas et al. 2012)

Outre ces systèmes extracellulaires, il apparaît que des familles de gènes codant des protéines intracellulaires impliquées dans les voies de détoxification sont particulièrement étendues chez les champignons décomposeurs du bois. Ces champignons comme d'autres organismes doivent faire face à des composés potentiellement toxiques résultant de la dégradation de la matière organique, du métabolisme secondaire d'organismes antagonistes ou encore d'activités humaines. Cela est particulièrement vrai pour les champignons décomposeurs de bois, qui sont capables de dégrader la lignine libérant ainsi une multitude de composés récalcitrants. Face à cette immense diversité de nutriments et de sources potentielles de composés toxiques, ces champignons lignivores ont évolué de façon concomitante, en développant en particulier des voies de détoxification par le biais de l'extension de familles multigéniques telles que les cytochromes P450 monooxygénases (CytP450), ou encore les glutathion transférases (Morel et al. 2009; Suzuki et al. 2012). Les CytP450 sont des enzymes de phase I, et catalysent différents types de réactions (hydroxylation, époxydation, oxydation, réduction, déhalogénéation, déamination, etc.) sur des molécules électrophiles. Le nombre et la diversité des CytP450 au sein des organismes fongiques sont étroitement liés à leur mode de vie (Lah et al. 2008; Cresnar and Petric 2011; Lah et al. 2011). Les levures comportent moins d'une vingtaine de CytP450 au sein de leur génome, avec plutôt une moyenne de trois isoformes par organisme, à la différence des organismes filamenteux chez qui ce nombre dépasse généralement la centaine (Lah et al. 2011). *P. chrysosporium* possède notamment l'une des plus vastes familles de CytP450 fongiques avec plus de 150 isoformes, ce qui représente environ 1 % des séquences codantes totales de son génome (Martinez et al. 2004). Au sein de cette superfamille d'enzymes, certaines familles spécifiques se sont particulièrement étendues et diversifiées au cours de l'évolution, via notamment des processus de duplication et néofonctionnalisation (Doddapaneni et al. 2005). Alors que les gènes considérés comme ancestraux sont conservés au sein des organismes saprophytes ou encore pathogènes, d'autres familles spécifiques de CytP450 se sont étendues et diversifiées chez *P. chrysosporium* et existent en tant que groupes de gènes. Cette évolution rapide et spécifique à certaines familles est en lien avec l'environnement et notamment la présence d'une grande diversité de molécules auxquelles les organismes saprophytes sont confrontés. L'analyse des positions chromosomiques des gènes codant pour les CytP450 au sein du génome de *P. chrysosporium* indique que ces gènes ont évolué via de multiples duplications, suivies entre autre par des processus de translocation et de mutations, entraînant ainsi l'extension et la diversification de certaines classes de CytP450 (Figure 9). Cette diversification structurelle au sein des classes de CytP450, a par ailleurs conduit

à l'acquisition de nouvelles fonctions par le champignon grâce à la versatilité de leurs séquences. Cette propriété permet une adaptation rapide des systèmes enzymatiques à la complexité et à la variabilité des composés présents au sein de leurs environnements par la modification d'un ou de quelques acides aminés (Doddapaneni et al. 2005; Lah et al. 2008; Cresnar and Petric 2011; Syed and Yadav 2012).

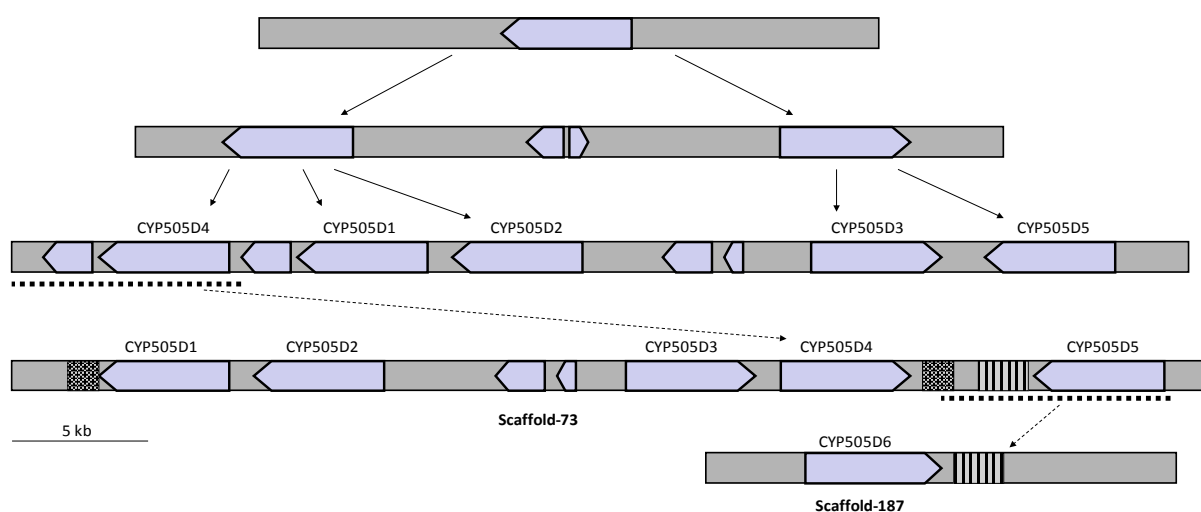


Figure 9. Mécanisme évolutif de la famille des CytP450 505 chez *P. chrysosporium*

(Doddapaneni et al. 2005; Syed and Yadav 2012)

L'organisation génomique actuelle de cette famille de CytP450 est le résultat d'évènements de duplication (flèches pleines), et de translocation (flèches en pointillées) survenus au cours de l'évolution. Les positions et orientations des gènes sont indiquées par des blocs bleus et les régions présentant une forte identité sont matérialisées par les motifs identiques.

Les glutathion transférases (GST) sont également au cœur des systèmes de détoxification, en particulier en catalysant des réactions appelées réactions de phase II. A l'instar des CytP450, l'enjeu pour ces enzymes est de prendre en charge un grand nombre de composés toxiques. La plupart des GST cytosoliques s'organisent en cluster dans les génomes, les gènes étant adjacents les uns des autres et en général regroupés par classe. De plus, les gènes codant les GST sont généralement organisés en tandem au sein des génomes (Lin et al. 1999; Lan et al. 2009). Cette organisation particulière, décrite chez les mammifères, les plantes supérieures, les insectes ou encore les bactéries (Toung et al. 1993; Henderson et al. 1998; Ranson et al. 1998; Morel et al. 2002; Vuilleumier and Pagni 2002), révèle des mécanismes évolutifs communs à l'ensemble des

GST. Ainsi le fort taux d'évolution des GST et leur expansion reflète probablement une réponse adaptative aux contraintes environnementales. Par ailleurs, les GST spécifiques d'un taxon sont beaucoup plus représentées que les GST communes à plusieurs règnes. L'ensemble de ces résultats suggère que les GST ont évolué suite à grand nombre de duplications (Chi et al. 2011). Les mutations aléatoires accumulées au cours de l'évolution sont à la base de la variabilité de substrat des GST (Mannervik et al. 2009). Ainsi, au cours de l'évolution, la nécessité de faire face à de nouveaux composés, s'est traduite par l'augmentation et la diversification du nombre de gènes codant pour les GST.

Il apparaît donc clairement que ces familles multigéniques sont le résultat de remaniements chromosomiques soumis à la pression de sélection et aboutissant à un avantage sélectif. Le projet de publication ci-dessous apporte une vue globale sur l'évolution et la diversification de ces systèmes de détoxification fongique au niveau génomique grâce à l'analyse de 44 génomes de basidiomycètes et transcriptomique grâce aux données de la littérature. Ce travail a également permis d'établir un lien entre les CytP450 et les GST en termes d'évolution de séquences et d'expression de gènes.

2. Article 1: Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi

Mélanie Morel, Edgar Meux, Yann Mathieu, Anne Thuillier, Kamel Chibani, Luc Harvengt, Eric Gelhaye

Microbial biotechnology

Cet article s'intéresse aux différents processus mis en place par les champignons leur permettant de dégrader ou de métaboliser une grande diversité de nutriments et de sources potentielles de composés toxiques associées. Ainsi la première partie de l'étude présente différentes familles multigéniques associées aux mécanismes de détoxification dont l'extension au cours de l'évolution aurait permis l'adaptation des organismes fongiques à leurs niches écologiques actuelles. Dans une seconde partie, cet article présente une étude phylogénétique de la famille de glutathion transférases fongiques à partir de l'analyse de 44 génomes de basidiomycètes. Cette analyse présente un intérêt majeur car les organismes sélectionnés pour cette étude sont représentatifs de tous les types trophiques (saprophyte, pathogène et symbiotique) présents au sein de ce règne. De plus, la plupart des études précédentes sur les GST fongiques ne concernait le plus souvent que quelques membres ou quelques espèces, proposant bien souvent une classification inadaptée (Sheehan et al. 2001; McGoldrick et al. 2005; Morel et al. 2009). Enfin, l'extension de certaines familles d'enzymes au sein des basidiomycètes et leur impact sur l'adaptation de ces organismes à leur environnement actuel sont discutés dans une troisième partie. En évaluant la distribution globale de ces enzymes au sein des basidiomycètes représentant divers groupes fonctionnels nous avons mis en évidence une relation étroite entre la variation du nombre de copies de CytP450 et de GST au sein des champignons saprophytes, suggérant un lien fonctionnel entre ces deux familles. Nous discutons également du rôle important joué par la néo-fonctionnalisation dans le processus d'évolution de ces familles d'enzymes reflétant l'adaptation des champignons à leur environnement.

Minireview

Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi

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

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

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

³Laboratoire de biotechnologie, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée, FCBA, Campus Forêt-Bois de Pierroton, 33610 Cestas, France.

Summary

Fungal degradation of wood is mainly restricted to basidiomycetes, these organisms having developed complex oxidative and hydrolytic enzymatic systems. Besides these systems, wood-decaying fungi possess intracellular networks allowing them to deal with the myriad of potential toxic compounds resulting at least in part from wood degradation but also more generally from recalcitrant organic matter degradation. The members of the detoxification pathways constitute the xenome. Generally, they belong to multigenic families such as the cytochrome P450 monooxygenases and the glutathione transferases. Taking advantage of the recent release of numerous genomes of basidiomycetes, we show here that these multigenic families are extended and functionally related in wood-decaying fungi. Furthermore, we postulate that these rapidly evolving multigenic families could reflect the adaptation of these fungi to the diversity of their substrate and provide keys to understand their ecology. This is of particular importance for white biotechnology, this xenome being a putative target for improving degradation properties of these fungi in biomass valorization purposes.

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

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

Introduction

Understanding the evolution of organisms and their adaptation to environmental constraints remains a major challenge for biologists. The recent development of sequencing technologies has led to a new science 'Comparative genomics'. Gene copy number variation (CNV) has been observed from yeast (Carreto *et al.*, 2008) to human (Redon *et al.*, 2006). These CNVs result from duplication/deletion events. Duplication events can also be followed by functional diversification, this process being one of the most important mechanisms leading to new functions (Ohta, 1991; Force *et al.*, 1999). The correlation between these genetic variations and phenotypic consequences remains often unclear. The most ambitious studies associating genetic and phenotypic variations are currently conducted in mammals in connection with the important implications in human health (Zhang *et al.*, 2009; Yalcin *et al.*, 2011). In contrast few studies have been devoted to fungal CNVs (Tirosh and Barkai, 2007; Liti *et al.*, 2009; Ellison *et al.*, 2011; Taylor, 2011). During the last years, several programmes have been launched to describe the functional genomic diversity of fungi, the relatively small size of their genome being compatible with the development of environmental genomic approaches (Sharpton *et al.*, 2009; Martin, 2010; Neafsey *et al.*, 2010; Ohm *et al.*, 2010; Duplessis *et al.*, 2011; Murat *et al.*, 2011).

Fungi are major actors in global geochemical cycles, particularly in the carbon and nitrogen cycles, because of their involvement in organic matter recycling. Fungi play also major roles in different ecosystems through their symbiotic or pathogenic interactions with other organisms.

During the last few years, many sequencing projects have been devoted to wood-decaying fungi (Martinez *et al.*, 2004; 2009; Eastwood *et al.*, 2011), due to their potential applications in white biotechnology in general, and in bioenergy production from biomass in particular. Comparative genomic has confirmed the extraordinary diversity of enzymatic mechanisms developed by these fungi to degrade recalcitrant organic matter and in particular lignocellulose. Recent research has mainly focused on the oxidative systems secreted by white-rot

and brown-rot fungi, and also on the myriad of fungal enzymes involved in the polysaccharide-degrading enzymes (Cazymes). Besides these extracellular systems, it appears that gene families involved in the detoxification pathways are particularly extended in wood-decaying fungi. These genes constitute the xenome, being defined as the biosystem responsible for the detection, transport and metabolism of xenobiotics (Edwards *et al.*, 2005). Fungi as other organisms have to deal with potential toxic compounds resulting from organic matter degradation, secondary metabolism of antagonist organisms, and human activities. It is particularly true for wood-interacting fungi, which are able to degrade recalcitrant lignin and to cope with the myriad of complex compounds synthesized by plant species.

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

Wood composition and degradation

Wood is mainly constituted of cellulose, a variety of hemicelluloses, lignin and to a lesser extent of secondary chemicals (wood extractives). Wood decomposition is a complex process, which, like litter degradation, involves biotic and abiotic factors (Cornwell *et al.*, 2009; Weedon *et al.*, 2009; Freschet *et al.*, 2010). Numerous studies suggest that plant traits have predictable long-term effects on litter decomposition (Hobbie, 1996; Cornwell *et al.*, 2008) and wood degradation (Cornwell *et al.*, 2009; Weedon *et al.*, 2009; Cornelissen *et al.*, 2012). Among the factors, which lead to 'afterlife effects' on its

degradation, wood chemical and anatomical traits are probably important (Cornwell *et al.*, 2009). For instance, the decomposition of softwood is slower than hardwood in a given environment, suggesting that the chemical composition, which is highly variable between these wood types, could be an important factor governing wood decay (Weedon *et al.*, 2009; Freschet *et al.*, 2012). Wood is a complex structure, its composition depending both on the species considered and on environmental factors, which have influenced the tree growth (Chave *et al.*, 2009). Wood susceptibility to fungal degradation is indeed governed at least in part, by its high content in lignin and other phenolic derivatives compounds.

The efficient fungal degradation of lignin is mainly restricted to specialized basidiomycetes. These latter are able to modify/decompose lignin through oxidative processes (see below), which could lead to aromatic radicals catalysing subsequent degradation and also formation of potential toxic molecules. Besides the well-known effect linked to lignin, secondary metabolites involved in plant defence could also play a major role in the durability of the various wood species (Chave *et al.*, 2009; Freschet *et al.*, 2012). The tree primary defence involves usually bark that provides a physical and chemical barrier against abiotic and biotic stresses. Besides these constitutive defences, induced systems are activated after injury or infection (Franceschi *et al.*, 2005). For instance in conifers, induced defence concerns cell wall re-enforcements and production of secondary metabolites as terpenes, phenols, stilbenes, flavonoids and lignans (Ralph *et al.*, 2006; Danielsson *et al.*, 2011). These changes in chemical composition and their heterogeneity have potentially important 'afterlife' effects on the fungal efficiency in wood degradation.

Fungal xenome: the phase I network

Facing this large diversity of nutriment and potential toxic component sources, fungi, which mainly control wood decomposition in forest ecosystems, have also concomitantly evolved modified detoxification pathways, defining the xenome (Edwards *et al.*, 2005). As in other eukaryotic organisms, the detoxification pathways dealing with recalcitrant/toxic compounds can be divided into three different steps in fungi, the first one corresponding to an activation of the molecule often through an oxidation stage, the second one to a conjugation stage, and the third one either to transport or to storage (Fig. 1). In this article, we will focus mainly on the oxidation and conjugation steps found in wood-decaying fungi through the determination of their xenomic gene content in relation to their environment.

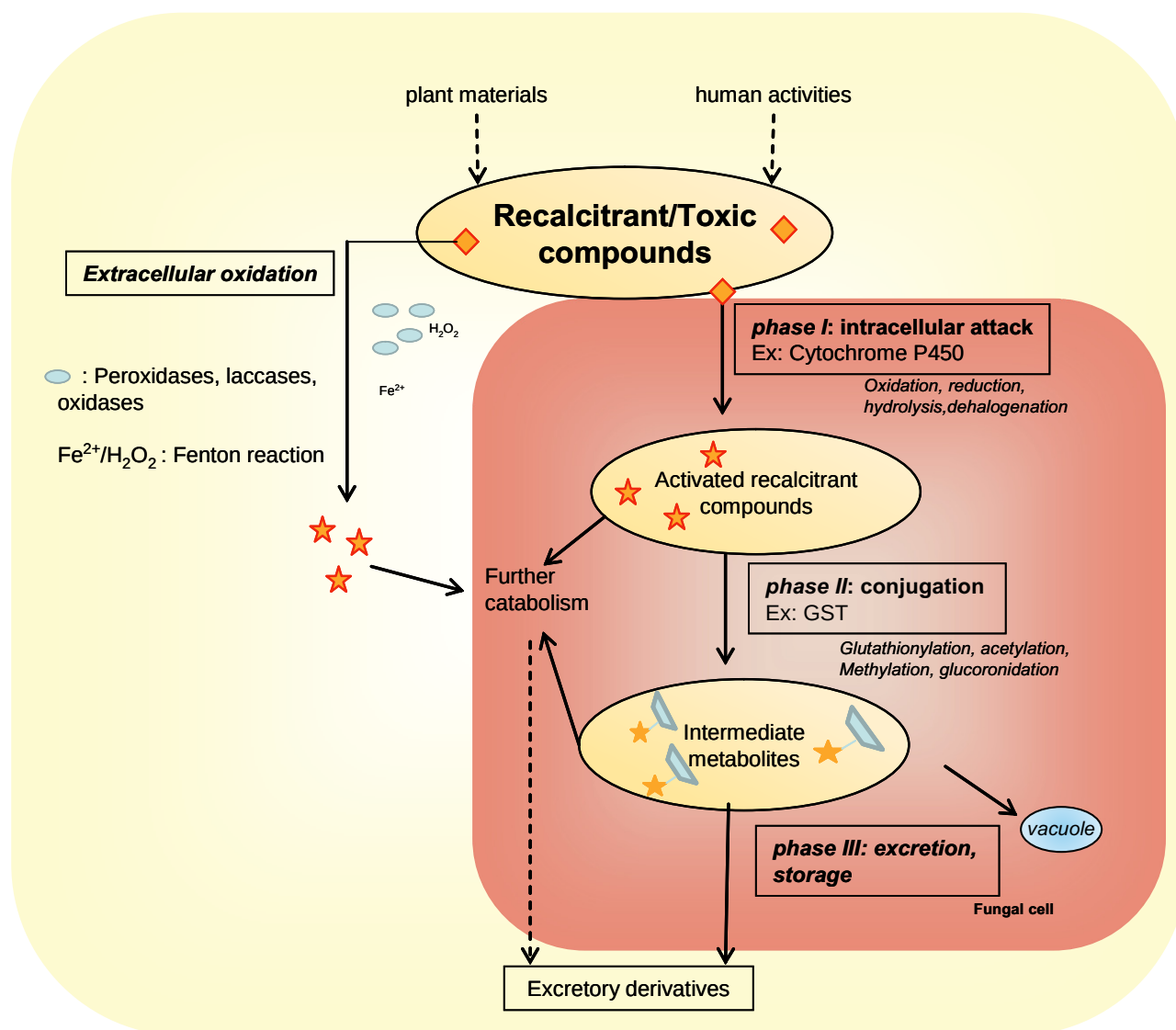


Fig. 1. The fungal detoxification system defined as 'xenome'.

The extracellular network

In the case of wood decaying fungi, the first phase could be mediated by the extracellular oxidative network involved in lignin/wood modification. Wood-decaying fungi could be mainly divided into two main functional groups, brown and white rot, depending on their ability to degrade/mineralize lignin. The brown-rot fungi are able to modify lignin to gain access to cellulose and hemicellulose. The recent release of the genomes of *Postia placenta* and *Serpula lacrymans* has confirmed previous biochemical works demonstrating that this step is mainly mediated by non-enzymatic reactions in these fungi (Martinez *et al.*, 2009; Eastwood *et al.*, 2011). Brown-rot fungi use small phenolic compounds to reduce iron and produce hydrogen peroxide, prerequisite steps to form hydroxyl radicals

via the Fenton reaction (Goodell *et al.*, 1997; Eastwood *et al.*, 2011). These radicals are involved in lignin modification and in polysaccharide degradation. In contrast, white-rot fungi are able to mineralize lignin, the oxidative degradation of the polymer being mainly mediated through the production of various oxidases and peroxidases (Hofrichter *et al.*, 2010; Harms *et al.*, 2011). Glycosyl hydrolases are mainly involved in polysaccharide degradation through hydrolytic processes (Martinez *et al.*, 2004; 2009). Whatever the functional group considered, the oxidative stage exhibits low substrate specificity, explaining the well-studied potential of these fungi for bioremediation purposes (Harms *et al.*, 2011). In particular, white-rot basidiomycetes are able to degrade a large panel of environmental pollutants (Asgher *et al.*, 2008). Further information concerning the extracellular enzy-

matic networks involved in lignin breakdown can be obtained in recent reviews dealing with this topic (Sanchez, 2009; Wong, 2009; Hofrichter *et al.*, 2010; Bugg *et al.*, 2011; Hernandez-Ortega *et al.*, 2012).

The cytochrome P450 monooxygenases

The oxidative degradation of wood components leads to the formation of a variety of compounds with potential toxic effects depending on the initial substrate composition and also on the oxidative attack. To deal with these compounds, fungi possess a large number of CytP450. These enzymes, found in all life forms, are able to catalyse various reactions as hydroxylation, dealkylation, sulfoxidation etc. and could be involved in primary, secondary and detoxification metabolisms. These haem-thiolate proteins have first been discovered in liver microsomes (Omura and Sato, 1962) through their involvement in complex insertions of molecular oxygen into different substrates. General reviews on CytP450s have been published (Paine, 1995; Mizutani and Ohta, 2010; Nelson and Werck-Reichhart, 2011; Schuler, 2011; Ichinose, 2012).

In fungi as well as in other organisms, CytP450s have been shown to be involved in primary metabolism as CYP61 and CYP51 in ergosterol biosynthesis (Lepesheva and Waterman, 2007) and also in secondary metabolism as for instance in aflatoxin synthesis in *aspergilli* (Yu *et al.*, 2004). Fungal CytP450s are also involved in detoxification pathways as shown in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* where various isoforms have been shown to be involved in polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation (Syed *et al.*, 2010; Hirosue *et al.*, 2011). In basidiomycetes, the CytP450ome ranges from four (the pathogen *Cryptococcus neoformans*) to over 250 sequences (the brown-rot *P. placenta*), the number of isoforms apparently increasing with the ability to form mycorrhizae and to degrade plant litter (Cresnar and Petric, 2011). It is assumed that the high number of CytP450 isoforms found in wood decaying fungi could reflect the ability of these fungi to metabolize and mineralize aromatic compounds resulting from wood extracellular oxidation. The functional diversity of CytP450s has been investigated in particular in *P. chrysosporium*, where 154 CytP450-encoding genes have been identified in this white-rot basidiomycete (Martinez *et al.*, 2004; Doddapaneni and Yadav, 2005; Chigu *et al.*, 2010; Hirosue *et al.*, 2011). Fourteen PcCytP450s isoforms are able to oxidize anthracene to anthraquinone and numerous isoforms are versatile enzymes accepting a broad range of substrates with varying three-dimensional structures (Hirosue *et al.*, 2011). In contrast to CytP450 essential to primary metabolism, the isoforms involved in detoxification pathways are usually less specific (Cresnar and Petric, 2011).

In *P. chrysosporium*, it is assumed that these versatile CytP450s have emerged from different ancestral genes due to extensive gene duplication events and intragenomic recombinations suggesting an evolution driven by the adaptation of the fungus to wood degradation (Doddapaneni and Yadav, 2005; Hirosue *et al.*, 2011). From a general point of view mainly resulting from genomic data, it is now becoming obvious that the number and range of CytP450s within an individual organism reflect, to some extent, its lifestyle (Schuler, 2011). Transcriptional analyses confirm the role of various CytP450s in wood degradation/mineralization for both white-rot and brown-rot fungi. For instance, in the brown-rot *P. placenta*, where 230 genes are related to CytP450, differential induction of 15 encoding CytP450 genes was observed depending of the wood species incubated with the fungal culture (aspen versus pine) (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2010). In a similar way, in the white-rot *Phanerochaete carnosa*, 21 genes encoding CytP450s are found strongly regulated according to wood species (coniferous or deciduous wood) (MacDonald *et al.*, 2011). All these data are in agreement with the following statement made by Hirosue and co-workers: 'molecular evolution of basidiomycetous CytP450 has been, at least in part, vigorously driven by survival strategies to provide a superior metabolic system to degrade exogenous chemicals, presumably involving plant-related compounds including lignin and/or its derivatives' (Hirosue *et al.*, 2011).

Fungal xenome: the phase II network

To cope with the compounds resulting from the activity of phase I enzymes, fungi possess large networks of phase II conjugative enzymes. It is widely admitted that conjugation enhances compound solubility and usually decreases their reactivity. The resulting conjugates could be excreted, further degraded or stored. These phase II enzymes catalyse the formation of sugar (glucoside, xyloside or glucuronide), sulfate, glutathione, acetyl or methyl conjugates. The different conjugates (and/or the different activities) have been detected during the degradation of various compounds in various fungal species (Sutherland *et al.*, 1991; Bezalel *et al.*, 1997; Hundt *et al.*, 2000; Reddy and Gold, 2000; Myung *et al.*, 2008; Campoy *et al.*, 2009; Ning *et al.*, 2010). Furthermore, as proposed for their plant counterparts, the different conjugates could be rapidly processed preventing their detection (Dixon *et al.*, 2010). Conjugation enzymes exhibit a broad specificity accepting various substrates, which are structurally different. Despite this low specificity, transferases belong to multigenic families suggesting a specialization of the various isoforms. For instance, more than 100 putative glycosyltransferase-encoding genes are found in the brown-rot *P. placenta* (Eastwood *et al.*, 2011). Neverthe-

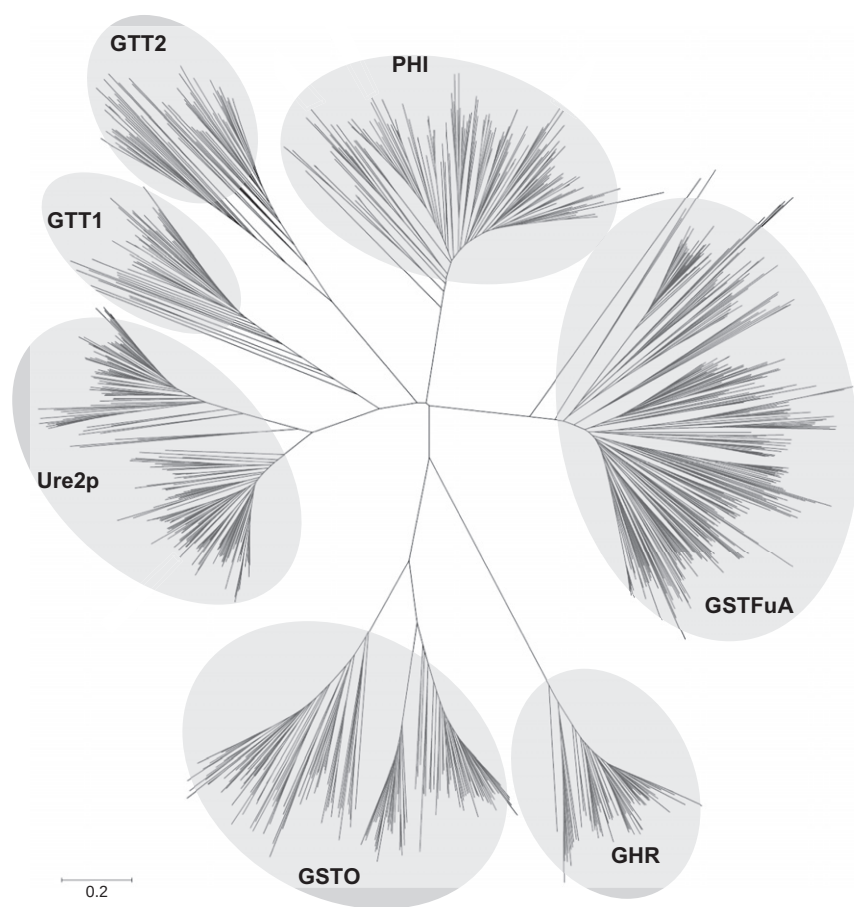


Fig. 2. Phylogenetic tree of glutathione transferases from *Basidiomycetes*. Various subclasses could be distinguished: Ure2p, GSTFuA, Omega (GSTO), Glutathionyl Hydroquinone Reductase (GHR), Phi, GTT1 and GTT2. The sequences were retrieved from genomes available on the Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>). Sequence alignments were done by CLUSTALW and the tree was constructed with the neighbour-joining method in MEGA 5.0 software (Tamura *et al.*, 2011). The robustness of the branches was assessed by the bootstrap method with 500 replications. The scale marker represents 0.2 substitutions per residue.

less, such a high number of glycosyltransferases is not specific to wood-decaying basidiomycetes since similar contents are found in pathogenic/symbiotic ascomycetes (Klosterman *et al.*, 2011), with nevertheless differential distribution within specific classes according to the way of life (Sprockett *et al.*, 2011). Similarly, GSTs form a large ubiquitous multigenic family. The number of isoforms found in fungi range from six in *Saccharomyces cerevisiae* to more than 50, the highest number being found in the wood/litter decaying fungi (Morel *et al.*, 2009). Besides these large families, the number of fungal arylamine *N*-acetyltransferases (NAT) ranged from one to five paralogues in fungi, NAT genes being lost in many species of the higher *Agaricomycotina* (Martins *et al.*, 2010). Concerning sulfotransferases, few studies have been devoted to the diversity of these enzymes in fungi, but nevertheless this detoxification pathway seems to be restricted to ascomycetes.

Fungal glutathione transferases

Soluble GSTs are usually dimeric enzymes, each monomer being composed of two domains. The N-terminal

domain, which is more or less conserved, is involved in glutathione binding (G-site). The C-terminal domain is more variable and is involved in the binding of substrates (H-site). The nomenclature of cytosolic GSTs is based on amino acid sequence identity and at least eight classes have been described to date in fungi and named GTT1, GTT2, URE2p, MAK16, EFb1, Etherase-like recently renamed GSTFuA (Mathieu *et al.*, 2012), GSTO and GHR (McGoldrick *et al.*, 2005, Morel *et al.*, 2009) (Fig. 2). Traditionally, two proteins belong to the same class if they share more than 40% identity and isoenzymes belonging to different classes share less than 20% (Hayes *et al.*, 2005). Nevertheless, based on these primary sequence criteria only, many 'non-canonical' GST groups have emerged especially in bacteria and fungi, increasing the complexity of the GSTs classification. A few protein families are usually classified as GSTs (EF1By, MAK16), but this is rather based on structural similarities, not on the existence of a glutathione-dependent activity. In addition, further immunologic, genetic, structural and functional investigations could reveal unexpected similarities between enzymes first listed in different groups (Meux *et al.*, 2012). This emphasizes the challenge of GST classification.

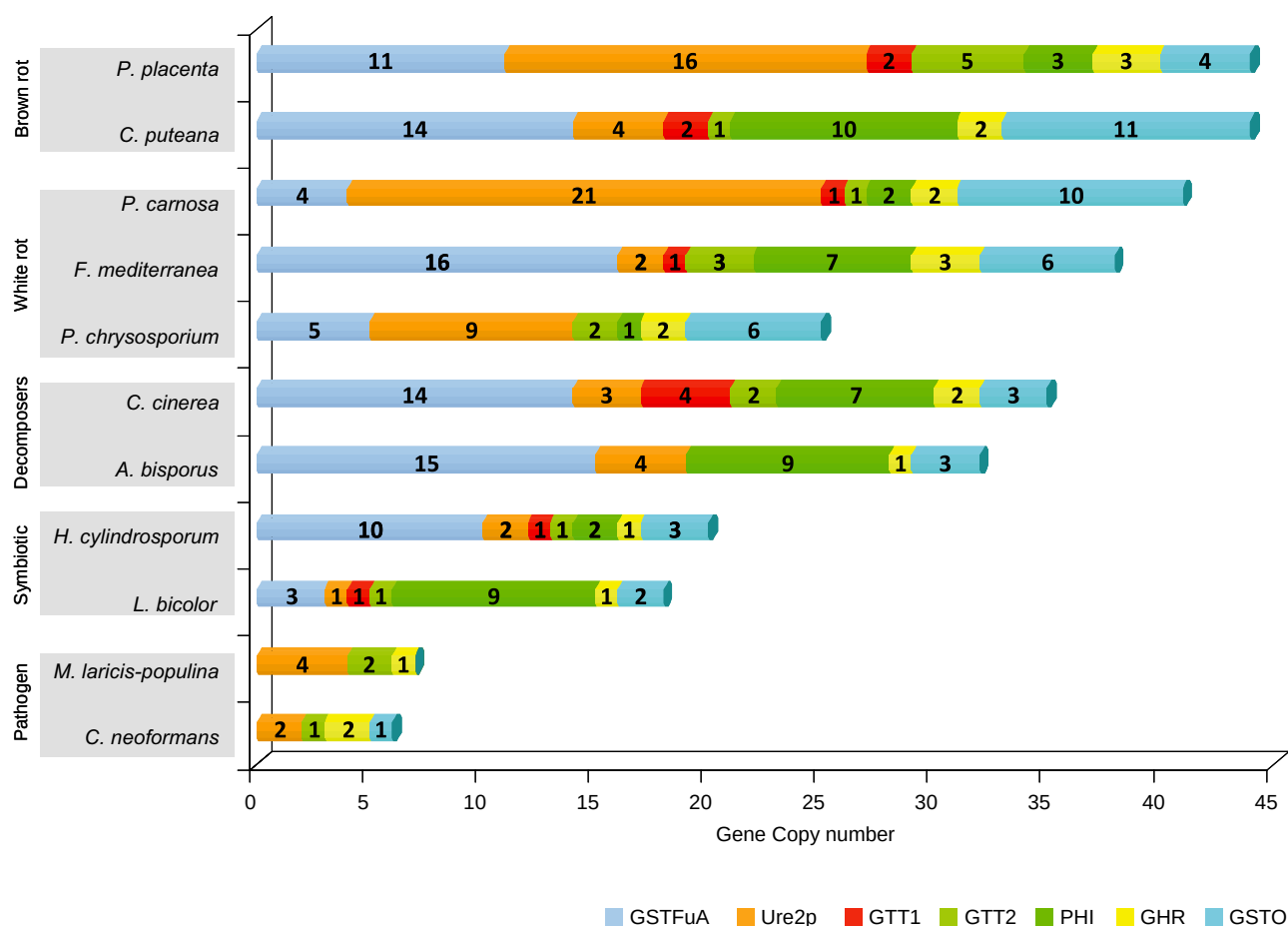


Fig. 3. Organization of the GSTome in selected fungi. GST isoform numbers for each subclass are reported. The repartition has been done based on the sequences retrieved from the JGI coupled to phylogenetic analyses.

It is largely admitted that the main activity of these enzymes is the catalysis of a glutathione adduct onto electrophilic molecules, the specificity of these enzymes remaining usually very weak. However, two classes of GSTs called omega (GSTO) and glutathionyl hydroquinone reductase (GHR) possess in their catalytic site a cysteinyl residue conferring to these proteins the ability to remove glutathione from various structurally different molecules (Garcera *et al.*, 2006; Xun *et al.*, 2010; Meux *et al.*, 2011). These enzymes are highly versatile being able to switch activity when changing only one or few amino acids in the protein sequence (Mannervik *et al.*, 2009). This property results in a large diversity of activities even within a single class, the enzymes being able to exhibit glutathionylation, deglutathionylation or peroxidase activity with various structurally different substrates.

Taking advantage of the recent release of several basidiomycete genome sequences provided by the Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov>), we describe in this review the occurrence of the main fungal cytosolic GSTs classes within fungi with various ways of life. Some selected species and their GST distribution are shown in

Fig. 3. We have investigated the diversity of GSTs in saprophytic, symbiotic and pathogenic fungi (number of genes are given in supplementary data) and highlighted a huge diversity in term of GST number and repartition within the different classes. While the number of GST is higher in saprophytic fungi, no correlation could be established between the trophic mode of the fungi and their GST content.

GTTs and phi classes

The GTT class has been defined for GlutaThione Transferase, since they correspond to the first characterized GST in *S. cerevisiae* (Choi *et al.*, 1998). In yeast, it is composed of GTT1 and GTT2. Both proteins exhibit activity against classical GST substrates as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). ScGTT2 also catalyses the formation of glutathione-Cd conjugates (Adamis *et al.*, 2004), while ScGTT1 catalyses the reduction of hydroperoxides, in particular cumene hydroperoxide probably in the endoplasmic reticulum (Choi *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 2006). ScGTT1 and ScGTT2 have overlapping

functions with glutaredoxins (ScGrx1 and ScGrx2) being involved in the response to oxidative stress (Mariani *et al.*, 2008). Phylogenetic analyses concerning ascomycetes, zygomycetes and basidiomycetes have shown that GTT1 and GTT2 homologues cluster separately (Fig. 2) (Choi *et al.*, 1998; McGoldrick *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2009). The number of GTT1 and GTT2 isoforms ranges from 0 to 4 for GTT1 and 0 to 5 for GTT2 (supplemental Table S1).

A separate cluster has been identified in the present phylogenetic analysis (Fig. 2). Since the amino acid sequences show similarity to the plant-related phi class, we named this new group GSTF for phi. In particular, the N-terminal part of some basidiomycete sequences exhibit around 75% of similarity with Poplar and Arabidopsis GSTFs. In fungi, the number of GSTF-encoding genes differs considerably depending on the genome considered, ranging from 0 to 10. The higher number (10 isoforms) is found in *Botryobasidium botryosum*, *Hydnomerulius pinastri*, *Coniophora puteana* and *Serpula lacrymans* (supplemental Table S1). A proteomic study revealed upregulation of *P. chrysosporium* phi isoform upon addition of exogenous application of vanillin, one of the key intermediates found during lignin degradation (Shimizu *et al.*, 2005). However, since no isoform of GTT and phi has been characterized to date in basidiomycetes, their physiological role remains unclear.

Ure2p class

GSTs belonging to this class have been found only in fungi and bacteria (except in *Stramenopiles* and *Dictyosteliida*). In *S. cerevisiae*, Ure2p acts both as a regulator of nitrogen catabolic repression, and as a stress-responsive protein (Coschigano and Magasanik, 1991; Blinder *et al.*, 1996; Cooper, 2002). The protein has been well studied in yeast for its particularity to form prions (Wickner, 1994). The additional amino acids in the N-terminal part of the protein responsible for this property have been exclusively found in some yeast species, suggesting functional specialization of Ure2p in these organisms.

By analysing ascomycete and basidiomycete sequences, it has been shown that this class could be split into two subclasses called Ure2pA and Ure2pB. In each subclass, the sequences cluster according to the taxonomy suggesting a recent diversification of Ure2p sequences (Thuillier *et al.*, 2011). The analysis of the fungal genomes reveals that only *Schizophyllum commune* does not possess any Ure2 sequence, suggesting an important role of this class among basidiomycetes (supplemental Table S1). Ure2pA is fungal specific and the number of isoforms is highly variable among species ranging from 0 in many species to 20 in *P. carnosus*. It is also interesting to note that species with the higher number of Ure2pA isoforms are saprophytic fungi.

Ure2p4 and Ure2p6 of *P. chrysosporium* have been biochemically characterized (Thuillier *et al.*, 2011). The corresponding genes are recent duplicates, the sequences being tandemly organized in the genome with 83% amino acid sequence identity. However the proteins do not exhibit the same activity pattern, Ure2p6 being much more active than Ure2p4 in both GST and thiol disulfide oxidoreductase activities.

Ure2pB is less expanded and more ubiquitous than Ure2pA (from one in most of the organisms to four sequences in *Agaricus bisporus*, *Coniophora puteana*, *Phlebia brevispora* and *Botryobasidium botryosum*) and is also present in bacterial genomes. Two isoforms (YfcG and YchU) have been characterized in *Escherichia coli* (Kanai *et al.*, 2006). Both have thiol disulfide oxidoreductase activity and contrary to the yeast isoform, weak GST and peroxidase activities (Wadlington *et al.*, 2009; Stourman *et al.*, 2011).

The expansion and diversification of Ure2p in *Agaricomycotina* could be linked to environmental conditions. Transcriptomic analyses revealed specific upregulation of some Ure2p-encoding genes in response to various wood species or aromatic compounds. As examples, *P. chrysosporium* Ure2p9 and Ure2p6 gene expression is induced in presence of aspen and pine respectively (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2011). In the same species Ure2p4 and Ure2p6 show specific expression after polycyclic aromatic compound treatments (Thuillier *et al.*, 2011). Similarly, 8 Ure2p genes are upregulated by fir in *P. carnosus* (MacDonald *et al.*, 2011).

GSTFuA class

This class is only found in microbes (bacteria and fungi) (Morel *et al.*, 2009). The proteins are related to Lig proteins of *Sphingobium* sp. SYK-6 (Masai *et al.*, 1989). The Lig coding genes are organized in operons, which contains LigE, LigF and LigG. The corresponding proteins are involved in the cleavage of β -aryl ether linkages, which is the most abundant bond found in lignin. SpLigE and SpLigF are enantioselective GSTs involved in cleavage of β -aryl ether compounds, like guaiacylglycerol β -O-4-methylumbelliferone (GOU) to produce β -hydroxypropiovanillone and 4-methylumbelliferone *in vitro* (Otsuka *et al.*, 2003). SpLigG is a glutathione lyase catalysing glutathione removal from the glutathione conjugate produced by SpLigF (Masai *et al.*, 2003).

The number of isoforms is highly variable within and among fungal phyla and its distribution is not correlated to fungal taxonomy but rather to the trophic state of fungi. This class is indeed highly represented (between 4 and 19 isoforms) in wood interacting fungi (saprotrophic, litter-decomposing and necrotrophic fungi) whereas it is absent in the analysed biotrophic pathogens (supplemental Table

S1). Interestingly ectomycorrhizal fungi also exhibit a high number of isoforms (from 3 to 10) in accordance with the observation that some of these fungi may live as facultative saprobes (Talbot *et al.*, 2008). Unlike other fungal GSTs depicted here, the sequences cluster according to the organism and no specific subclass could be identified (Fig. 2).

Cysteine-containing GSTs

Cysteine-containing GSTs are relatively ancient members of the cytosolic GST superfamily widespread in several kingdoms and phyla [Omega (O) in mammals, fungi and insect; S-glutathionyl hydroquinone reductase (GHR) in fungi and prokaryotes; Lambda (L) and DHAR in plants]. Although they exhibit the canonical thioredoxin fold, all these subclasses have a cysteine residue in their active site, where other GSTs exhibit a serine or a tyrosine. This cysteine changes dramatically the reactivity profiles of these enzymes compared with the classical GSTs. They do not catalyse conventional conjugation reactions and instead use GSH as a cofactor rather than co-substrate. Cysteine-containing GSTs have been described to catalyse glutathione-dependent reductions and thiol transferase reactions. They have been identified in all basidiomycete genomes studied here, whatever their trophic properties.

GSTOs are subdivided into two subclasses (II and III) and sequences are found in all symbiotic and saprophytic basidiomycete genomes with variability in their isoform number, while they were not detected in biotrophic fungi like *Melampsora larici populina*, *Puccinia graminis* or *Malassezia globosa* suggesting an evolution of the GST driven by the adaptation of the fungus to its habitat (supplemental Table S1). GHR sequences cluster separately and have been recently described as a new subclass of enzymes catalysing the removal of glutathione from hydroquinone conjugates (Xun *et al.*, 2010; Belchik and Xun, 2011; Meux *et al.*, 2011). One to four GHR isoforms have been detected in the studied fungal genomes, except for *M. globosa* and *P. graminis*, for which no GHR sequence has been found (supplemental Table S1).

In contrast to higher eukaryotes, fungal cysteine-containing GSTs have been poorly studied, and most of the investigations have focused on yeast. The *S. cerevisiae* genome encodes three proteins called GTO1, GTO2 and GTO3 that display similarities with human GSTO class (Garcera *et al.*, 2006). These enzymes are active as thiol transferases, dehydroascorbate reductases and as dimethylarsinic reductases through a monothiol mechanism (Garcera *et al.*, 2006). Other experiments suggest a role of ScGTO1 in sulfur metabolism in the peroxisomes, which could be related to the redox regulation of the Str3 cystathionine β -lyase protein (Barreto *et al.*, 2006).

ScGTO2 is active towards several hydroquinone derivatives (Lam *et al.*, 2012) and its expression is strongly induced after exposure with stress agents, such as cadmium, hydroperoxide or diamide (Barreto *et al.*, 2006), suggesting an involvement in oxidative stress response. Based on sequence similarity and functional data obtained with quinone derivatives, the yeast GSTOs isoforms could in fact be part of the glutathionyl hydroquinone reductases.

A direct link between GSTome and P450ome

Comparative analysis of genome sequence data is an important tool to reveal adaptation of organisms to specific environments. Networks involved in drug metabolism and by extension in recalcitrant compound degradation/detoxification are particularly concerned by CNVs.

Considering fungi from various phyla, a significant expansion of the total number of GST has been highlighted in *Agaricomycotina* (Fig. 4A and supplemental Table S2). This CNV is independent of the global number of gene models. This result can be correlated with a previous study performed on the CytP450 family (Cresnar and Petric, 2011). These authors showed that predominantly yeast-form fungi such as *Saccharomycotina* have a small P450ome, while mycorrhizal relationships and complex nutrient degradation mainly performed by *Agaricomycotina* seem to enhance the P450ome size. Based on this observation and the data obtained from the Fungal Cytochrome P450 database (<http://p450.riceblast.snu.ac.kr/species.php>), a direct correlation between P450ome and GSTome contents can be observed suggesting a close link between phase I and phase II detoxification processes (Fig. 4B). However, this correlation with CytP450 does not exist when considering the GST classes individually. This suggests that compensatory effects between GST gene copy numbers could exist to relay the first detoxification step. Both protein families are largely expanded in wood-interacting fungi. For instance, the symbiotic *Laccaria bicolor* exhibits a weak ability to degrade recalcitrant organic matter in correlation with relatively restricted xenomic content. In contrast, *Paxillus involutus*, another symbiotic basidiomycete, possesses an extracellular oxidative system (Rineau *et al.*, 2012) and also an expanded xenome. The most expanded xenomes are found in fungi interacting with wood as the necrotrophic *Heterobasidion annosum* and of course the white and brown-rot fungi.

As proposed for CytP450s, the diversification of GSTs is also recent and could be driven by the adaptation of the fungi to their environment. An analysis of the rapid divergent genes associated in particular with duplication/deletion events has been conducted in various isolated strains of the symbiotic fungus *P. involutus* (Le Quere

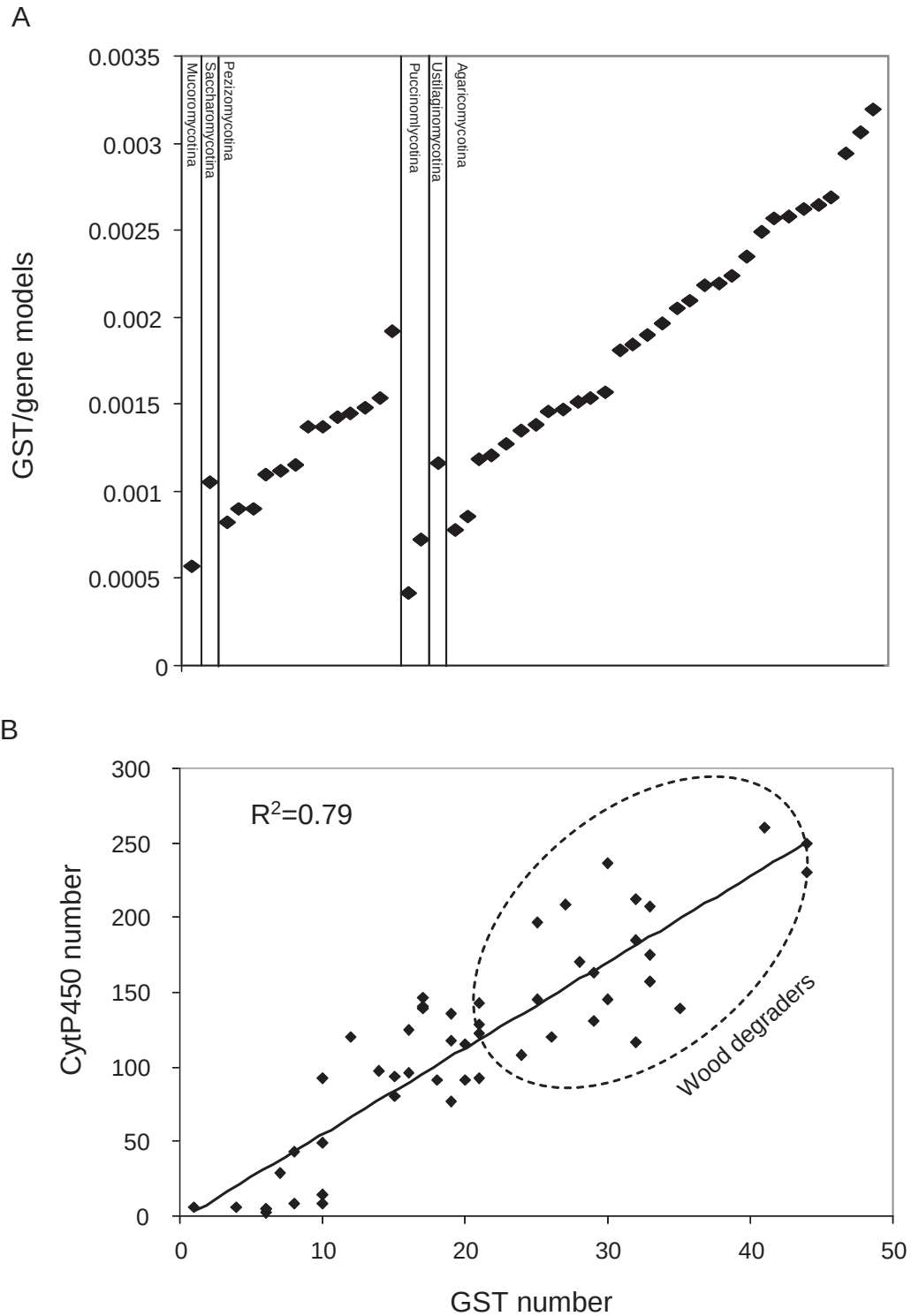


Fig. 4. GSTome expansion in *Agaricomycotina*. A. Relative GSTome size of fungal species belonging to various phyla. The ratio between number of GST and number of gene models is reported. B. Relationship between GST and CytP450 copy numbers in the JGI available fungal genomes. Wood degraders exhibit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

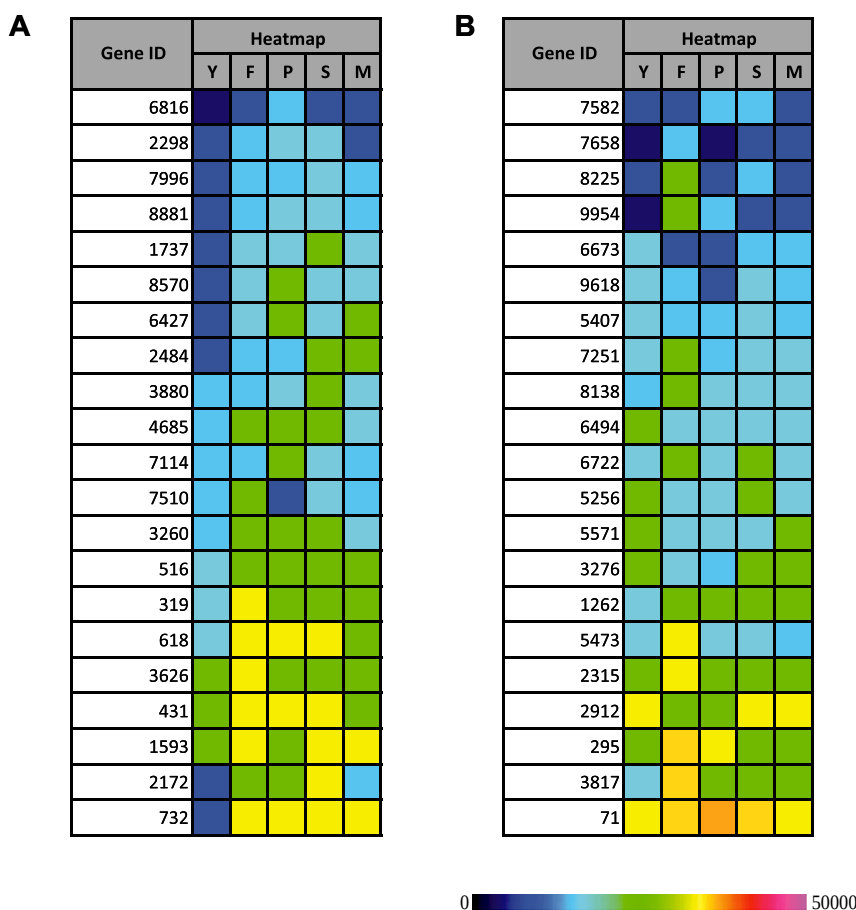


Fig. 5. Heat maps for selected *P. carnosa* transcripts coding for CytP450 (A) and GSTs (B), during growth on YMPG (Y) or medium containing wood from fir (F), pine (P), spruce (S) or maple (M), as determined by mRNA-Seq. The colour scale represents the reads per kilobase of gene model per million mapped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

et al., 2006). Among the identified CNVs, the authors reported at least three CytP450 and one GST-encoding genes demonstrating that the variation in gene copy number occurring in this fungus at the isolate level concerns these gene families (Hedh *et al.*, 2009). In other organisms, CytP450s and GSTs are also concerned by CNVs as shown for instance for the human cytochrome P450 2D6, this polymorphism being associated with drug metabolizing systems (He *et al.*, 2011). In a similar way, the human genome encodes 17 soluble GSTs, two of them missing in some individuals (Mannervik, 2012). All these data agree with a rapid evolution of the xenomic network driven by the molecular environment of the organisms.

Coexpression of P450ome and GSTome

The direct correlation between the P450ome and GSTome was also investigated using the growing number of transcriptional studies. For example, specific CytP450-encoding genes found in *P. chrysosporium* are induced in presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (Syed *et al.*, 2010) and it is also the case for two Ure2p isoforms (Thuillier *et al.*, 2011). In the same fungus, nonylphenol

induces strongly three CytP450 and a Ure2p-encoding genes (Subramanian and Yadav, 2009). In the context of wood degradation, induction of different CytP450s-encoding genes has been observed in *P. chrysosporium* and *P. placenta* in a wood species-dependent manner (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2011) and *P. carnosa* (MacDonald *et al.*, 2011). In *P. carnosa*, heat maps revealed variable expression of CytP450 and GST genes during growth on fir, pine, spruce or maple (Fig. 5 adapted from MacDonald *et al.*, 2011). Some transcripts have been found to be abundant in all wood degrading conditions, while others seem to accumulate in specific ones. As an example CytP450 (Gene ID 516) and GST (Gene ID 1262) exhibit the same transcript profile, i.e. an induction by all wood substrates. Similarly, CytP450 (Gene ID 3626) and GST (Gene ID 2315) are both induced specifically by fir (Fig. 5). Concomitant analysis of CytP450 and GST expression could be a starting point to establish a functional link between isoforms.

Functional links between GSTome and P450ome

The direct correlation observed between the CytP450 and GST contents raises the question of the functions of the

different isoforms. CytP450 are usually involved in the catalysis of redox reactions leading to the production of oxidized products. These oxidation steps could be associated with biosynthetic pathways in particular of secondary metabolites. The activities of CytP450 could lead to the formation of potential GST substrates containing electrophilic and unstable centres such as epoxides. In plants, the xenobiotic glutathionylation is relatively well documented, the GSH-conjugates being imported into the vacuole through ABC transporters before degradation (Grzam *et al.*, 2006; 2007; Rea, 2007). A non-vacuolar degradation pathway of GSH conjugates has been also shown in *Arabidopsis thaliana* (Blum *et al.*, 2007). The catabolism of glutathione conjugates has been studied in yeast showing the potential involvement of vacuolar serine carboxypeptidases (Wunschmann *et al.*, 2010). In fungi, besides the role of GTT in peroxide detoxification (Herrero *et al.*, 2006) the functions of the different GST remain essentially elusive. As stated for plant GSTs, these proteins could be involved of course in glutathione conjugation but also in the transport of unstable metabolic intermediates using GSH as a stabilizing partner (Dixon *et al.*, 2010). For instance, exposure to HAP in different fungi leads both to the accumulation of toxic compounds in intracellular vesicles and to specific GST gene induction supporting the hypothesis of their involvement in intracellular transport (Verdin *et al.*, 2005; Thuillier *et al.*, 2011; Thion *et al.*, 2012).

Besides the formation of glutathionylated conjugates, different isoforms are able to catalyse the reverse reactions. This is particularly true for cysteine containing GSTs as GSTOs but also for several isoforms of Ure2p. As stated before, the activities of CytP450 lead in numerous cases to unstable intermediates, which could react spontaneously with the intracellular reduced glutathione (present at a millimolar range in fungi). In addition to the potential mechanistic role of GSTs in deglutathionylation (thiol transferase activity), these enzymes could also restore the initial compound allowing the pursuit of the following metabolic/catabolic steps.

Xenomic genes and neo-functionalization

Enzymes involved in detoxification pathways are usually able to accept various substrates exhibiting a broad specificity. Nevertheless, the expansion of xenomic genes found in particular in wood decaying fungi suggests a more specific function for each isoform. In both cases (CytP450s and GSTs), small changes in substrate binding sites alter strongly the specificity of the resulting enzymes. The evolution of these protein superfamilies is complex, involving gene duplication, followed by mutations of the primary structure.

Concerning fungal GSTs, few biochemical data are available in particular for basidiomycetes. An illustration is the recent evolution of PcUre2p4 and PcUre2p6 isoforms, which have gained or lost functions in spite of a very similar sequence (Thuillier *et al.*, 2011). Another example concerns GSTFuA isoforms. Most of the sequences exhibit a serine at the putative active site, which is known to be involved in glutathionylation activity. However some isoforms possess a glycine or an alanine instead of a serine suggesting functional divergence. Site-directed mutagenesis performed on one *P. chrysosporium* isoform has demonstrated that changing this serinyl residue into an alanine alters strongly the activity of the resulting protein conferring for instance a new thiol transferase activity to the mutated protein. Similarly, a functionomic approach resulted in highlighting the versatility of CytP450s from *P. chrysosporium* by screening a wide variety of compounds as substrates (Hirose *et al.*, 2011).

Fungal GSTs and CytP450s are thus very interesting models to understand protein evolution through promiscuous catalytic activities, using for instance the mutational approaches developed by Mannervik and co-workers for the characterization of mammals GSTs (Mannervik, 2012). On the other hand, distinct structural classes of fungal GSTs exhibit similar patterns of activities. It is the case for instance for some GSTFuA and Ure2p isoforms of *P. chrysosporium* suggesting a potential functional convergence between these classes. A similar convergence has been also observed for versatile CytP450, which are able to catalyse similar reactions without significant sequence similarity (Hirose *et al.*, 2011).

Xenomic genes and fungal adaptation

Globally, the xenome, described in this article through CytP450ome and GSTome analysis, is a rapidly evolving network. It is particularly true in wood decaying fungi where both families are largely expanded. The factors driving this evolution remain unclear but we postulate that these expansions should be correlated with the extraordinary ability of these fungi to deal with (and to catabolize in numerous cases) recalcitrant compounds. As for other organisms, fungal genomes display duplication regularly, and only duplications that increase fitness are selected and persist (Taylor, 2011). Concerning CytP450, a well-documented example concerns the co-evolution of plant and insect CytP450omes (Schuler, 2011). Plant CytP450s are involved in secondary metabolism leading to the production of compounds involved in plant protection, whereas insect CytP450 are mainly responsible for the catabolism of these toxic compounds. We postulate that similar relationships between trees and wood-degrading fungi could at least in part govern the evolution of xenomes of wood-degrading fungi. The wood

susceptibility to degradation is complex and depends of many factors. Among them, the wood chemical composition plays a predominant role, depending of course on the considered tree species, but also on the considered tree part and on environmental factors (biotic and abiotic) which influence the tree life.

On the other hand, wood decomposers are more or less specific for wood species and act differentially along the degradation process (Bässler *et al.*, 2012). Fungal decay of wood could thus be seen as a succession of heterotrophic events mediated by various fungal populations, which have adapted their xenome to various wood features. Besides the ability to degrade/modify wood components and in particular lignin, through extracellular oxidative and hydrolytic networks, interactions of wood-decaying fungi with their environment could be also considered through their xenomic contents.

Fungal CytP450s and GSTs are involved in numerous catabolic pathways allowing wood-decaying fungi to cope with their specific way of life. The xenome could also be a major factor governing the ability of fungi to colonize specific habitats. A recent comparative genomic analysis revealed that *P. carnosus* is highly enriched with genes encoding CytP450 compared with *P. chrysosporium* (nearly double) (Suzuki *et al.*, 2012). *P. carnosus* has been isolated almost exclusively from softwood, which is the most recalcitrant biomass resources, while *P. chrysosporium* was mainly isolated from hardwoods. Comparative growth studies on model compounds and chemical analyses of decomposed wood components showed greater tolerance of *P. carnosus* than *P. chrysosporium* to various substrates including coniferous heartwood. The significant expansion of CytP450s and GSTs in *P. carnosus* could thus be correlated with its ability to cope with the recalcitrant softwood compounds.

Conclusion

Numerous studies are devoted to the description and the characterization of extracellular enzymes involved in lignocellulose breakdown. In wood decaying fungi, the oxidative and hydrolytic systems are particularly extended demonstrating the adaptation of these fungi to the diversity of their substrates. This adaptation occurs at least in part through the development of multigenic families (Cazymes or transporters for instance). From the recent release of basidiomycete genomes, we postulate that xenomic genes could also reflect the adaptation of these fungi to their way of life and could be used as markers to correlate genomic to phenotypic variations in a context of environmental adaptation. In fact, behind the versatility of the enzymes described in this article, we postulate that some specificity drive the extension of these families. Since wood chemical composition is a major factor gov-

erning its own microbial degradation, it could play a major role in xenome variability. The next challenge will be to connect this xenomic variability to the ecology of these wood-decaying fungi to better understand how they can both degrade complex compounds and resist to the associated toxic molecules. Moreover, combining data concerning both GSTome and CytP450ome could have promising implications in biotechnological purposes such as wood preservation, fungicide resistance or biomass valorization. The yield of enzymatic hydrolysis being increased by pre-treatment with ligninolytic fungi (Giles *et al.*, 2011), the selection of strains with better degrading capabilities and resistance mechanisms to toxic molecules will provide potentially economic, social and health benefits.

Conflict of interest

None declared.

References

- Adamis, P.D., Gomes, D.S., Pinto, M.L., Panek, A.D., and Eleutherio, E.C. (2004) The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol Lett* **154**: 81–88.
- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., and Legge, R.L. (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* **19**: 771–783.
- Barreto, L., Garcera, A., Jansson, K., Sunnerhagen, P., and Herrero, E. (2006) A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism. *Eukaryot Cell* **5**: 1748–1759.
- Bässler, C., Müller, J., Svoboda, M., Lepšová, A., Hahn, C., Holzer, H., and Pouska, V. (2012) Diversity of wood-decaying fungi under different disturbance regimes – a case study from spruce mountain forests. *Biodivers Conserv* **21**: 33–49.
- Belchik, S.M., and Xun, L. (2011) S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases. *Drug Metab Rev* **43**: 307–316.
- Bezalel, L., Hadar, Y., and Cerniglia, C.E. (1997) Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2495–2501.
- Blinder, D., Coschigano, P.W., and Magasanik, B. (1996) Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178**: 4734–4736.
- Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lendzian, K., and Grill, E. (2007) Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J* **49**: 740–749.
- Bugg, T.D., Ahmad, M., Hardiman, E.M., and Rahmanpour, R. (2011) Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep* **28**: 1883–1896.
- Campoy, S., Alvarez-Rodriguez, M.L., Recio, E., Rumbero, A., and Coque, J.J. (2009) Biodegradation of 2,4,6-TCA by

- the white-rot fungus *Phlebia radiata* is initiated by a phase I (O-demethylation)-phase II (O-conjugation) reactions system: implications for the chlorine cycle. *Environ Microbiol* **11**: 99–110.
- Carreto, L., Eiriz, M.F., Gomes, A.C., Pereira, P.M., Schuller, D., and Santos, M.A. (2008) Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics* **9**: 524.
- Chave, J., Coomes, D., Jansen, S., Lewis, S.L., Swenson, N.G., and Zanne, A.E. (2009) Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecol Lett* **12**: 351–366.
- Chigu, N.L., Hirose, S., Nakamura, C., Teramoto, H., Ichinose, H., and Wariishi, H. (2010) Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1907–1916.
- Choi, J.H., Lou, W., and Vancura, A. (1998) A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 29915–29922.
- Chronopoulou, E.G., and Labrou, N.E. (2009) Glutathione transferases: emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. *Recent Pat Biotechnol* **3**: 211–223.
- Cooper, T.G. (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 223–238.
- Cornelissen, J.H., Sass-Klaassen, U., Poorter, L., van Geffen, K., van Logtestijn, R.S., van Hal, J., *et al.* (2012) Controls on coarse wood decay in temperate tree species: birth of the LOGLIFE experiment. *Ambio* **41** (Suppl. 3): 231–245.
- Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H., Amatangelo, K., Dorrepaal, E., Eviner, V.T., Godoy, O., *et al.* (2008) Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecol Lett* **11**: 1065–1071.
- Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Allison, S.D., Bauhus, J., Eggleton, P., Preston, C.M., *et al.* (2009) Plant traits and wood fates across the globe: rotted, burned, or consumed? *Global Change Biol* **15**: 2431–2449.
- Coschigano, P.W., and Magasanik, B. (1991) The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. *Mol Cell Biol* **11**: 822–832.
- Cresnar, B., and Petric, S. (2011) Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochim Biophys Acta* **1814**: 29–35.
- Danielsson, M., Lunden, K., Elfstrand, M., Hu, J., Zhao, T., Arnerup, J., *et al.* (2011) Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to *Heterobasidion* spp. infection. *BMC Plant Biol* **11**: 154.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., and Edwards, R. (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**: 338–350.
- Doddapaneni, H., and Yadav, J.S. (2005) Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol Genet Genomics* **274**: 454–466.
- Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., *et al.* (2011) Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 9166–9171.
- Eastwood, D.C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., *et al.* (2011) The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science* **333**: 762–765.
- Edwards, R., Del Buono, D., Fordham, M., Skipsey, M., Brazier, M., Dixon, D.P., and Cummings, I. (2005) Differential induction of glutathione transferases and glucosyl-transferases in wheat, maize and *Arabidopsis thaliana* by herbicide safeners. *Z Naturforsch [C]* **60**: 307–316.
- Ellison, C.E., Hall, C., Kowbel, D., Welch, J., Brem, R.B., Glass, N.L., and Taylor, J.W. (2011) Population genomics and local adaptation in wild isolates of a model microbial eukaryote. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2831–2836.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., and Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531–1545.
- Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E., and Krekling, T. (2005) Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytol* **167**: 353–375.
- Freschet, G.T., Cornelissen, J.H., van Logtestijn, R.S., and Aerts, R. (2010) Substantial nutrient resorption from leaves, stems and roots in a subarctic flora: what is the link with other resource economics traits? *New Phytol* **186**: 879–889.
- Freschet, G.T., Weedon, J.T., Aerts, R., van Hal, J.R., and Cornelissen, J.H.C. (2012) Interspecific differences in wood decay rates: insights from a new short-term method to study long-term wood decomposition. *J Ecol* **100**: 161–170.
- Garcera, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J., and Herrero, E. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem J* **398**: 187–196.
- Giles, R.L., Galloway, E.R., Gloria, D., Elliott, G.D., and Parrow, M.W. (2011) Two-stage fungal biopulping for improved enzymatic hydrolysis of wood. *Bioresour Technol* **102**: 8011–8016.
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., *et al.* (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J Biotechnol* **53**: 133–162.
- Grzam, A., Tennstedt, P., Clemens, S., Hell, R., and Meyer, A.J. (2006) Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **580**: 6384–6390.
- Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R., and Meyer, A.J. (2007) gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **581**: 3131–3138.
- Harms, H., Schlosser, D., and Wick, L.Y. (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol* **9**: 177–192.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 51–88.

- He, Y., Hoskins, J.M., and McLeod, H.L. (2011) Copy number variants in pharmacogenetic genes. *Trends Mol Med* **17**: 244–251.
- Hedh, J., Johansson, T., and Tunlid, A. (2009) Variation in host specificity and gene content in strains from genetically isolated lineages of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* s. lat. *Mycorrhiza* **19**: 549–558.
- Hernandez-Ortega, A., Ferreira, P., and Martinez, A.T. (2012) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 1395–1410.
- Herrero, E., Ros, J., Tamarit, J., and Belli, G. (2006) Glutaredoxins in fungi. *Photosynth Res* **89**: 127–140.
- Hirosue, S., Tazaki, M., Hiratsuka, N., Yanai, S., Kabumoto, H., Shinkyo, R., et al. (2011) Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **407**: 118–123.
- Hobbie, S.E. (1996) Temperature and plant species control over litter decomposition in Alaskan Tundra. *Ecol Monogr* **66**: 503–522.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., and Lundell, T. (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 871–897.
- Hundt, K., Martin, D., Hammer, E., Jonas, U., Kindermann, M.K., and Schauer, F. (2000) Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4157–4160.
- Ichinose, H. (2012) Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s. *Biol Pharm Bull* **35**: 833–837.
- Kanai, T., Takahashi, K., and Inoue, H. (2006) Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress. *J Biochem* **140**: 703–711.
- Klosterman, S.J., Subbarao, K.V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S.E., Thomma, B.P., et al. (2011) Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog* **7**: e1002137.
- Lam, L.K., Zhang, Z., Board, P.G., and Xun, L. (2012) Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases. *Biochemistry* **51**: 5014–5021.
- Le Quere, A., Eriksen, K.A., Rajashekar, B., Schutzendubel, A., Canback, B., Johansson, T., and Tunlid, A. (2006) Screening for rapidly evolving genes in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* using cDNA microarrays. *Mol Ecol* **15**: 535–550.
- Lepesheva, G.I., and Waterman, M.R. (2007) Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta* **1770**: 467–477.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., et al. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* **458**: 337–341.
- MacDonald, J., Doering, M., Canam, T., Gong, Y., Guttman, D.S., Campbell, M.M., and Master, E.R. (2011) Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3211–3218.
- McGoldrick, S., O'Sullivan, S.M., and Sheehan, D. (2005) Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol Lett* **242**: 1–12.
- Mannervik, B. (2012) Five decades with glutathione and the GSTome. *J Biol Chem* **287**: 6072–6083.
- Mannervik, B., Runarsdottir, A., and Kurtovic, S. (2009) Multi-substrate-activity space and quasi-species in enzyme evolution: Ohno's dilemma, promiscuity and functional orthogonality. *Biochem Soc Trans* **37**: 740–744.
- Mariani, D., Mathias, C.J., da Silva, C.G., Herdeiro Rda, S., Pereira, R., Panek, A.D., et al. (2008) Involvement of glutathione transferases, Gtt1 and Gtt2, with oxidative stress response generated by H₂O₂ during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep* **13**: 246–254.
- Martin, F. (2010) Parlez-vous effectors? *New Phytol* **187**: 877–879.
- Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., et al. (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol* **22**: 695–700.
- Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C.P., et al. (2009) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 1954–1959.
- Martins, M., Dairou, J., Rodrigues-Lima, F., Dupret, J.M., and Silar, P. (2010) Insights into the phylogeny or arylamine N-acetyltransferases in fungi. *J Mol Evol* **71**: 141–152.
- Masai, E., Katayama, Y., Nishikawa, S., Yamasaki, M., Morohoshi, N., and Haraguchi, T. (1989) Detection and localization of a new enzyme catalyzing the beta-aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Lett* **249**: 348–352.
- Masai, E., Ichimura, A., Sato, Y., Miyauchi, K., Katayama, Y., and Fukuda, M. (2003) Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. *J Bacteriol* **185**: 1768–1775.
- Mathieu, Y., Prosper, P., Buee, M., Dumarcay, S., Favier, F., Gelhaye, E., et al. (2012) Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. *J Biol Chem* PMID: 23007392.
- Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarcay, S., et al. (2011) Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-phydroquinone reductase belongs to a new structural class. *J Biol Chem* **286**: 9162–9173.
- Meux, E., Prosper, P., Masai, E., Mulliert, G., Dumarcay, S., Morel, M., Didierjean, C., Gelhaye, E., and Favier, F. (2012) Sphingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase omega class. *FEBS Lett* **586**: 3944–3950.
- Mizutani, M., and Ohta, D. (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 291–315.

- Morel, M., Ngadin, A.A., Droux, M., Jacquot, J.P., and Gelhaye, E. (2009) The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell Mol Life Sci* **66**: 3711–3725.
- Murat, C., Zampieri, E., Vallino, M., Daghighi, S., Perotto, S., and Bonfante, P. (2011) Genomic suppression subtractive hybridization as a tool to identify differences in mycorrhizal fungal genomes. *FEMS Microbiol Lett* **318**: 115–122.
- Myung, K., Narciso, J.A., and Manthey, J.A. (2008) Removal of furanocoumarins in grapefruit juice by edible fungi. *J Agric Food Chem* **56**: 12064–12068.
- Neafsey, D.E., Barker, B.M., Sharpton, T.J., Stajich, J.E., Park, D.J., Whiston, E., et al. (2010) Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. *Genome Res* **20**: 938–946.
- Nelson, D., and Werck-Reichhart, D. (2011) A P450-centric view of plant evolution. *Plant J* **66**: 194–211.
- Ning, D., Wang, H., and Zhuang, Y. (2010) Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation* **21**: 297–308.
- Ohm, R.A., de Jong, J.F., Berends, E., Wang, F., Wosten, H.A., and Lugones, L.G. (2010) An efficient gene deletion procedure for the mushroom-forming basidiomycete *Schizophyllum commune*. *World J Microbiol Biotechnol* **26**: 1919–1923.
- Ohta, T. (1991) Multigene families and the evolution of complexity. *J Mol Evol* **33**: 34–41.
- Omura, T., and Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **237**: 1375–1376.
- Otsuka, Y., Sonoki, T., Ikeda, S., Kajita, S., Nakamura, M., and Katayama, Y. (2003) Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyzes the specific and hydrolytic cleavage of lignin guaiacylglycerol beta-aryl ether linkages. *Eur J Biochem* **270**: 2353–2362.
- Paine, A.J. (1995) Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance. *Hum Exp Toxicol* **14**: 1–7.
- Ralph, S.G., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zelnik, J.A., Nelson, C.C., et al. (2006) Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant Cell Environ* **29**: 1545–1570.
- Rea, P.A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 347–375.
- Reddy, G.V., and Gold, M.H. (2000) Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* **146** (Part 2): 405–413.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**: 444–454.
- Rineau, F., Roth, D., Shah, F., Smits, M., Johansson, T., Canback, B., et al. (2012) The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. *Environ Microbiol* **14**: 1477–1487.
- Sanchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* **27**: 185–194.
- Schuler, M.A. (2011) P450s in plant–insect interactions. *Biochim Biophys Acta* **1814**: 36–45.
- Sharpton, T.J., Stajich, J.E., Rounsley, S.D., Gardner, M.J., Wortman, J.R., Jordan, V.S., et al. (2009) Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* **19**: 1722–1731.
- Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H., and Wariishi, H. (2005) Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. *Proteomics* **5**: 3919–3931.
- Sprockett, D.D., Piontkivska, H., and Blackwood, C.B. (2011) Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens. *Gene* **479**: 29–36.
- Stourman, N.V., Branch, M.C., Schaab, M.R., Harp, J.M., Ladner, J.E., and Armstrong, R.N. (2011) Structure and function of YghU, a nu-class glutathione transferase related to YfcG from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **50**: 1274–1281.
- Subramanian, V., and Yadav, J.S. (2009) Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5570–5580.
- Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E., and Cerniglia, C.E. (1991) Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3310–3316.
- Suzuki, H., Macdonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., et al. (2012) Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosa* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. *BMC Genomics* **13**: 444.
- Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y.W., and Yadav, J.S. (2010) Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochem Biophys Res Commun* **399**: 492–497.
- Talbot, J.M., Allison, S.D., and Treseder, K.K. (2008) Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Funct Ecol* **22**: 955–963.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731–2739.
- Taylor, J.W. (2011) The poetry of mycological accomplishment and challenge. *Fungal Biol Rev* **25**: 3–13.
- Thion, C., Cebon, A., Beguiristain, T., and Leyval, C. (2012) Long-term in situ dynamics of the fungal communities in a multi-contaminated soil are mainly driven by plants. *FEMS Microbiol Ecol* **82**: 169–181.
- Thuillier, A., Ngadin, A.A., Thion, C., Billard, P., Jacquot, J.P., Gelhaye, E., and Morel, M. (2011) Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. *Int J Evol Biol* **2011**: 938308.

- Tirosh, I., and Barkai, N. (2007) Comparative analysis indicates regulatory neofunctionalization of yeast duplicates. *Genome Biol* **8**: R50.
- Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., et al. (2010) Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3599–3610.
- Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., BonDurant, S.S., Sabat, G., Ralph, J., et al. (2011) Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4499–4507.
- Verdin, A., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., and Durand, R. (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ Pollut* **133**: 283–291.
- Wadlington, M.C., Ladner, J.E., Stourman, N.V., Harp, J.M., and Armstrong, R.N. (2009) Analysis of the structure and function of YfcG from *Escherichia coli* reveals an efficient and unique disulfide bond reductase. *Biochemistry* **48**: 6559–6561.
- Weedon, J.T., Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H., Zanne, A.E., Wirth, C., and Coomes, D.A. (2009) Global meta-analysis of wood decomposition rates: a role for trait variation among tree species? *Ecol Lett* **12**: 45–56.
- Wickner, R.B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**: 566–569.
- Wong, D.W. (2009) Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* **157**: 174–209.
- Wunschmann, J., Krajewski, M., Letzel, T., Huber, E.M., Ehrmann, A., Grill, E., and Lendzian, K.J. (2010) Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. *Phytochemistry* **71**: 54–61.
- Xun, L., Belchik, S.M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H., Sanchez, E., et al. (2010) S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. *Biochem J* **428**: 419–427.
- Yalcin, B., Wong, K., Agam, A., Goodson, M., Keane, T.M., Gan, X., et al. (2011) Sequence-based characterization of structural variation in the mouse genome. *Nature* **477**: 326–329.
- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., et al. (2004) Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1253–1262.
- Zhang, W., Duan, S., Bleibel, W.K., Wisel, S.A., Huang, R.S., Wu, X., et al. (2009) Identification of common genetic variants that account for transcript isoform variation between human populations. *Hum Genet* **125**: 81–93.

Supporting information

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

Table S1. GST isoform number in basidiomycetes and repartition within the various subclasses. Sequences were retrieved by BLAST search from the JGI database and the repartition was done by a phylogenetic analysis using MEGA5.

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

Supplemental Table 1: Basidiomycete GST isoform number and repartition within the various subclasses. Sequences were retrieved by BLAST search from the JGI database and the repartition was done by a phylogenetic analysis using MEGA5.

Fungal specie	etherase-like	Ure2p		GTT1	GTT2	PHI	GHR	GSTO
		Ure2pA	Ure2pB					
<i>Agaricus bisporus</i>	15	0	4	0	0	9	1	3
<i>Auricularia delicata</i>	13	0	1	3	1	5	3	4
<i>Bjerkandera adusta</i>	6	16	2	1	2	1	1	3
<i>Botryobasidium botryosum</i>	12	0	4	1	2	10	1	0
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	4	6	3	4	2	2	1	10
<i>Coniophora puteana</i>	14	0	4	2	1	10	2	11
<i>Coprinopsis cinerea</i>	14	0	3	4	2	7	2	3
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	0	2	0	1	0	2	1
<i>Dacryopinax sp</i>	2	6	3	4	2	1	1	2
<i>Dichomitus squalens</i>	6	6	2	1	1	5	2	10
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	16	0	2	1	3	7	3	6
<i>Fomitopsis pinicola</i>	10	5	2	1	2	2	2	4
<i>Galerina marginata</i>	13	0	3	3	2	4	1	3
<i>Ganoderma sp</i>	5	3	2	1	2	5	2	7
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	7	7	1	1	2	2	3	3
<i>Gymnopus luxurians</i>	10	0	3	2	2	2	1	5
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	10	0	2	1	1	2	1	3
<i>Heterobasidion annosum</i>	7	0	2	1	3	2	2	4
<i>Hydnomerulius pinastri</i>	8	0	2	1	1	10	1	6
<i>Hypholoma sublateritium</i>	18	0	2	0	1	6	2	4
<i>Jaapia argillacea</i>	5	3	1	2	4	2	2	5
<i>Laccaria bicolor</i>	3	0	1	1	1	9	1	2
<i>Malassezia globosa</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Melampsora laricis-populina</i>	0	3	1	0	2	0	1	0
<i>Paxillus involutus</i>	6	0	1	0	2	5	1	3
<i>Phanerochate carnosa</i>	4	20	1	1	1	2	2	10
<i>Phanerochate chrysosporium</i>	5	8	1	0	2	1	2	6
<i>Phlebia brevispora</i>	9	4	4	0	2	1	1	3
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	7	6	1	1	1	1	2	5
<i>Pleurotus ostreatus</i>	6	0	1	1	2	2	1	4
<i>Plicaturopsis crispa</i>	6	0	2	2	4	2	3	2
<i>Postia Placenta</i>	11	13	3	2	5	3	3	4
<i>Puccinia graminis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Punctularia strigosozonata</i>	5	1	1	1	2	2	4	3
<i>Rhodotorula graminis</i>	0	1	0	2	2	0	1	1
<i>Schizophyllum commune</i>	7	0	0	3	2	4	3	1
<i>Serpula lacrymans</i>	20	0	2	1	1	5	1	3
<i>Serpula lacrymans var-shastensis</i>	7	0	2	1	1	10	1	2
<i>Sporobolomyces roseus</i>	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>Stereum hirsutum</i>	12	0	3	1	3	7	2	5
<i>Trametes versicolor</i>	6	8	2	1	2	0	3	10
<i>Tremella mesenterica Fries</i>	0	0	1	1	3	4	1	0
<i>Ustilago maydis</i>	0	0	3	2	1	0	2	0
<i>Wallemia sebi</i>	0	0	2	1	1	0	2	0
<i>Wolfiporia cocos</i>	5	7	2	1	2	2	2	4

3. Les glutathion transférases

3.1 Historique et classification

Les glutathion transférases sont des enzymes essentielles impliquées dans le métabolisme des composés électrophiles de la cellule. Enzymes de phase II, les GST interviennent dans la conjugaison du glutathion à des molécules le plus souvent toxiques, en général hydrophobes et présentant un centre électrophile. Cette réaction a pour but d'augmenter l'hydrosolubilité de ces molécules toxiques et d'entraîner leur séquestration dans la vacuole ou leur excrétion par des transporteurs de phase III (Coleman et al. 1997). Egalement impliquées dans les mécanismes de défense des organismes contre les situations de stress, ces enzymes ont été décrites pour la première fois chez le rat en 1961 (Booth et al. 1961), suite à la mise en évidence de la conjugaison enzymatique du glutathion sur des composés halogénés dans des extraits de foie. Leur présence chez les organismes photosynthétiques fut mise en évidence quelques années plus tard avec la découverte d'une activité responsable de la conjugaison du glutathion à l'atrazine protégeant ainsi les cultures de sorgho contre cet herbicide (Lamoureux et al. 1970). Très rapidement un grand nombre d'enzymes partageant des fonctions similaires (glutathion transférases) vis-à-vis de différents substrats électrophiles ont été décrites. Alors la nomenclature originale a été abandonnée au profit d'une nomenclature à trois lettres « GST » (Habig et al. 1974; Habig et al. 1974).

Les glutathion transférases constituent une famille multigénique dont les membres, le plus souvent dimériques, sont répartis en fonction de leur homologie de séquence peptidique en différentes classes. Le nombre et la diversité des GST rendent la classification générale très complexe, néanmoins il est possible de différencier trois grands types de GST (Pemble et al. 1996; Jakobsson et al. 1999; Frova 2006):

- Les GST solubles (ou cytosoliques) qui constituent la classe la plus étendue avec de nombreuses isoformes caractérisées dans toutes les branches du vivant.
- Les GST microsomales (mGST) appartenant à la classe des *Membrane Associated Proteins in Eicosanoids and Glutathione metabolism* (MAPEG).
- Les GST Kappa identifiées dans les mitochondries et les peroxysomes, qui bien que solubles, ne partagent pas de caractéristiques structurales avec les GST cytosoliques.

3.2 Les GST cytosoliques

A ce jour, les GST cytosoliques forment la classe la plus abondante comptant parfois plusieurs dizaines de membres chez certaines espèces. Bien que possédant de nombreuses caractéristiques communes, ces enzymes présentent une grande variabilité d'un point de vue structural et enzymatique. Elles sont classées, principalement en fonction de leur séquence peptidique mais également selon leurs propriétés fonctionnelles et structurales (Tableau 2). Alors que certaines classes ont été décrites dans plusieurs règnes (Oméga, Sigma, Thêta, Zêta), d'autres sont retrouvées exclusivement chez les mammifères (Alpha, Mu et Pi), les insectes (Delta et Epsilon), les bactéries (Beta et Chi), les champignons (Ure2p, GTT, MAK16, EF1B), ou encore les plantes (Tau, Lambda) (Armstrong 1997; Vuilleumier 1997; Sheehan et al. 2001; Dixon et al. 2002; Enayati et al. 2005; Hayes et al. 2005; McGoldrick et al. 2005; Blanchette et al. 2007; Morel et al. 2009).

Tableau 2. Classification des principales GST cytosoliques

Classe	Origine	Conformation tridimensionnelle	Résidu catalytique
Alpha	Mammifères	Dimère	Tyr
Bêta	Bactéries	Dimère	Cys
EF1Bγ	Champignons	Dimère	Tyr
Delta	Insectes	Dimère	Ser
Epsilon	Insectes	Dimère	Ser
Zêta	Animaux, plantes et bactéries	Dimère	Ser
Thêta	Animaux, plantes et bactéries	Dimère	Ser
Mu	Mammifères	Dimère	Tyr
Nu	Nématodes	?	Tyr
Pi	Mammifères	Dimère	Tyr
Rho	Poissons	Dimère	?
Sigma	Animaux et algues	Dimère	Tyr
Tau	Plantes	Dimère	Ser
Phi	Plantes, champignons	Dimère	Ser
Chi	Bactéries	Dimère	?
Oméga	Mammifères, insectes et champignons	Dimère	Cys
DHAR	Plantes	Monomère	Cys
GHR	Champignons et bactéries	Dimère	Cys
GSTFuA	Champignons	Dimère	Ser
GTT	Champignons	Dimère	?
TCHQD	Bactéries et plantes	Dimère	?
Ure2p	Champignons et bactéries	Dimère	Asn
Lambda	Plantes	Monomère	Cys

3.2.1 Organisation tridimensionnelle

En général, les GST sont composées de deux sous-unités et elles possèdent une masse moléculaire d'environ 50 kDa sous forme dimérique. Seules les GST de la classe lambda et DHAR sont actives sous forme monomérique et ont une taille variant de 25 à 37 kDa. La présence de deux sites bien définis, chacun spécifique d'un substrat dans chaque sous-unité constitue le dénominateur commun à toutes ces protéines, qu'elles soient monomériques ou dimériques (Figure 10). En effet, le point commun des enzymes de la superfamille des glutathion transférases est la présence d'un site appelé site G, situé du côté N-terminal, impliqué dans la reconnaissance et la fixation du glutathion (GSH) et d'un site appelé site H, quant à lui situé du côté C-terminal, responsable de la reconnaissance du substrat électrophile (Sheehan *et al*, 2001).

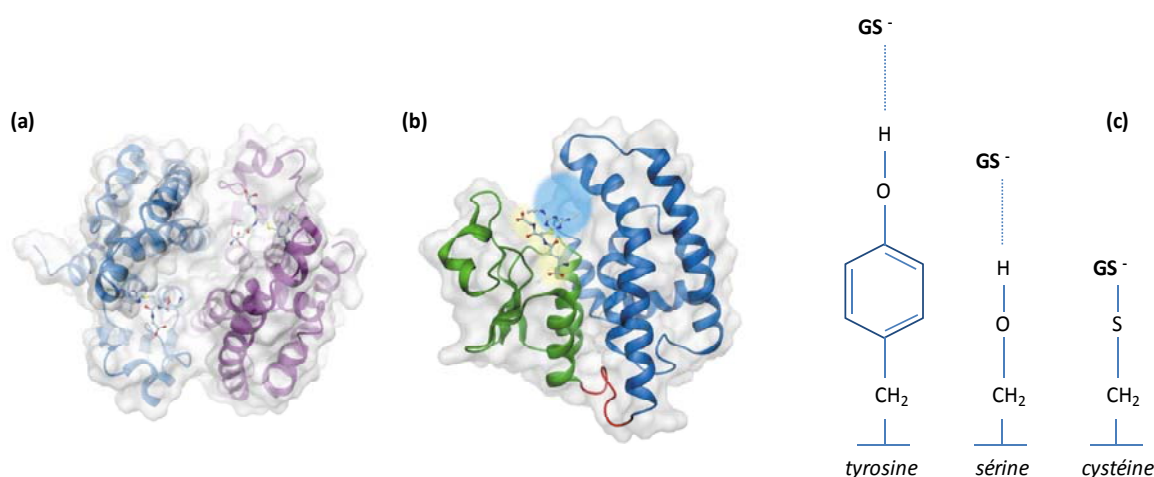


Figure 10. Représentation de la structure de la GSTF1 de maïs et des différents modes d'interaction des GST avec le glutathion (Sheehan *et al*. 2001; Dixon *et al*. 2002)

(a) Représentation schématisée de la structure dimérique de la GSTF1 (PDB : 1BYE). Les domaines N-terminal et C-terminal composant chaque monomère sont représentés respectivement en vert et en bleu, ainsi que le domaine de liaison en rouge (b). Le site G, surligné en jaune contient une molécule de glutathion formant une liaison covalente avec l'atrazine (substrat de la protéine), située au sein du site H surligné en bleu. (c) Selon la classe de GST considérée, l'interaction entre l'anion thiolate du glutathion et l'enzyme peut se faire via l'établissement de liaison hydrogène avec les chaînes latérales de résidus tyrosine ou sérine soit de manière covalente via l'établissement d'un pont disulfure avec une cystéine.

Le site G relativement conservé possède un repliement de type thiorédoxine $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$. Il est responsable de l'abaissement du pKa du groupement sulfhydryle du glutathion pour former l'anion thiolate hautement réactif, qui est alors stabilisé par les chaînes latérales des résidus voisins par des liaisons hydrogène. L'anion thiolate, forme réactive du glutathion, présente des

propriétés nucléophiles et peut ainsi attaquer des substrats électrophiles (Dirr et al. 1994; Armstrong 1997). Les résidus impliqués dans l'interaction directe avec le glutathion varient selon les classes de GST considérées (Figure 10). Cependant leur positionnement au sein de la structure primaire est relativement conservé (Figure 11) (Atkinson and Babbitt 2009), ce qui suggère fortement que l'orientation, la fixation et l'ionisation du GSH au sein du site G sont des éléments essentiels pour les différentes réactions mentionnées ci-dessous. Par exemple dans le cas des classes Alpha, Mu, Pi, ou encore Sigma, le résidu impliqué dans l'interaction avec l'anion thiolate du glutathion via une liaison hydrogène est localisé à la fin du bras α . Chez les classes Tau, Phi, Zêta, Thêta ou encore Omega ce résidu est situé au début de l'hélice α . Bien que l'orientation du GSH dans le site actif des GST, dont les structures ont été résolues, soit approximativement la même entre les différentes isoenzymes, il existe quelques différences entre les partenaires formant les liaisons hydrogène. En effet, pour la plupart des classes de GST, l'anion thiolate est stabilisé soit par un résidu tyrosine soit par une sérine. Il en résulte un abaissement du pKa du groupement thiol du glutathion de 8.7 à environ 6.2, permettant une activité à pH physiologique (Kolm et al. 1992; Kong et al. 1992; Wang et al. 1992; Ji et al. 1995; Labrou et al. 2001). L'importance de ces acides aminés a été confirmée par mutagenèse dirigée, et bien que chacun des mutants conserve l'organisation tridimensionnelle de l'enzyme sauvage, l'activité catalytique a été perdue.

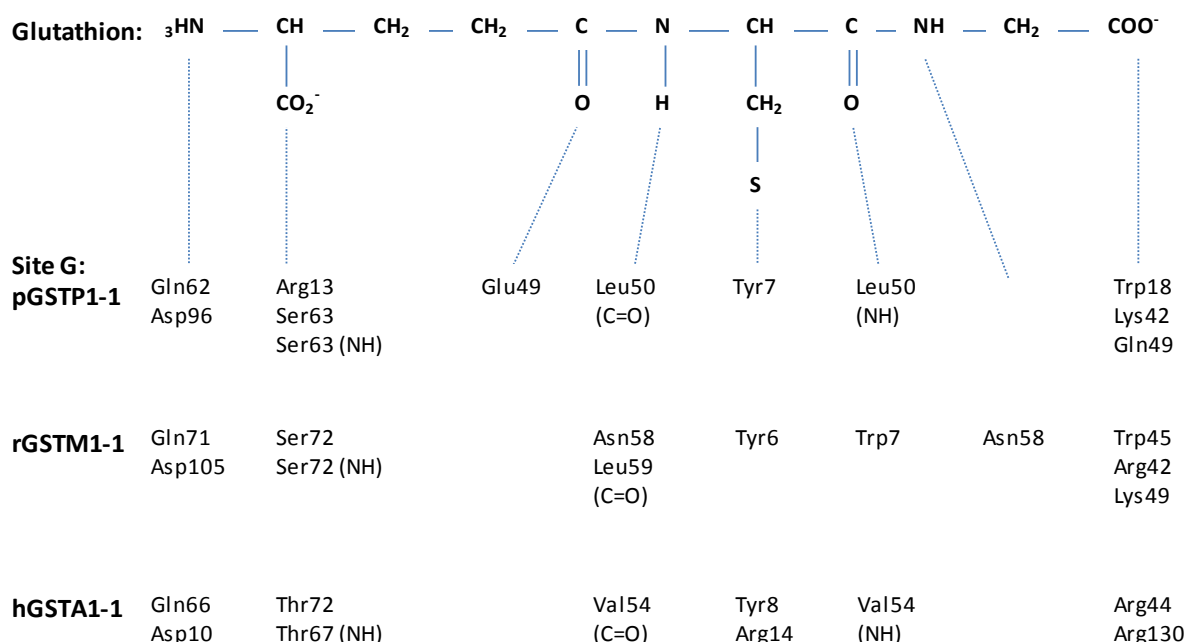


Figure 11. Représentation schématique des résidus impliqués dans la reconnaissance du glutathion chez trois GST de mammifère (h :homme ; p :porc ; c :rat) (Dirr et al. 1994)

A l'inverse, le site H, formé d'acides aminés non conservés entre les différentes classes de GST, est situé dans l'extension C-terminal des GST composée essentiellement d'hélices α en nombre variable. Cinq hélices forment le domaine C-terminal des GST Pi et Mu (Reinemer et al. 1991; Ji et al. 1992) contenant le site H, tandis que six hélices ont été décrites dans le cas de la classe Alpha (Sinning et al. 1993). Le site H est impliqué dans la reconnaissance du substrat et la grande variabilité de ce site reflète le vaste spectre de substrats plus ou moins toxiques pris en charge par les GST. En effet, à la différence du site G, le site H ou plus généralement le domaine C-terminal des GST est peu conservé, et ce phénomène s'accroît lorsque différentes classes sont comparées (Dirr et al. 1994; Wilce et al. 1994). L'interface des deux sous-unités constituant le dimère forme une gorge accessible au solvant dont la taille et l'orientation dépendent des sites G et H qui de part leur propriétés physico-chimiques vont régir les spécificités de substrat. La composition catalytique du site G (cystéine, sérine ou tyrosine) et l'hyper variabilité du site H ont donc joué un rôle crucial au cours de l'évolution, permettant des fonctions différentes, et amenant une diversité de substrats potentiels (Dirr et al. 1994; Wilce and Parker 1994; Salinas and Wong 1999).

3.2.2 Fonctions des GST cytosoliques

Les GST forment une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés toxiques d'origine exogène et endogène (xénobiotiques, endobiotiques), à travers la fixation d'une molécule de GSH sur ces composés. Les GST ont donc été largement étudiées pour leur capacité à détoxifier les drogues, mais certaines classes de GST possèdent également des activités peroxydase, isomérase, thiol-transférase, ainsi que des fonctions non-catalytiques, comme l'interaction avec différents ligands ou la modulation de la signalisation cellulaire.

3.2.2.1- Transfert de glutathion et détoxification

Les GST ont été découvertes initialement grâce à leur action de détoxification de certains xénobiotiques, depuis la majorité des investigations sur les GST a depuis porté sur ce processus. Il est maintenant établi que de nombreux organismes possèdent un système de détoxification intracellulaire composé de trois phases dans le but d'éliminer aussi bien les toxines endogènes, que les substances exogènes présentes par exemple dans les herbicides (Coleman et al. 1997).

Lors de la première phase, des enzymes comme les monooxygénases cytochrome P450 (CytP450) catalysent des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse afin d'introduire ou d'exposer un groupement fonctionnel (ex : époxyde) à la surface de la molécule. La phase II a pour but de conjuguer l'électrophile à un groupement (glutathion, acétyle, méthyle ou encore acide glucuronique) afin que ce 'tag' soit reconnu par des transporteurs lors d'une troisième phase qui entraîne l'internalisation du composé dans la vacuole ou sa sécrétion dans le cas des modèles animaux et fongiques (DeRidder et al. 2002; Harms et al. 2011). Les GST utilisent le glutathion comme substrat de conjugaison générant ainsi des molécules plus hydrophiles et plus facilement excrétables. Ces réactions de transfert du GSH sont catalysées par la majorité des classes de GST cytosoliques (Delta, Epsilon, Alpha, Pi, Gamma, Tau, Zêta ou encore Phi), et l'expansion de ces classes est impliquée dans l'adaptation des organismes à leurs niches écologiques, notamment dans la détoxification de xénobiotiques environnementaux.

3.2.2.2- L'exemple de la tolérance aux herbicides, insecticides et autres agents toxiques

De nombreuses études ont porté sur les GST de plantes du fait de leurs rôles dans la résistance aux herbicides. Ces composés principalement utilisés en agriculture afin d'éviter la prolifération des mauvaises herbes dans les cultures sont épandus sous forme de poudre ou de granulés sur les sols. Les molécules rencontrées le plus souvent sont les suivantes: paraquat, diquat, simazine, atrazine, aminotriazole, thiocyanates minéraux, glyphosate, glufosinate, etc. Ces composés agissent en pénétrant soit par le feuillage, soit par les racines. Ils peuvent inhiber la synthèse de métabolites essentiels pour la survie de l'organisme comme les acides aminés ou encore les lipides. Mais pour la majorité d'entre eux, ils bloquent la photosynthèse entraînant la mort de la plante (Jeffery *et al.*, 1994). Il est reconnu que les GST de plantes (Tau et Phi) sont impliquées dans la tolérance des plantes à certains herbicides. Il existe aussi des variations entre les niveaux de GST des différents organismes. Ainsi les plantes exprimant des taux plus élevés de certaines isoformes peuvent être bien plus résistantes à certains herbicides. Par exemple, le maïs est tolérant face à l'atrazine, car il contient de nombreuses GST capables de conjuguer cet herbicide au glutathion. En revanche certaines espèces (pois, blé) ne possèdent pas cette activité et sont donc sensibles à l'atrazine. De la même manière, les GST catalysant la formation de conjugués entre le fluorodifen et le glutathion sont plus représentées dans des espèces

résistantes telles que le coton ou les céréales que dans les espèces sensibles comme par exemple la tomate (Marrs 1996).

Concernant les mammifères, les réactions de conjugaison, catalysées essentiellement par les classes Alpha, Mu et Pi, ont un rôle prépondérant dans la détoxification de composés cancérogènes tels que les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) (Figure 12). Chez la souris, deux gènes codant pour deux GST de la classe Pi ont été identifiés comme principaux responsables de la détoxification de composés cancérogènes dérivés du benzo- α -pyrène (Hu et al. 1997; Hu and Singh 1997). Par ailleurs, l'étude de mutants pour les GST de la classe Pi confirme leur propriété anti-tumorale liée à leur rôle dans la détoxification de xénobiotiques (Henderson et al. 1998). Chez les insectes, les GST sont également impliquées dans la résistance vis-à-vis des molécules toxiques (insecticides). Notamment les classes Delta et Epsilon qui sont impliquées dans la détoxification de composés phosphatés ou chlorés (Clark et al. 1986; Tang and Tu 1994; Hemingway 2000; Wei et al. 2001).

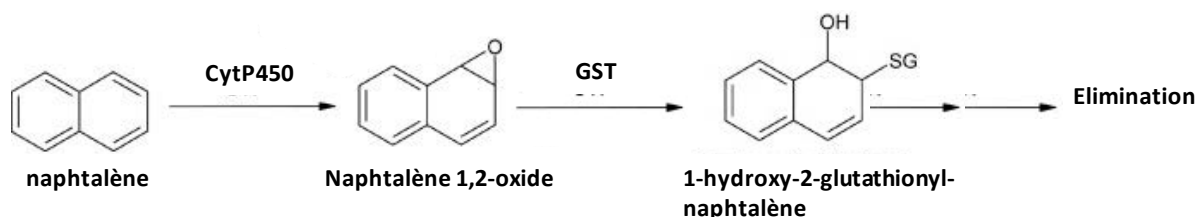


Figure 12. Détoxification cellulaire du naphthalène chez les mammifères (Mitchell et al. 2000; Bogen et al. 2008)

3.2.2.3- Protection contre le stress oxydant

Une autre fonction des GST est la protection cellulaire des dommages causés par le stress oxydant. En effet, les GST sont induites par un grand nombre de stimuli et accumulées en réponse à des stress tels que l'infection par des microorganismes, les écarts thermiques ou encore la pollution aux métaux lourds (Marrs 1996). Néanmoins, le rôle exact de ces protéines n'est encore pas totalement élucidé. Une des hypothèses principales concernant leur implication

dans les mécanismes de réponse aux stress provient du fait que certaines GST appartenant aux classes Alpha, Mu, Pi, Gamma, Thêta, Zeta, Delta, Epsilon, Phi et Tau possèdent une activité peroxydase GSH dépendante *in vitro*, permettant la réduction d'hydroperoxydes organiques d'acides gras et d'acides nucléiques (Tang and Tu 1994; Marrs 1996; Hurst et al. 1998). Cette fonction a également été démontrée *in vivo* chez certains jeunes plants de tabac qui étaient plus résistants face à un stress que les plants sauvages suite à la surexpression d'une GST Tau présentant une forte activité peroxydase (Roxas et al. 1997). De plus certaines GST sont impliquées dans la détoxification de composés issus de la dégradation des lipides peroxydés hautement toxiques, tels que le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (Figure 13). Le conjugué formé entre le HNE et le glutathion est exporté hors de la cellule en vue de sa dégradation en acide mercapturique (Winter et al. 1987; Petras et al. 1995). Considérant la capacité des GST à catalyser le transfert de glutathion sur le HNE, ces enzymes sont impliquées dans la régulation de la concentration intracellulaire de ces produits, et ainsi jouent un rôle déterminant dans la protection face au stress oxydant (Hubatsch et al. 1998; Hurst et al. 1998; Singh et al. 2001; Balogh and Atkins 2011).

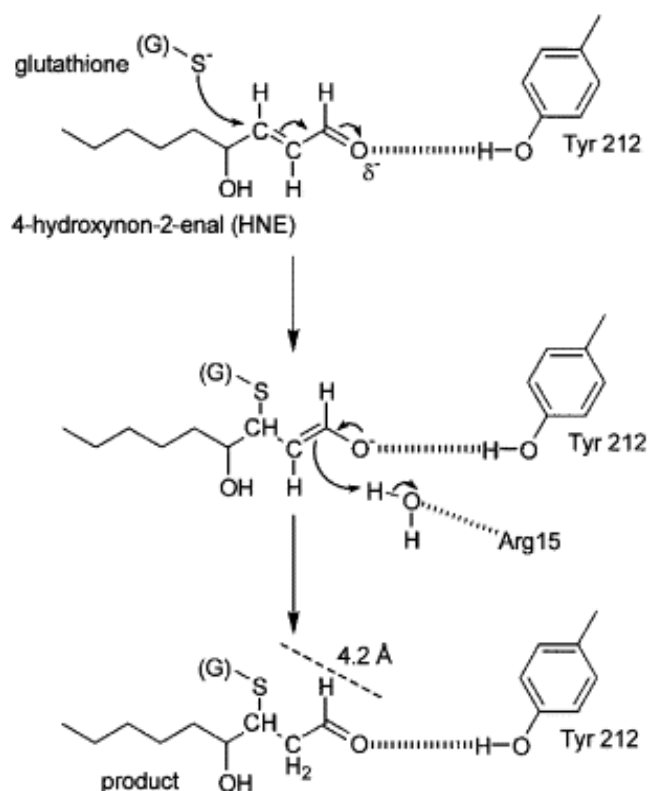


Figure 13. Mécanisme de glutathionylation du HNE proposé (Bruns et al. 1999)

Plus récemment, une étude transcriptomique réalisée sur des racines d'*A. thaliana* soumises à des stress métalliques a révélé l'implication des GST dans la résistance face à ce type de stress (Kochian et al. 2004). Il semble donc que les stress qui s'accompagnent d'une augmentation du taux d'espèces oxygénées réactives dans les cellules, entraînent entre autre l'induction de gènes codants pour des GST. Par ailleurs, deux GST humaines de la classe Oméga présentent *in vitro* des activités arséniate réductase, monométhyle arséniate réductase et diméthyle arséniate réductase (Zakharyan and Aposhian 1999; Zakharyan et al. 2001; Aposhian et al. 2004). De la même manière, la transcription de 15 GST dont 12 de la classe Tau est induite lors d'une surexposition à l'arsenic (V) chez le riz, suggérant un rôle dans la détoxification de l'As(V) (Norton et al. 2008). Un autre rôle pour les GST concerne leur intervention dans la signalisation cellulaire. En effet, il a été montré que, lors d'une exposition aux rayons UV, les GST sont impliquées dans l'induction des gènes de biosynthèse de pigments de type flavonoïdes (Loyall et al. 2000), connus principalement pour leur activité antioxydante.

3.2.2.4- Réactions d'isomérisation

Les GST sont également impliquées dans des réactions d'isomérisation de métabolites spécifiques. Le mécanisme proposé implique la formation transitoire d'un adduit de glutathion, l'isomérisation spontanée du composé, et finalement la libération de l'isomère et du GSH (Figure 14). Ainsi une GST Zêta d'*A. thaliana*, conservée chez les mammifères, catalyse l'isomérisation *cis-trans* GSH dépendante du maléylacétoacétate en fumarylacétoacétate, une étape clé dans le catabolisme de la tyrosine et de la phénylalanine (Thom et al. 2001; Fernandez-Canon et al. 2002). Par ailleurs, une GST bactérienne présentant de grandes similitudes (identité > 40 %) avec les enzymes de la classe Zêta catalyse la réaction analogue sur le maléylpyruvate (Marsh et al. 2008). D'autres activités isomérases impliquant différentes classes de GST ont été mises en évidence sur différents substrats. Ainsi, une GST Alpha humaine est impliquée dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, en catalysant l'isomérisation d'intermédiaires de synthèse (Fukai et al. 1992; Johansson and Mannervik 2001), et des GST de la classe Pi pourraient jouer un rôle dans l'isomérisation de l'acide rétinoïque au cours de l'organogénèse (Chen and Juchau 1998).

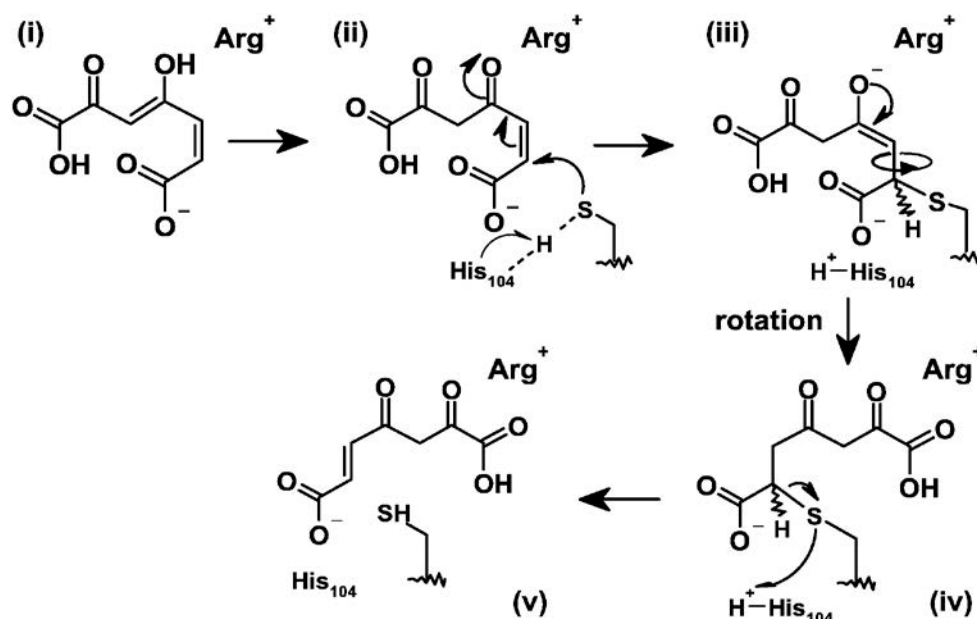


Figure 14. Mécanisme d'isomérisation du maléylpyruvate proposé par Marsh et al. 2008

Dans un premier temps activé par un acide aminé jouant le rôle de base, le glutathion va attaquer son substrat induisant la formation d'un énolate qui est stabilisé par une arginine conservée dans plus de 200 isoformes. Un réarrangement électronique induit alors le passage en conformation trans puis la libération du glutathion est favorisée par un donneur d'électron.

3.2.2.5- Liaison de ligands

Certaines GST ont la capacité de lier des composés hydrophobes de façon non covalente, agissant ainsi comme des protéines de liaison et/ou de transport. Des études structurales suggèrent qu'il pourrait exister un troisième site entre les deux sous-unités du dimère, appelé site de liaison, et conçu pour la fonction ligandine de ces protéines (McTigue et al. 1995; Ji et al. 1996). Cette activité non-catalytique de fixation des GST sur des composés endogènes a été démontrée pour une grande variété de molécules (bilirubine, hèmes, stéroïdes, colorants, ou encore carcinogènes) (Litwack et al. 1971; Ketterer et al. 1983). Leur fonction exacte n'a pas encore été déterminée mais en intervenant dans le stockage et le transport de ces molécules, les GST pourraient limiter les dommages cellulaires engendrés par des composés cytotoxiques et génotoxiques (Axarli et al. 2004). Les GST Alpha ont la capacité de lier efficacement la bilirubine (Kamisaka et al. 1975; Tipping and Ketterer 1981), tandis que les membres de la classe Mu peuvent prendre part au transport d'hème des mitochondries vers le réticulum endoplasmique (Senjo et al. 1985). De part cette capacité de liaison non enzymatique vis-à-vis d'un large éventail de ligands (acides biliaires, acides gras, hèmes, stéroïdes, peptides, etc.), les GST pourraient

remplir la même fonction que l'albumine dans le sang (Litwack et al. 1971; Tipping et al. 1978). Concernant les organismes photosynthétiques, de nombreuses études chez les plantes ont mis à jour la possibilité pour les GST de se lier à des ligands hydrophobes de structures variées, tels que les porphyrines, les flavonoïdes, et certaines hormones (auxine, cytokinine) (Smith et al. 2003; Dixon et al. 2008).

3.2.2.6- Activité réductase glutathion dépendante

Certaines GST, telles que les Oméga, Lambda ou encore DHAR, possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes des autres GST cytosoliques. Tout d'abord, ces enzymes ne sont capables de catalyser ni la conjugaison du glutathion, ni la réduction des peroxydes, ni l'isomérisation du maléylacétoacétate. Par ailleurs, elles possèdent une cystéine réactive en lieu et place de l'acide aminé hydroxylé (sérine, tyrosine) majoritairement présent chez les GST cytosoliques. *In vitro*, toutes ces classes d'enzymes fonctionnent en tant que thiol-transférases sur des substrats tels que l'hydroxyéthyl disulfide (HED) (Ishikawa et al. 1998; Caccuri et al. 2002; Dixon et al. 2002; Whitbread et al. 2005). La cystéine catalytique est essentielle à ce type d'activité puisqu'elle permet de réaliser une attaque nucléophile, à l'instar des glutarédoxines. D'une manière générale, les GST à cystéine catalytique sont capables de catalyser des réductions glutathion dépendantes sur un panel de substrats variés. En effet, ces enzymes sont impliquées dans le recyclage de molécules antioxydantes par la réduction du déhydroascorbate en ascorbate, notamment pour la classe DHAR, ou dans diverses voies métaboliques via des réactions de déglutathionylation (glutathion lyases) (Figure 15). Ainsi, en catalysant la déglutathionylation d'un dérivé du pentachlorophénol, une GST est importante dans l'élimination de cette molécule toxique chez *Sphingobium chlorophenolicum* (Huang et al. 2008; Xun et al. 2010). De la même manière, LigG, une GST à cystéine catalytique chez la bactérie lignivore *Sphingobium sp.*, joue un rôle primordial dans la dégradation de la lignine en catalysant la deuxième étape lors du clivage des liaisons β -aryl ether (Masai et al. 2003). Concernant les plantes, les GST Lambda d'*A. thaliana* ont la capacité de déglutathionyer des dérivés de quercétine, et seraient impliquées dans la régénération des flavonoïdes oxydés en condition de stress (Dixon and Edwards 2010). Chez les mammifères, les GST Oméga présentent une activité glutathion lyase vis-à-vis de dérivés acétophénoliques (Board et al. 2008).

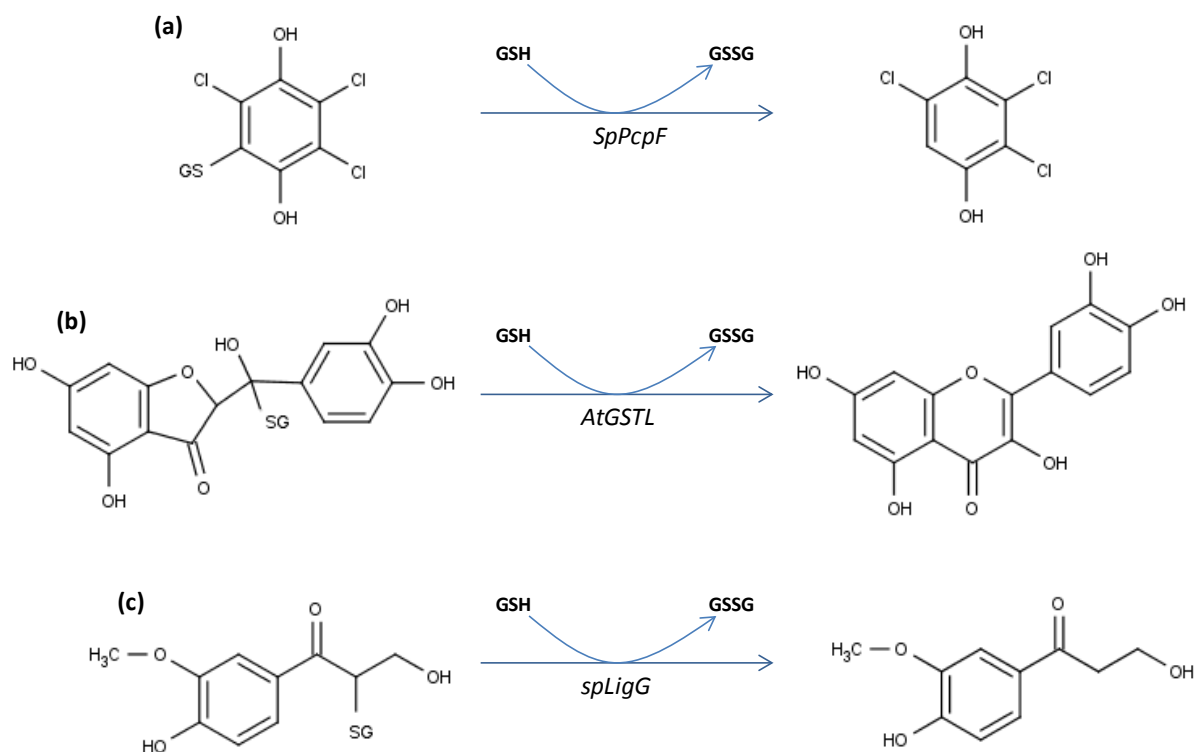


Figure 15. Réduction de substrats physiologiques catalysée par des GST à cystéine catalytique
(Sato et al. 2009; Dixon and Edwards 2010; Xun et al. 2010)

Via des réactions de déglutathionylation, les GST peuvent être impliquées dans différentes voies métaboliques ou cataboliques comme (a) la dégradation du pentachlorophénol chez *S. chlorophenolicum*, (b) le recyclage de molécules antioxydantes dérivées de la quercétine chez *A. thaliana* ou (c) la deuxième étape du clivage de la liaison -aryl ether de la lignine chez *Sphingobium* sp.

3.3 Evolution des GST

3.3.1 Evolution des GST à partir d'un ancêtre commun thiorédoxine

Suite au séquençage de génomes de nombreux organismes, les premières études phylogénétiques ont défini la classe Thêta comme ayant divergé le plus tôt au cours de l'évolution. Ces travaux étaient basés essentiellement sur l'analyse et la comparaison des séquences primaires des protéines. Considérant l'omniprésence de la classe Thêta aussi bien chez les bactéries anaérobies que chez les eucaryotes supérieurs, il a été suggéré que ces GST seraient apparues avant l'émergence des eucaryotes (Pemble and Taylor 1992). Selon ce modèle, les autres classes de GST auraient donc évolué par duplication à partir d'un gène ancestral Thêta (Figure 16). Cependant, ce modèle ne permet pas d'expliquer la présence de fortes régions d'homologie entre la GST Ure2p de *S. cerevisiae* (non décrite à l'époque chez les organismes procaryotes) et les GST Thêta présentes chez les champignons, les insectes et les mammifères, alors qu'elle n'en présente aucune avec les classes Alpha, Mu ou encore Pi de ces mêmes organismes (Coschigano and Magasanik 1991; Pemble and Taylor 1992).

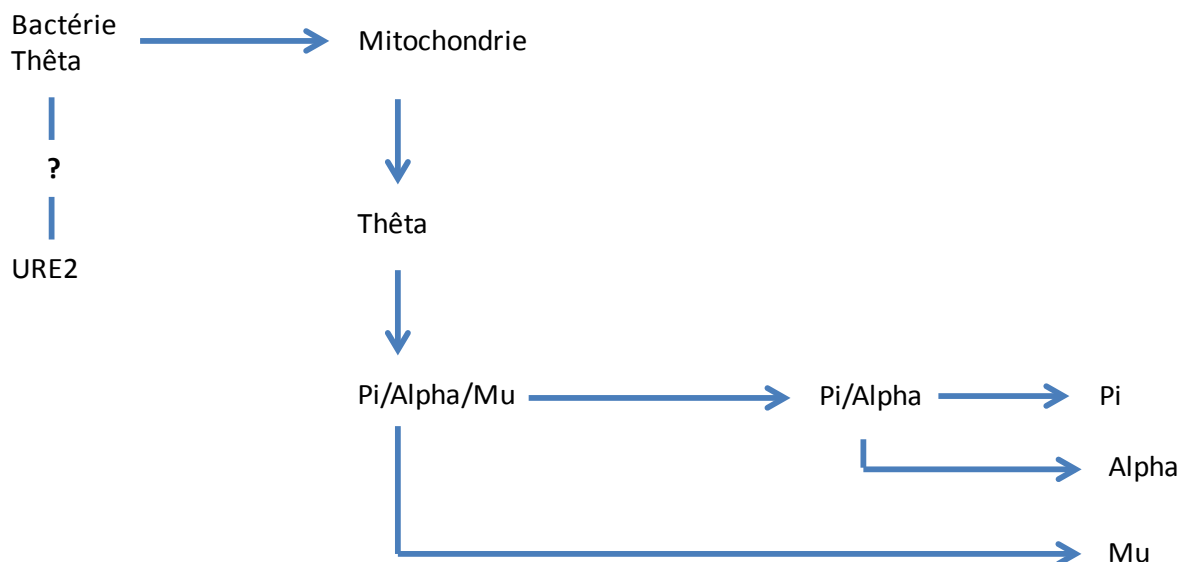


Figure 16. Schéma évolutif des GST d'après Pemble and Taylor, 1992

Depuis, l'accumulation de données structurales a permis de mettre en évidence l'existence de fortes similarités (repliement thiorédoxine), non seulement entre les différentes classes de GST mais également avec d'autres familles d'enzymes. La prise en compte de ces données a permis de reconsidérer l'évolution des GST dans un contexte plus large, en relation notamment avec la superfamille des protéines à motif thiorédoxine (Frova 2006). Aujourd'hui, l'hypothèse admise est que les GST, tout comme les glutarédoxines ou encore les Dsb (Disulfide bond protein) (Bardwell et al. 1991; Kamitani et al. 1992), ont évolué à partir d'un ancêtre commun de type thiorédoxine (Trx). Par définition, les protéines ayant divergé à partir d'un ancêtre Trx possèdent un ou plusieurs modules ayant un repliement thiorédoxine compact de type $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$. La configuration minimale de ce repliement consiste en un arrangement de quatre feuillets β antiparallèles, formant le « cœur » de la protéine, entourés de trois hélices α (Figure 17). Le centre actif de ces protéines, localisé au début de l'hélice 1, est constitué en général d'un résidu cystéinyl exposé au solvant et susceptible de réaliser des attaques nucléophiles par le biais de l'atome de soufre présent sur la chaîne latérale.

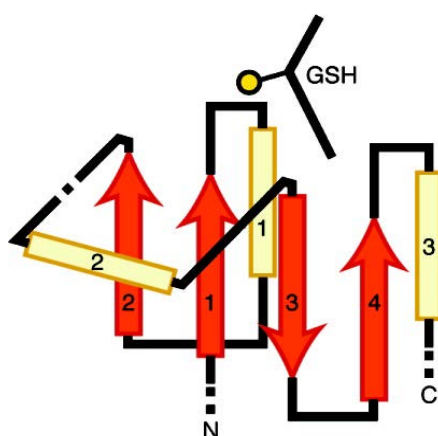


Figure 17. Représentation du repliement thiorédoxine des GST (Atkinson and Babbitt 2009)

Toutes ces enzymes présentent également un résidu proline localisé en amont du feuillet- $\beta 3$ présentant la particularité d'être en configuration *cis* (Figure 18). Cette particularité est responsable de la formation d'un coude au sein de la chaîne polypeptidique, et joue un rôle capital dans le repliement de la protéine. Il existe plusieurs types d'enzymes qui présentent ce repliement tridimensionnel dont les thiorédoxines, les glutarédoxines, les protéines disulfure

isomérases, les thiol-peroxydases, les méthionine sulfoxyde réductases ou encore les glutathion transférases.

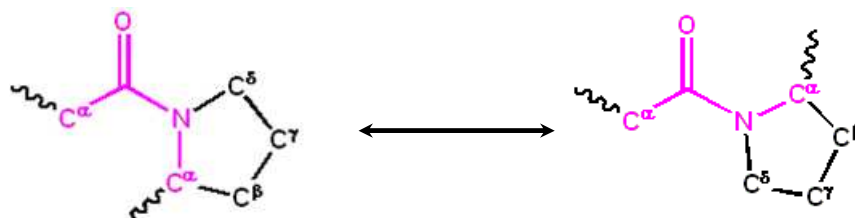


Figure 18. Représentation schématique des conformations *trans* (gauche) et *cis* (droite) de la proline

Sur la base de motifs structuraux, il a été proposé qu'au cours de l'évolution, l'addition d'un domaine hélicoïdal en position C-terminal a donné naissance aux GST cytosoliques. Les GST Kappa ou encore les Dsb ont évolué quant à elles par l'insertion d'un motif hélicoïdal au sein même du repliement thiorédoxine, entre les feuillets- $\beta 2$ et - $\beta 3$ (Figure 19). Ainsi d'après ce modèle, les GST cytosoliques et les GST Kappa ont évolué séparément. A l'inverse plusieurs modèles antérieurs proposaient une voie évolutive commune dans laquelle les GST Kappa précèdent les GST cytosoliques (Armstrong 1997; Sheehan et al. 2001). Cependant les GST de la classe Kappa ne présentent pas d'homologies significatives avec les GST cytosoliques, mais sont proches des Dsb d'*E. coli*. De plus, aucune GST Kappa n'a été identifiée chez les organismes photosynthétiques suggérant bien des voies évolutives distinctes. D'autres familles de protéines telles que les glutathion peroxydases ou encore les peroxyrédoxines possèdent également un domaine hélicoïdale inséré au sein du motif thiorédoxine, cependant à l'inverse des Dsb ou encore des GST Kappa, ce domaine n'est pas entièrement hélicoïdal.

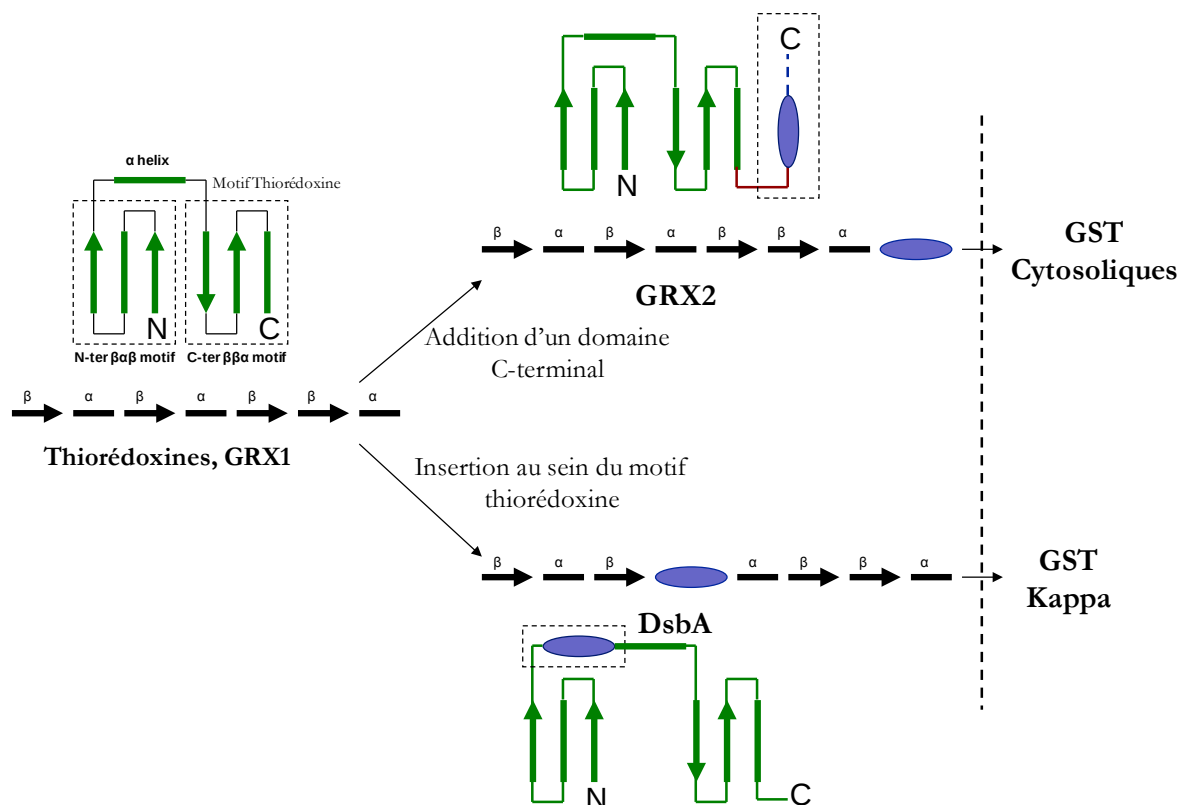


Figure 19. Evolution des GST à partir d'un ancêtre à repliement thiorédoxine (Frova, 2006)

3.3.2 Evolution et diversification des GST cytosoliques

L'évolution a entraîné l'émergence de nombreuses classes de GST cytosoliques présentant une grande diversité fonctionnelle sur de nombreux types de substrats. Comme illustré en figure 20, l'évolution des GST cytosoliques est marquée par trois étapes majeures : (i) une étape de dimérisation, (ii) un changement de résidu catalytique de cystéine en sérine puis (iii) en tyrosine (Frova 2006; Atkinson and Babbitt 2009). Les protéines des classes DHAR et Lambda conservent la structure en monomère de la Grx2 d'*E. coli* et contiennent un résidu catalytique de type cystéinyl. Elles catalysent pour la plupart la réduction glutathion dépendante du déhydroascorbate ou encore de l'hydroxyéthyl disulfide, deux substrats communs avec les thiorédoxines ou encore les glutarédoxines. Ensuite une étape de dimérisation a conduit à l'émergence des familles Bêta et Oméga. Jusqu'à ce stade, toutes ces enzymes ne présentent pas ou très peu d'activité de conjugaison du glutathion sur des substrats électrophiles. Au cours de l'évolution, le changement d'acide aminé catalytique en sérine puis en tyrosine a permis aux

enzymes de se diversifier, d'accepter d'autres types de substrats et de catalyser d'autres types de réactions. Parmi les GST à sérine catalytique, les classes Thêta et Zêta sont présentes chez tous les eucaryotes à la différence des classes Tau et Delta uniquement présentes chez les plantes et les insectes. Il semble donc que ces protéines aient divergé plus tôt, et la classe Thêta présente également chez les bactéries a sans doute divergé en premier. De la même manière, la présence des GST Sigma à la fois chez les vertébrés et invertébrés suggère que cette classe a divergé avant les classes Alpha, Mu et Pi, spécifiques quant à elles des mammifères. Ces changements successifs d'acide aminé catalytique en sérine, puis en tyrosine ont conduit à l'émergence de nouvelles activités pour les GST, et notamment le transfert de glutathion. Pour une grande majorité d'entre elles, ces enzymes sont désormais capables de prendre en charge divers substrats électrophiles et de réaliser un transfert de glutathion.

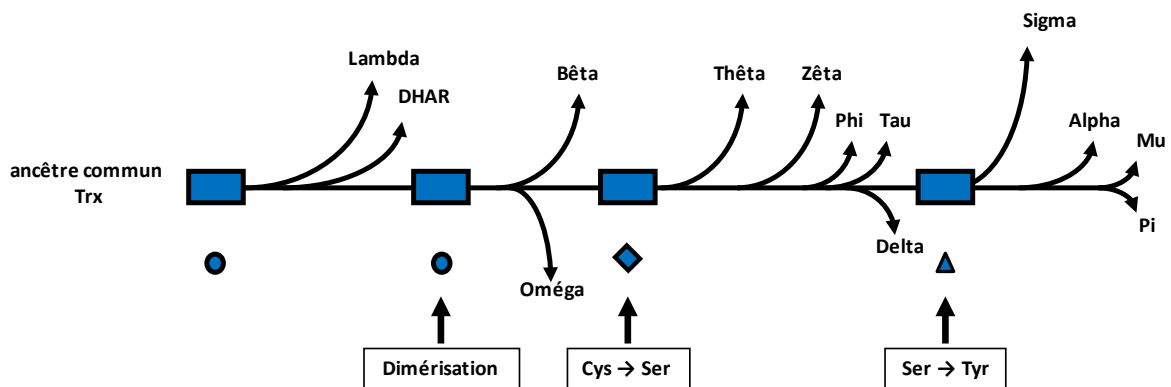


Figure 20. Modèle d'évolution des GST cytosoliques (Frova 2006)

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

1. Variabilité des GST au sein du règne fongique

Le séquençage massif de génomes fongiques a permis l'identification et le recensement de différentes isoformes appartenant à la superfamille des glutathion transférases. Reposant sur ces données de génomique comparative, une étude réalisée au sein de l'UMR 1136 basée en particulier chez les champignons saprophytes a mis en évidence une surreprésentation de certaines classes de GST au sein de cette population fongique, accompagnée d'une variabilité inhérente à chaque classe (Morel et al. 2009). Ces phénomènes concernent en particulier les classes de GST à cystéine catalytique ainsi que les classes Ure2p et GSTFuA.

1.1 La classe des GSTFuA

Ces enzymes récemment découvertes chez les champignons furent dans un premier temps appelées 'Etherase' en raison de leur identité de séquence avec certaines enzymes de l'opéron LIG de *Sphingobium sp.*, capables de cliver les liaisons β -aryl ether présentes dans la lignine (Masai et al. 1993; Morel et al. 2009). L'analyse des génomes fongiques a révélé que la répartition des GSTFuA au sein des organismes est dépendante de leur physiologie. En effet, les hémiascomycètes tels que *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *S. pombe* ne possèdent pas de GSTFuA, à l'inverse des champignons filamenteux. De plus, la plupart des basidiomycètes pathogènes possèdent une à trois GSTFuA tandis que plus d'une dizaine d'isoformes sont dénombrées chez les organismes saprophytes (Morel et al. 2009). Une étude à par ailleurs mis en évidence une régulation positive des gènes codant pour les GSTFuA lors de la croissance sur litière d'*Agaricus bisporus* (Morin et al. 2012), révélant ainsi un lien avec le métabolisme de ces organismes saprophytes.

Du fait de la récente découverte de ces enzymes fongiques, leurs propriétés biochimiques ne sont pas encore bien définies. Cependant, la caractérisation d'une GSTFuA de *P. chrysosporium* a révélé des caractéristiques fonctionnelles et structurales atypiques. Notamment une structure de type « β -hairpin » supplémentaire entraînant la formation d'un dimère particulier (Figure 21), ainsi que la présence d'un site de fixation du sulfate proche du site de reconnaissance du glutathion. Ce site est à l'origine d'une activité ligandine envers des

composés résultant de la dégradation du bois (Mathieu et al. 2012). Cette enzyme présente également des activités glutathion transférases sur divers substrats dérivés de l'isothiocyanate ou du butyrate, mais très peu avec le CDNB. De plus, elle ne catalyse ni la réduction de peroxydes, ni le clivage des liaisons β -aryl ether comme initialement présumé. Par conséquent, cette famille d'enzymes a été renommée GSTFuA pour 'fungal specific' (Mathieu et al, 2012).

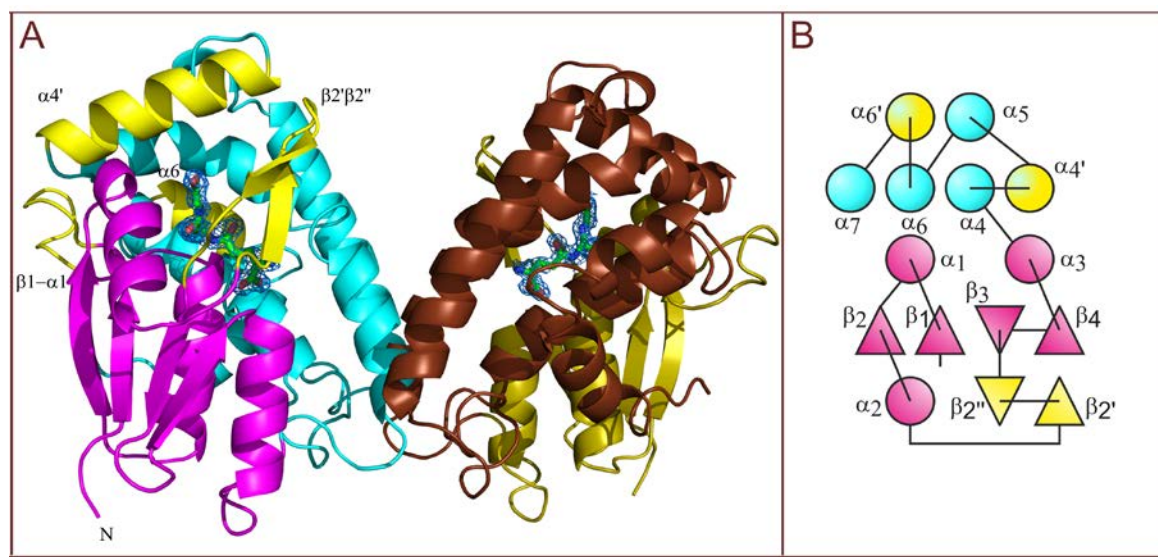


Figure 21. Organisation tridimensionnelle de la GSTFuA1 (Mathieu et al, 2012)

Les structures secondaires atypiques sont représentées en jaune au sein du dimère (A) et du monomère (B).

1.2 La classe des Ure2p

La première Ure2p fut décrite chez *S. cerevisiae*, et doit son nom à son emplacement génomique situé au sein du locus impliqué dans le métabolisme de l'acide ureidosuccinide (Lacroute 1971; Drillien and Lacroute 1972). Cette enzyme présente un domaine particulier appelé prion situé en amont du domaine thiorédoxine commun aux GST, et ne présente pas ou très peu d'activité transférase avec le CDNB (Wickner 1994; Choi et al. 1998). Concernant les enzymes fongiques, l'ensemble des Ure2p s'organisent en deux classes appelées Ure2pA et Ure2pB dont l'organisation génomique en cluster suggère une diversification récente de ces familles (Thuillier et al. 2011). D'une manière générale, le nombre d'isoformes d'Ure2pB varie très peu et ces enzymes sont présentes dans la grande majorité des organismes. A l'inverse, le

nombre d'Ure2pA varie fortement en fonction du type trophique de certains organismes, pouvant atteindre jusqu'à 20 isoformes chez les saprophytes (Thuillier et al. 2011). Ainsi, selon les différents modes de vie et conditions environnementales, une spécialisation avec un gain ou une perte de fonction a été observée dans le groupe des Ure2pA. D'une manière générale, la variabilité entre les différents organismes est très marquée, notamment avec une expansion des Ure2pA chez les basidiomycètes saprophytes (Thuillier et al. 2011).

Par ailleurs, à cette variabilité inter-organismes, s'ajoute une diversité fonctionnelle. Considérant leur appartenance à la superfamille des GST, les Ure2p sont des enzymes non conventionnelles d'un point de vue biochimique. En effet, l'Ure2p de *S. cerevisiae* catalyse des réactions de type peroxydase glutathion dépendante, mais également des activités thiol transférases (Bai et al. 2004; Kanai et al. 2006; Zhang et al. 2008). Concernant les basidiomycètes, de récents travaux ont prouvé que certaines isoformes chez *P. chrysosporium* catalysent des réactions glutathion transférases, mais présentent également des activités thiol transférases à la manière des Grx, et ce malgré l'absence de résidu cystéine (Thuillier et al. 2011). Contrairement à la plupart des classes de GST cytosoliques l'interaction entre le glutathion et les Ure2p est encore mal comprise, tout comme le mécanisme fonctionnel de ces enzymes. Par ailleurs, la caractérisation structurale d'une isoforme bactérienne met en évidence la présence d'un site additionnel de reconnaissance du glutathion. Au cours de la catalyse, ce glutathion pourrait être impliqué dans l'attaque nucléophile classiquement réalisé par un résidu cystéine (Kanai et al. 2006; Wadington et al. 2009; Zhang and Perrett 2009; Stourman et al. 2011).

1.3 Les classes à cystéine catalytique

Les GST à cystéine catalytique représentent une classe universelle de GST, décrite dans la plupart des règnes, et ayant divergé tôt au cours de l'évolution. Au sein des organismes fongiques, ces enzymes sont réparties en deux classes distinctes : (i) la classe Oméga (GSTO), également décrite chez les mammifères et les insectes, et (ii) la classe des glutathionyl hydroquinone réductases (GHR) présente chez les bactéries. Les GSTO sont surreprésentées au sein des génomes fongiques, et en particulier chez les champignons saprophytes. En effet, lorsque deux ou trois isoformes sont en général présentes chez les mammifères et les insectes, on en dénombre jusqu'à 13 chez les champignons saprophytes de pourriture. De récentes

études de transcriptomique chez *P. chrysosporium* ont montré que les gènes codant pour les GST Oméga sont régulés à la hausse lors d'une croissance sur un milieu contenant du bois comme source de carbone unique (Vanden Wymelenberg et al. 2010; Vanden Wymelenberg et al. 2011). Par ailleurs, les niveaux de régulation de ces gènes varient en fonction des essences de bois utilisées. Certaines isoformes chez *Phanerochaete carnosae* pourraient être induites sur un milieu contenant du sapin tandis que d'autres seraient préférentiellement exprimées en présence de bois d'épicéa, d'érable ou de pin (MacDonald et al. 2011). Ces études suggèrent clairement que les GST Oméga sont associées à des processus métaboliques dégradants les produits chimiques exogènes du bois.

D'un point de vue fonctionnel, les GST à cystéine catalytique présentent une grande variété de substrats. Selon les organismes considérés, ces enzymes catalysent aussi bien des réactions de déglutathionylation sur divers composés (quinones, acétophénone, quercétine), que la réduction des espèces méthylées de l'arsenic, ou encore des activités thiol transférases (Zakharyan et al. 2001; Herrero et al. 2006; Board et al. 2008 ; Dixon and Edwards 2010, Belchik, 2011 #1295; Belchik and Xun 2011). Les quelques données disponibles chez les champignons concernent principalement la levure et indiquent que ces enzymes sont potentiellement impliquées dans la protection des cellules contre les dommages résultant du stress oxydatif, des métaux lourds et des composés antifongiques (Rai et al. 2003; Barreto et al. 2006). Cependant les fonctions physiologiques des GST à cystéine catalytique restent à l'heure actuelle très hypothétiques.

2. Objectifs et champs d'investigation

Ces études, ont constitué le point de départ de mes travaux de thèse qui avaient pour objectif de caractériser d'un point de vue biochimique et fonctionnel les glutathion transférases de *P. chrysosporium*, et en particulier les isoformes composant les classes à cystéine catalytique. Récemment, diverses études de transcriptomique portant sur les champignons saprophytes ont été réalisées dans différentes conditions liées à la capacité ligninolytique ou au potentiel de bioremédiation de ces champignons (Minami et al. 2007; Minami et al. 2009; Sato et al. 2009; Vanden Wymelenberg et al. 2009; Vanden Wymelenberg et al. 2010). Il a ainsi été montré que ces classes de GST sont induites lorsque ces organismes sont cultivés en présence de bois, suggérant un lien entre ces enzymes et les propriétés ligninolytiques des champignons. Cependant les connaissances sur ces classes d'enzymes étendues chez les basidiomycètes saprophytes sont encore limitées et en particulier en ce qui concerne :

- Les propriétés biochimiques et structurales inhérentes à chaque classe
- Les substrats et les fonctions physiologiques de ces enzymes au sein des organismes fongiques
- Le rôle joué par ces enzymes au cours de l'adaptation des basidiomycètes à leurs niches écologiques actuelles

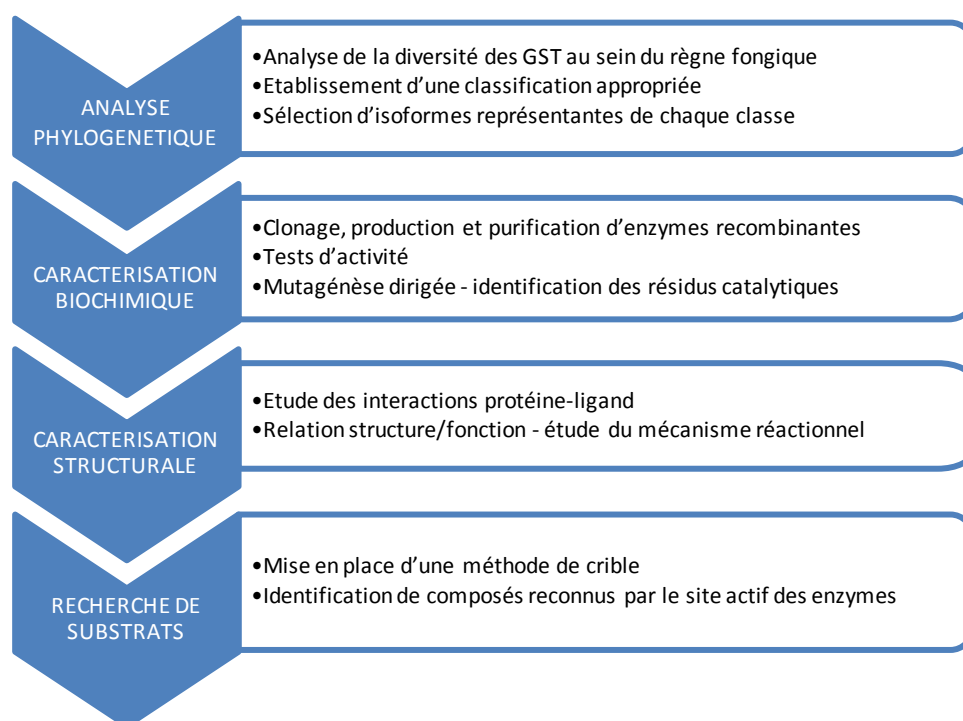
Une approche multidisciplinaire a alors été développée afin d'aboutir à une meilleure compréhension de la fonction de ces gènes (Figure 22) :

Les premiers travaux entrepris avaient pour objectif de sélectionner, de produire puis de purifier différentes isoformes représentatives de chaque classe de GST à cystéine catalytique. Afin de déterminer les propriétés fonctionnelles des enzymes recombinantes, différents tests enzymatiques ont été dans un premier temps réalisés aux moyens de substrats classiquement utilisés lors de l'étude de protéines à cystéine.

Pour comprendre le mécanisme catalytique de ces enzymes, des analyses structurales ont été entreprises, ainsi que des études de mutagenèse dirigée sur les résidus supposés impliqués dans la catalyse enzymatique. Ces expériences de cristallographie aux rayons x ont fait l'objet d'une collaboration avec le Dr Claude Didierjean et le Dr Frédérique Favier (crm2-Université de Lorraine).

Afin d'accéder à la fonction de ces GST, une stratégie visant à identifier les substrats de ces enzymes a été développée. L'utilisation de composés fluorescents interagissant spécifiquement avec le site actif des GSTO, a permis d'identifier par compétition les substrats potentiels des enzymes recombinantes. Ces travaux ont été réalisés à partir de composés commerciaux mais également à partir de métabolites extraits de champignons et de plantes.

Les principaux résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse sont présentés sous la forme de quatre articles publiés, sous presse ou en préparation.



Fonction des gènes

Figure 22. Stratégie mise en place afin de déterminer les fonctions des GST à cystéine catalytique fongiques

RESULTATS

Article 2: Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: a S-glutathionyl-p-hydroquinone reductases belongs to a new structural class

Meux Edgar, Prosper Pascalita, Ngadin Andrew, Didierjean Claude, Morel Mélanie, Dumarçay Stéphane, Lamant Tiphaine, Jacquot Jean-Pierre, Favier Frédérique, & Gelhaye Eric

***The journal of Biological Chemistry*, 2010, **286** (11) 9162-9173**

Le séquençage et l'analyse du génome de *P. chrysosporium* ont permis d'identifier huit séquences codantes pour des GST Oméga se regroupant spontanément en trois sous-classes sur la base de leur séquence primaire. Malgré la présence d'une cystéine très conservée chez toutes ces protéines, l'analyse des séquences primaires a révélé de faibles pourcentages d'identité (inférieurs à 20 %) entre les isoformes composant la sous classe I et les autres GST à cystéine catalytique. Cet article décrit la caractérisation biochimique de PcGSTO1 (classe I) et PcGSTO3 (classe II), ainsi que la structure tridimensionnelle de PcGSTO1. A partir de ménadione, des dérivés glutathionylés ont été synthétisés *in vitro* puis soumis à l'action des protéines recombinantes. Bien que toutes deux actives vis-à-vis de substrats classiques tels que le HED ou encore le DHA, seule PcGSTO1 catalyse la déglutathionylation de ces dérivés d'hydroquinones. A l'inverse, PcGSTO3 catalyse la déglutathionylation de dérivés phénacyl. De plus, la structure tridimensionnelle, et en particulier le mode de dimérisation de PcGSTO1 présente des caractéristiques atypiques en comparaison avec d'autres structures connues de GST à cystéine catalytique. Considérant ses particularités structurales et l'activité spécifique de cette enzyme vis-à-vis d'hydroquinones glutathionylées, il apparaît clairement que PcGSTO1 appartient en réalité à une nouvelle classe de GST appelée glutathionyl hydroquinone reductase (GHR). D'un point de vue catalytique, l'activité de ces enzymes repose sur la présence d'une cystéine au sein du site actif qui réalise une attaque nucléophile sur le substrat glutathionylé aboutissant à la formation d'un adduit glutathion sur la protéine et à la libération du substrat. PcGSTO1 a alors été renommée en PcGHR1 et représente la première structure résolue de GHR.

Glutathione Transferases of *Phanerochaete chrysosporium* S-GLUTATHIONYL-*p*-HYDROQUINONE REDUCTASE BELONGS TO A NEW STRUCTURAL CLASS^{*,§}

Received for publication, October 14, 2010, and in revised form, December 17, 2010. Published, JBC Papers in Press, December 22, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.194548

Edgar Meux[‡], Pascalita Prosper[§], Andrew Ngadin[‡], Claude Didierjean[§], Mélanie Morel[‡], Stéphane Dumarçay[¶], Tiphaine Lamant[‡], Jean-Pierre Jacquot[‡], Frédérique Favier^{§1}, and Eric Gelhaye^{‡2}

From the [‡]UMR 1136 INRA-UHP "Interactions Arbres/Micro-Organismes," IFR 110 "Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation," the [§]CRM2, Equipe Biocristallographie, UMR 7036 CNRS-UHP, Institut Jean Barriol, and the [¶]Laboratoire d'Études et de Recherches sur le Matériau Bois, EA UHP 4370, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

The white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, a saprophytic basidiomycete, possesses a large number of cytosolic glutathione transferases, eight of them showing similarity to the Omega class. PcGSTO1 (subclass I, the bacterial homologs of which were recently proposed, based on their enzymatic function, to constitute a new class of glutathione transferase named S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases) and PcGSTO3 (subclass II related to mammalian homologs) have been investigated in this study. Biochemical investigations demonstrate that both enzymes are able to catalyze deglutathionylation reactions thanks to the presence of a catalytic cysteinyl residue. This reaction leads to the formation of a disulfide bridge between the conserved cysteine and the removed glutathione from their substrate. The substrate specificity of each isoform differs. In particular PcGSTO1, in contrast to PcGSTO3, was found to catalyze deglutathionylation of S-glutathionyl-*p*-hydroquinone substrates. The three-dimensional structure of PcGSTO1 presented here confirms the hypothesis that it belongs not only to a new biological class but also to a new structural class that we propose to name GST xi. Indeed, it shows specific features, the most striking ones being a new dimerization mode and a catalytic site that is buried due to the presence of long loops and that contains the catalytic cysteine.

Phanerochaete chrysosporium is considered as the model organism to study the physiology of white rot fungi, the only known microorganisms able to completely break down lignin

to carbon dioxide and water (1–3). Analysis of the genome of this basidiomycete revealed a complex superfamily of cytochrome P450 monooxygenases representing around 1% of this genome (1, 4). The large size of this gene family is correlated with the extraordinary ability of this fungus to degrade and metabolize numerous recalcitrant compounds such as pesticides, polyaromatic hydrocarbons, halogenated aromatics, and textile dyes. Besides extracellular oxidative systems, including lignin and manganese peroxidases, cytochrome P450 monooxygenases are thought to be involved in the phase I of detoxication processes catalyzing the oxidation of various substrates (5–7). The oxidation of recalcitrant compounds is often followed by glutathione conjugation catalyzed by glutathione transferases (GSTs). The glutathione conjugates formed are less toxic and lipophilic than the parent compounds (8).

The distribution of GSTs in fungi has been recently investigated (9), highlighting that *P. chrysosporium* exhibits a large subfamily of cytosolic GSTs (at least 27 isoforms) in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* for instance (11 isoforms). Based on primary structure similarity, these cytosolic GSTs belong to seven different classes as follows: Ure2p-like, GTT1, GTT2, EFBγ, MAK16, etherases, and Omega (GSTO)³ (9). Among the cytosolic GSTs, *P. chrysosporium* exhibits eight putative proteins showing homology with GSTs of the Omega class, named PcGSTO1 to PcGSTO8. In a previous phylogenetic analysis of fungal GSTs, we found that GSTOs fall into three different subclasses. Subclass 1 encloses PcGSTO1 and PcGSTO2, these latter being related to uncharacterized plant GST Lambda and bacterial GSTs (9). Members of subclasses II and III are related to the well characterized human HsGSTO1-1 (10, 11).

A major feature of GSTOs is the presence of a cysteinyl residue in the catalytic site present in the glutathione binding domain (G-site), explaining the deglutathionylation activities exhibited by these proteins. For instance, HsGSTO1-1 has been shown to remove glutathione from S-(phenacyl)glutathione (12), as this activity requires the presence of the catalytic Cys³² (13). In addition, GSTOs have been shown to be involved in the reduction of methyl and dimethyl arsonate, an intermediate in

* This work was supported by Agence Nationale de la Recherche Research Grants ANR-06-BLAN-0386 and ANR-09-BLAN-0012, Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de la Technologie, Institut National de la Recherche Agronomique, and CNRS.

This work is dedicated to the memory of the late Dr. André Aubry.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table 1, Figs. 1 and 2, and additional references.

The atomic coordinates and structure factors (code 3PPU) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

¹ To whom correspondence may be addressed: CRM2, UMR 7036 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel.: 33-3-83-68-48-79; Fax: 33-3-83-40-64-92; E-mail: Frederique.Favier@crm2.uhp-nancy.fr.

² To whom correspondence may be addressed: UMR 1136 INRA-UHP, IFR110, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel.: 33-3-83-68-42-28; E-mail: Eric.Gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr.

³ The abbreviations used are: GSTO, glutathione transferase Omega; DHA, dehydroascorbate; GHR, S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductase; HED, hydroxyethylidisulfide; PDB, Protein Data Bank; PAP-SG, S-(phenacylacetophenone)glutathione; Se, selenium; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene.

the arsenic biotransformation (14, 15). Bacterial GSTOs, which belong to subclass I, have been shown to be involved in pentachlorophenol catabolism acting as *S*-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductase; this activity was also related to the presence of a catalytic cysteine (16, 17). In fungi, few studies have been devoted to this GST class except in *S. cerevisiae* (ScGSTO). The three ScGSTOs belong to the subclass I and have been partially characterized particularly at the protein level. The three proteins exhibit glutaredoxin-like activities because they are able to reduce both hydroxyethyl disulfide and dehydroascorbate in the presence of glutathione. In addition, the transcription of the three genes is induced by oxidative stress (18, 19). Moreover, ScGSTO1 has been shown to be involved in sulfur metabolism and located in peroxisomes. PcGSTO1 and PcGSTO2, nevertheless, differ from their yeast counterparts particularly at the H-site (the domain thought to interact with the hydrophobic substrate).

From phylogenetic analysis and biochemical analysis, Xun *et al.* (17) recently proposed that the Omega subclass I members constitute a new class of GSTs named *S*-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductase (GHR) due to their activity with *S*-glutathionyl-hydroquinones.

The aim of this study was the investigation of the PcGSTOs, a class of GSTs that is over-represented in *P. chrysosporium*. Recombinant proteins of isoforms that belong to the GSTO subclasses I and II have been biochemically characterized, exhibiting substrate specificity. Furthermore, the three-dimensional structure of PcGSTO1 has been solved, allowing the first description of a *S*-glutathionyl-*p*-hydroquinone reductase at the structural level. From these biochemical and structural data, the potential functions of the different isoforms are discussed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Hydroxyethyl disulfide (HED) and 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid were from Aldrich and Pierce, respectively. All other reagents were from Sigma.

Cloning and Construction of *Pcgsto1* and *Pcgsto3* Mutants by Site-directed Mutagenesis—The open reading frame sequences encoding *P. chrysosporium* PcGSTO1 and PcGSTO3 were amplified from *P. chrysosporium* cDNA using *Pcgsto1* and *Pcgsto3* forward and reverse primers (see supplemental Table 1) and cloned into the *Nco*I and *Bam*HI restriction sites (underlined in the primers) of pET3d (Novagen). For PcGSTO3, the amplified sequence encoded a protein in which an alanine has been added during cloning. Using two complementary mutagenic primers, the two cysteines of PcGSTO3 were individually substituted into serines, and the primers are listed in supplemental Table 1. For PcGSTO1, due to the presence of the signal peptide, a first construction has been made, and the resulting protein starts with the N-terminal sequence MATTICLRH. Because we obtained a mixture of different proteins after production and purification (see under "Results"), a new construction has been made. The resulting protein with an additional alanine started thus with the N-terminal sequence MASFT-TGST (see supplemental Fig. 1). PcGSTO1 used for structure determination consists also of the 352 last residues of the full-length protein.

Expression and Purification of the Recombinant Proteins—For protein production, the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain that contained the pSBET plasmid was co-transformed with the different recombinant plasmids (20). Cultures were progressively amplified up to 2.4 liters in LB medium supplemented with ampicillin and kanamycin at 37 °C. Protein expression was induced at exponential phase by adding 100 μ M isopropyl β -D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37 °C. The cultures were centrifuged for 15 min at 4400 $\times$ *g*. The pellets were resuspended in 30 ml of TE NaCl buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl), and the suspension was stored at -20 °C.

Cell lysis was performed by sonication (three times for 1 min with intervals of 1 min), and the soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation for 30 min at 27,000 $\times$ *g*. The soluble part was then fractionated with ammonium sulfate in two steps, and the protein fraction precipitated between 40 and 80% of the saturation contained the recombinant protein, as estimated by 15% SDS-PAGE. The protein was purified by size exclusion chromatography after loading on an ACA44 (5 $\times$ 75 cm) column equilibrated in TE NaCl buffer. The fractions that contained the protein were pooled, dialyzed by ultrafiltration to remove NaCl, and loaded onto a DEAE-cellulose column (Sigma) in TE buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). The proteins were eluted using a 0–0.4 M NaCl gradient. Finally, the fractions of interest were pooled, dialyzed, concentrated by ultrafiltration under nitrogen pressure (YM10 membrane; Amicon), and stored in TE buffer at -20 °C. Purity was checked by SDS-PAGE. Protein concentrations were determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient at 280 nm of 64,860 M⁻¹·cm⁻¹ for the PcGSTO1 WT, C86S, and 51340 M⁻¹·cm⁻¹ for PcGSTO3 WT and C37S.

E. coli strain B121 containing the pET-*Pcgsto1* plasmid was cultured as described previously (21) and was used as a source of selenomethionine-substituted form of PcGSTO1 (SeMet-PcGSTO1). The purification of SeMet-PcGSTO1 was performed following a procedure similar to that described for PcGSTO1.

Mass Spectrometry Analysis—PcGSTOs WT and mutated were analyzed by quadrupole-TOF MS as described by Koh *et al.* (22).

Fluorescence Properties of Wild-type and Mutated PcGSTOs—The fluorescence characteristics of PcGSTOs in the reduced and oxidized forms were recorded with a spectrofluorometer (Cary Eclipse; VARIAN) in TE buffer at a protein concentration of 10 μ M.

Determination of Free Thiol Groups—The number of free thiol groups in either untreated, denatured, or reduced conditions was determined spectrophotometrically with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, as described by Koh *et al.* (22). All thiol titrations were performed on enzymes either as purified or after SDS treatment or after dithiothreitol (DTT) reduction. In the latter case, proteins were first reduced by incubation with 10 mM DTT for 30 min at room temperature, then precipitated with 1 volume of 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), and finally stored on ice for 30 min. The mixture was then centrifuged for 10 min at 13,000 $\times$ *g*, and the pellets were washed twice with 2% (w/v) TCA. The precipitate was resuspended in 30 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, and 1% (w/v) SDS. The

concentration was estimated by UV spectrophotometry. For denatured proteins, samples were incubated in the presence of 2% SDS treatment during 30 min before 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic addition.

Activity Measurements—The activity measurements of WT or mutant PcGSTOs in the HED assay or for reduction of dehydroascorbate (DHA) were performed as described by Couturier *et al.* (23). Dimethylarsinate reductase and glutathionyl-phenylacetophenone assay were performed as described previously (12, 13). The GST activity was measured with 0.2 mM CDNB as the substrate in 30 mM Tris buffer, pH 8.0, and the continuous absorbance at 340 nm was monitored. *S*-Glutathionyl-*p*-hydroquinone reductase activity was monitored as follows: 1 mM 1,4-benzoquinone in 30 mM Tris-HCl, pH 8, was used as base line for an absorbance spectrum (230–400 nm). After 2 min, 1 mM reduced glutathione (GSH) was added to the reaction mixture, and the spectra were monitored every minute during 5 min. At last, purified recombinant proteins were added in the reaction mixture, and spectra were recorded every minute. In complementary experiments, 1 mM 1,4-benzoquinone in 30 mM Tris-HCl, pH 8, was incubated in the presence of 1 mM GSH, 200 μ M NADPH, 0.5 IU glutathione reductase before the addition of the protein of interest. The activity was followed by monitoring the decrease in absorbance arising from NADPH oxidation in this coupled enzyme assay system that showed the formation of glutathione disulfide (GSSG).

In complementary experiments, *S*-(phenylacetophenone)-glutathione (PAP-SG) and 2-methyl-*S*-glutathionyl-naphthoquinone (thiodione) were prepared as described previously (24, 25), and the purity and the nature of the products were verified by mass spectrometry. Activities of the WT and variant enzymes were assayed by following the appearance of deglutathionylated menadione (at 425 nm) and phenylacetophenone (at 290 nm). The reactions were performed in 30 mM Tris-HCl, pH 8, containing GSH (5 mM) and substrates (from 15 to 2 mM) in a final volume of 650 μ l and initiated by adding WT or mutant enzyme. The concentration of enzyme added was adjusted based on preliminary activity experiments, ranging from 0.1 and 1 μ M. The reactions were stopped by adding 350 μ l of ethanol, then strongly mixed by vortex, then centrifuged at 14,500 rpm during 15 min, and analyzed by HPLC using a Gemini 5- μ m C18 column (150 mm long $\times$ 4.6 mm inner diameter) at 22 °C.

To visualize the deglutathionylation reactions, PAP-SG or thiodione (15 μ M) was added in a 650- μ l reaction mixture containing 30 mM Tris-HCl, pH 8, and 15 μ M enzyme. After stopping the reaction by adding ethanol, samples were analyzed by HPLC as described above.

Size Exclusion Chromatography—Size exclusion chromatography experiments have been performed using a Superose 12HR column connected to a fast protein liquid chromatography (FPLC) system. The column was equilibrated with 30 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 0.15 M NaCl, and the proteins were eluted in the same buffer at a flow rate of 0.25 ml·min⁻¹.

Crystallization and X-ray Diffraction Data Collection—Prior to crystallization, protein samples were concentrated to 40 mg·ml⁻¹ PcGSTO1, in TE buffer. Crystals of the SeMet-PcGSTO1 were obtained by using the microbatch method. 1.5

TABLE 1**Statistics of X-ray diffraction data collection and model refinement**

Data collection	
Space group	C2
Cell dimensions	<i>a</i> , 166.8 Å, <i>b</i> , 70.3 Å, <i>c</i> , 72.6 Å; β , 98.8°
Resolution	46.66 to 2.30 Å (2.43 to 2.30 Å) ^a
<i>R</i> _{merge}	3.7% (18.8%)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	19.8 (4.8)
Completeness	98.9% (96.0%)
Redundancy	4.3
Refinement	
Resolution	46.66 to 2.30 Å
No. of reflections	36,622
<i>R</i> _{all} / <i>R</i> _{free} ^b	19.2/22.8
No. of atoms	
Protein	2572 (monomer A) + 2451 (monomer B)
Ligand	1 glutathione (20 atoms) in monomer A
Water	223
<i>B</i> -factors	
Protein	37.9 (monomer A); 41.6 (monomer B)
Ligand	49.4
Water	38.6
Ramachandran statistics	
Residues in preferred regions	95.7%
Residues in allowed regions	4.3%
Outlier residues	0.0%
Root mean square deviations	
Bond lengths	0.011 Å
Bond angles	1.25°

^a Values in parentheses are for highest resolution shell.

^b *R*_{all} is determined from all the reflections (working set + test set), and *R*_{free} corresponds to a subset of 5% of reflections (test set).

μ l of the PcGSTO1 solution at various concentrations and 1.5 μ l of various crystallization solutions were deposited in a 72-well Microbatch plate (Hampton Research) pre-filled with paraffin oil and stored at 4 °C. Preliminary results have been obtained from two commercial screening solutions as follows: the condition B2 from the JBScreen classic kit 2 (Jena Bioscience) and the Crystal Screen solution 6 from Hampton Research. Further trials aimed to improve reproducibility and crystal quality gave the best results for PcGSTO1 solutions at 30–40 mg·ml⁻¹ and crystallization solutions composed of 20–30% polyethylene glycol 4000 (PEG 4000), 0 to 0.2 M magnesium or calcium chloride, and 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5. However, polycrystals grew frequently so that only rare portions of them were suitable for x-ray data collection. No crystal of non-selenomethionylated PcGSTO1 suitable for data collection has been obtained.

The diffraction data were collected at 100 K on the synchrotron beamline FIP-BM30A (26) at ESRF (France) with a wavelength of 0.9805 Å corresponding to the peak of the Se K-edge, from a crystal grown with 40 mg·ml⁻¹ PcGSTO1, 25% PEG 4000, and no salt, and flash-frozen after a quick immersion in the crystallization solution mixed with 20% glycerol. The data sets were processed with XDS (27) and scaled with SCALA from the CCP4 Package (28). Statistics are summarized in Table 1.

Structure Solution and Quality of the Model—The PcGSTO1 structure was solved using the single wavelength anomalous dispersion protocol of Auto-Rickshaw at the EMBL-Hamburg automated crystal structure determination platform (29). The input diffraction data were prepared and converted for use in Auto-Rickshaw using programs of the CCP4 suite (28). Nine heavy atoms among the 10 requested were found using the program SHELXD (30). Initial phases were calculated after density modification using the program SHELXE (31), at 3.0 Å resolution. The initial phases were improved using density modifica-

tion and phase extension to 2.30 Å resolution using the program DM (32). 70% of the model was built by ARP/wARP (33, 34). It was progressively completed and refined by using iteratively COOT (35) and REFMAC5 (36), including diffraction data up to 2.3 Å resolution. An electron density further attributed to one GSH bound in the active site appeared in monomer A during refinement, although no GSH was added to crystallize PcGSTO1. On the contrary, the corresponding area of monomer B only displayed a few poor spherical densities that more probably corresponded to water molecules. Final model statistics are shown in Table 1.

Most residues corresponded to well defined electron density, except for the N-terminal part of both monomers that appeared too disordered to be observed. Thus, models of monomers A and B contained residues Glu³⁸–Asp³⁵¹ and residues Phe⁵⁴–Asp³⁵¹, respectively. Furthermore, the residues Glu³⁸–Ser⁵³ only observed in monomer A displayed a weaker electron density and higher *B* factors with respect to the rest of the structure. Figs. 4 and 5 were prepared by using PyMOL.

RESULTS

PcGSTO1 belongs to the first subclass of GSTs Omega displaying a CPWATR potential active site compatible with the CP(W/F)(A/T)(H/Q)R characteristic of the members of this subclass (Fig. 1, *top* and *bottom*) (9). According to the prediction softwares, PcGSTO1 possesses a signal peptide targeting to mitochondria. Different attempts to produce heterologously the full-length protein in *E. coli* resulted in a mixture of truncated proteins and suggested that this N-terminal extension contained putative cleavage sites recognized by the *E. coli* machinery or an intrinsic instability of the precursor. These data were in accordance with the presence of a signal peptide in the N-terminal part of the protein as shown previously for different other redox proteins (37, 38). To obtain a homogeneous protein preparation, a shorter form of PcGSTO1 was produced and purified removing the N-terminal extension of the protein (46 amino acids). Nevertheless, the measured enzymatic activities and specificities (full-length and without signal peptide) described in this study were similar for both forms (data not shown).

PcGSTO3 belongs to the subclass II of the GSTs Omega with an FCPFVQ active site quite similar to the FCPFVE of the HsGSTO1-1 (Fig. 1, *bottom*). A second cysteinyl residue is present at the same position into both proteins (Cys⁹⁴, PcGSTO3 numbering). Different attempts have been made to produce heterologously the mutated protein PcGSTO3 C94S, but they remained unsuccessful because the resulting protein was fully insoluble.

Thiol Content Determination—To investigate the putative role of the conserved cysteines in the catalytic mechanism of both proteins, site-directed mutagenesis has been used to produce the recombinant proteins in *E. coli*, PcGSTO1 C86S and PcGSTO3 C37S. The thiol content of these proteins has been determined in different conditions as follows: native oxidized corresponding to nonreducing and nondenaturing conditions; denatured oxidized corresponding to a titration in the presence of SDS; reduced and denatured corresponding to a reduction followed by a protein precipitation (see “Experimental Procedures”). A summary of these data is shown in Table 2. Nearly

three and two thiols per protein were titrated for the reduced and denatured PcGSTO1 WT and PcGSTO3 WT proteins, respectively, in accordance with the expected thiol content. Under denaturing conditions and after reduction, the obtained values for PcGSTO1 C86S (around two thiols per protein) and PcGSTO3 C37S (around one thiol per protein) were in agreement with the theoretical values. Comparison of values obtained for denatured PcGSTO1 WT and C86S suggested that the sulfur of Cys⁸⁶ was involved at least partially in a DTT-reducible link. For PcGSTO3 WT, one cysteinyl residue was probably involved in a disulfide bridge, whereas for PcGSTO3 C37S, one additional thiol group seemed to be noncovalently bound in the protein.

Fluorescence Spectrometry and Mass Analysis—PcGSTO3 contains two tryptophans adjacent to the active site. Given that proximity, we have investigated whether the intrinsic fluorescence of PcGSTO3 could change under reducing (DTT) or oxidizing (GSSG or diamide) conditions (Fig. 2). The native protein displayed an emission spectrum with a maximum at 350 nm characteristic of a fluorescence signal strongly dominated by Trp. Adding 400 μM DTT to native PcGSTO3 immediately led to a strong increase of the fluorescence signal (Fig. 2). The addition of GSSG (10 mM) on previously DTT-reduced PcGSTO3 strongly decreased the fluorescence signal, whereas addition of diamide (10 mM) did not change the reduced PcGSTO3 fluorescence spectrum (data not shown). Similar experiments have been performed with PcGSTO3 C37S; however, in this case no changes in the fluorescence spectrum have been obtained whatever the reductant and oxidant used. In accordance with thiol titrations, these data suggested that the Cys³⁷ of the native PcGSTO3 WT was glutathionylated and that the tryptophan environment strongly changed after glutathionylation of this active site cysteine.

To confirm this hypothesis, PcGSTO3 WT and PcGSTO3 C37S were analyzed by mass spectrometry. A Q-TOF analysis of the DTT-reduced PcGSTO3 revealed a single protein with a molecular mass of 29,615 Da, which was consistent with a protein where the N-terminal methionine was cleaved. After treatment with GSSG, the mass of the protein increased by around 305 Da, a feature consistent with the formation of one glutathione adduct. This obtained value of 29,921 Da also corresponded to the mass of the native protein, and thus confirmed this latter also possessed a glutathione adduct on Cys³⁷. For the mutant PcGSTO3 C37S, the analysis revealed a single protein with a molecular mass of 29,599 Da, which was consistent with a protein without the first methionine and which harbored the Cys to Ser mutation. This result combined with the thiol titration was in agreement with the noncovalent binding of one reduced glutathione to PcGSTO3 C37S.

Similar experiments (fluorescence and mass spectrometry) have been conducted with PcGSTO1 and PcGSTO1 C86S. Even when a tryptophan residue was present near the putative catalytic cysteine, the fluorescence spectrum remained unchanged whatever the reductant (GSH/DTT) or the oxidant (GSSG/diamide) used. A Q-TOF analysis of the DTT-reduced protein revealed a single protein with a molecular mass of 40,187 Da, which was consistent with a protein where the methionine was cleaved. After treatment with GSSG, the mass of the reduced protein increased

FIGURE 1. **Alignment of PcGSTO1 (top) and PcGSTO3 (bottom) with homologs.** Amino acids involved in the catalytic site are labeled. NCBI accession numbers are as follows: PcGSTO1 (EU791894), PcGSTO3 (EU 791893), PcGSTO4 (JGI accession number 7168), *Sphingobium chlorophenicum* PcpF (AAM 96671), *Escherichia coli* YaiG (NP 417573), and *Homo sapiens* GSTO1-1 NP 004823. For PcGSTO1, the putative signal peptide is in *italic*.

The native column is indicative of the protein thiol content measured after purification. Proteins were denatured using SDS treatment or reduced by DTT and subsequently precipitated using TCA. The thiol content per protein was quantified by 5,5-dithiobis(nitrobenzoic acid). Data are represented as mean $\pm$ S.D. ($n \geq 4$).

by around 306 Da, a feature consistent with the formation of one glutathione adduct. This obtained value of 40,493 Da corresponded also to the mass of the native protein and confirmed this latter also possessed a glutathione adduct. These data combined with thiol titration results were consistent with the potential glutathionylation of Cys⁸⁶, because no glutathione adduct was observed on PcGSTO1 C86S.

96

The activity of the PcGSTOs in these two assays increased linearly with increasing protein concentrations in the 0–750 and 0–100 nM concentration ranges, respectively. As expected, these observed “thiol transferase” activities are related to the presence of a cysteine in their catalytic site, because the mutants PcGSTO1 C86S and PcGSTO3 C37S are fully inactive in these assays (data not shown). The kinetic analyses revealed catalytic efficiency values (k_{cat}/K_m) similar between both PcGSTOs against DHA, whereas PcGSTO1 exhibited a slightly stronger activity against HED than PcGSTO3 (Table 3). Interestingly, whereas PcGSTO1 C86S remained inactive in all tested assays, PcGSTO3 C37S exhibited a classical glutathione transferase activity detected using CDNB as the substrate. Both PcGSTOs WT were fully inactive against CDNB.

The HsGSTO1.1, ortholog of PcGSTO3 has been shown to possess activity against various substrates, including dimethylarsinate and 2-bromo-4'-phenylacetophenone (12, 13). In both cases, a glutathione adduct occurred followed by a deglutathionylation reaction catalyzed by the enzyme, preventing access to the initial substrate concentrations and also to kinetic parameters. As expected, PcGSTO3 was active in these tests in the presence of glutathione, whereas PcGSTO3 C37S, PcGSTO1 WT, and PcGSTO1 C86S were fully inactive (data not

shown). To determine the catalytic parameters, PAP-SG was synthesized and purified, and the activity against this substrate was followed by analytical HPLC in the presence of GSH (Table 3). In these conditions, only PcGSTO3 is active with a catalytic efficiency of around $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a value greater than that obtained for HsGSTO1-1 ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (39). The incubation of previously reduced PcGSTO3 in the presence of PAP-SG without addition of GSH led to the formation of phenacylaceto-phenone detected by analytical HPLC (supplemental Fig. 2A). This deglutathionylated product is not observed either in the presence of native purified protein (*i.e.* with a glutathione adduct) or in the presence of PcGSTO3 C37S. These results are in accordance with the involvement of Cys³⁷ in the deglutathionylation activity leading to the formation of a disulfide bridge with the glutathione removed from PAP-SG. This hypothesis was confirmed by mass spectrometry analysis of the resulting protein showing the presence of a glutathione adduct (data not shown).

In additional experiments, we tested quinones previously incubated with reduced glutathione as substrates for PcGSTOs. In these conditions, Michael addition occurred leading to the formation of glutathione adducts corresponding to *S*-glutathionyl-*p*-hydroquinones (40, 41). As shown in Fig. 3, addition of reduced glutathione strongly modified the absorbance spectrum of 1,4-benzoquinone with the appearance of a peak maximum at 305 nm in accordance with the formation of *S*-glutathionyl-*p*-benzohydroquinone as described previously (42). Addition of PcGSTO1 led to a strong modification of the absorbance spectrum, with the disappearance of the 305-nm peak and the formation of a peak at 290 nm corresponding to *p*-benzohydroquinone. In contrast, no effect was observed in the presence of PcGSTO1 C86S and PcGSTO3 (data not shown). All these data were consistent with a deglutathionylation reaction of *S*-glutathionyl-*p*-benzohydroquinone. As expected, the activity of PcGSTO1 against *S*-glutathionyl-*p*-benzohydroquinone led to the production of GSSG as revealed by a coupled enzymatic test performed using glutathione reductase (data not shown). Similar data were obtained using menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone), the glutathionylated product (*S*-glutathionyl-naphthoquinone) being characterized by an absorbance peak at 425 nm (data not shown) (43). The obtained results suggested a preference of PcGSTO1 for aromatic substrates in contrast to PcGSTO3. To obtain catalytic parameters,

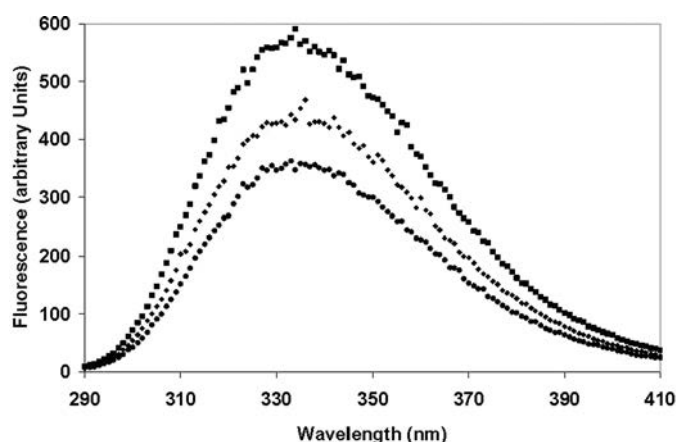


FIGURE 2. Fluorescence spectra of PcGSTO3 under different redox states. Emission spectra of native (◆), DTT-reduced (■), and subsequently GSSG-oxidized (●) PcGSTO3 (excitation at 290 nm) were recorded with 10 μM protein at 25 °C in TE buffer, pH 8.0. The reduced PcGSTO3 was obtained by a treatment of 10 μM protein with 400 μM DTT. PcGSTO3 was oxidized using 10 mM GSSG after DTT reduction.

TABLE 3

Kinetic parameters of PcGSTO1 and PcGSTO3 in HED, DHA, and CDNB activity assays

The apparent K_m value for GSH in the DHA assay was determined using a GSH concentration range of 0.2–4 mM in the presence of 2 mM DHA for PcGSTO1 and PcGSTO3. The apparent K_m value for GSH was determined for PcGSTO3 C37S in the CDNB assay using a GSH concentration range of 0.1–2 mM in the presence of 2 mM CDNB. The apparent K_m value for DHA was determined using a concentration range of 0.1–4 mM in the presence of 3 mM GSH. The apparent turnover values (k_{cat}) for HED were determined in the presence of 4 mM GSH and 4 mM HED. The apparent K_m value for CDNB was determined using a concentration range of 0.1–2 mM in the presence of 2 mM GSH. Concerning PAP-SG and thiodione, the apparent K_m values were determined using a substrate concentration range of 0.015–4 mM. The apparent K_m and k_{cat} values were calculated by nonlinear regression using the Michaelis-Menten equation. Data are represented as mean $\pm$ S.D. ($n \geq 3$). ND means not detected. The detection limit was estimated at 0.5 mIU for spectrophotometric tests, whereas 0.5 nmol of either menadione or phenacylaceto-phenone was detected using analytical HPLC.

	GSH	HED	DHA	CDNB	PAP-SG	Thiodione
K_m (mM)						
PcGSTO1	1.65 $\pm$ 0.33		1.84 $\pm$ 0.40	ND	ND	2.00 $\pm$ 0.62
PcGSTO3	1.44 $\pm$ 0.25		0.33 $\pm$ 0.07	ND	0.47 $\pm$ 0.19	ND
PcGSTO3 C37S	0.18 $\pm$ 0.04			0.97 $\pm$ 0.27	ND	ND
k_{cat} (s^{-1})						
PcGSTO1		2.67 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.17		ND	19.75 $\pm$ 2.31
PcGSTO3		15.75 $\pm$ 0.26	0.97 $\pm$ 0.06		19.01 $\pm$ 2.89	ND
PcGSTO3 C37S		ND	ND	18.43 $\pm$ 1.90	ND	ND

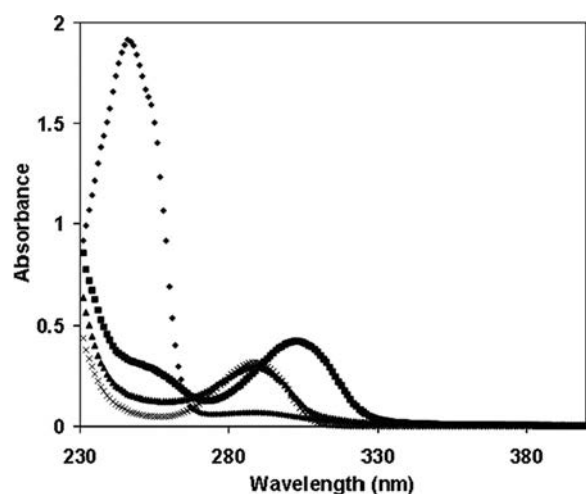


FIGURE 3. **PcGSTO1 activity against S-glutathionyl-p-benzohydroquinone.** Absorption spectra have been recorded adding successively in 1 ml at 25 °C in TE buffer, pH 8.0, 1 μ M *p*-benzoquinone ($\diamond$), 5 μ M reduced GSH ($\blacksquare$), and 0.28 μ M PcGSTO1 ($\circ$). In a separate experiment, as control, absorption spectrum of 1 μ M *p*-benzohydroquinone was recorded at 25 °C in TE buffer, pH 8.0.

S-glutathionyl-naphthoquinone, also called thiodione, was synthesized and purified, and the activity against this substrate was followed by analytical HPLC (Table 3). The activity of PcGSTO1 against thiodione leads to the formation of a product that elutes with the same retention time as menadione (data not shown). The k_{cat} value with this substrate is around 10-fold higher than the values obtained with HED and DHA. No activity against thiodione was detected using PcGSTO1 C86S, confirming the importance of the cysteinyl residue in the catalysis of the deglutathionylation reaction. In additional experiments, no glutathione was added in a mixture containing PcGSTO1 and thiodione, the results of the reaction being analyzed by HPLC (supplemental Fig. 2B). In these conditions, addition of reduced PcGSTO1 led to the formation of menadione. Analysis by mass spectrometry of the resulting protein showed the presence of a glutathione adduct (data not shown). No menadione formation was observed when PcGSTO1 C86S was used.

Dimerization—Size exclusion chromatography and dynamic light scattering were used to determine the oligomeric nature of the native forms of PcGSTO1 and PcGSTO3. The retention times of the size exclusion chromatography allowed estimation of the following native molecular masses: ~85,000 Da for PcGSTO1 and ~62,000 Da for PcGSTO3. Similar results have been obtained using dynamic light scattering suggesting that both enzymes were dimers.

Crystal Structure of PcGSTO1—The structure of PcGSTO1 has been solved to 2.3 Å resolution by single wavelength anomalous dispersion using crystals of SeMet-PcGSTO1 (Table 1). The crystals belonged to the space group C2, and the asymmetric unit consisted of two polypeptide chains (monomer A, residues Glu³⁸–Asp³⁵¹; monomer B, residues Phe⁵⁴–Asp³⁵¹; root mean square deviation, 0.348 Å for 298 superimposed α atoms), one GSH molecule not covalently bound and 223 water molecules. Crystal packing analysis using PISA (44) suggested that the asymmetric unit content corresponded to a dimer. The two protomers are related to each other by a noncrystallographic 2-fold symmetry axis.

PcGSTO1 adopts the canonical GST fold composed of an N-terminal thioredoxin-like domain and a C-terminal α -helix domain. It also possesses several additional features as follows: a long N-terminal coil of 77 residues; a loop that connects β 2 to α 2 elongated by 20 residues compared with typical GSTs; and a C-terminal extension corresponding to a ninth α -helix followed by a coil of 20 residues (Fig. 4 and supplemental Fig. 1).

This helix α 9 (Phe³¹⁹ to Ile³³³) is the only secondary structure among these supplementary features. It adds to the α -helix domain, near the C-terminal end of helix α 6, so that it also interacts with the thioredoxin-like domain via the short loop that connects the strand β 1 and the α -helix α 1 and via the long loop that goes from β 2 to α 2. Helix α 9 is a structural characteristic of GST Omega (10) and is also present in GST Tau (45) and GST Delta (46). In these GSTs, the few residues that follow α 9 (when they exist) go toward the thioredoxin-like domain to interact with the loops β 1– α 1 and β 2– α 2. In PcGSTO1, the long loop observed between β 2 and α 2 hinders this interaction, so the 20 residues that follow α 9 in PcGSTO1 form a coil that runs at the opposite side of the thioredoxin-like domain, antiparallel to α 9.

This C-terminal coil allows the formation of a dimer that completely differs from the usual GST dimer, where the two PcGSTO1 monomers associate exclusively via their α -helix domains (Fig. 4), with a large buried area (3100 Å²) as determined by PISA (44). After α 9, the 20 C-terminal residues of one monomer mainly interact with residues of the helix α 5 N-terminal end (H-bonds to the side chains of Gln²³¹ and Tyr²³⁴), next with a residue of the α 6 C-terminal end (Thr²⁸³), and then with a residue of the loop that follows (Asn²⁸⁸), in the other monomer. These direct hydrogen bonds only concern the main chain atoms of the C-terminal end and add to several hydrophobic contacts. Is this dimer a crystal artifact or a physiological entity? The large surface of contact between the protomers and the involvement of the C-terminal coil, specific to PcGSTO1 and related proteins, in the inter-monomer interactions argue for a physiological dimer, as do the dynamic light scattering and size exclusion chromatography results. Furthermore, this dimer, different from the canonical GST dimer, is similar to the dimer assigned by Cuff *et al.* (Midwest Center for Structural Genomics) in the crystal structure of a putative glutathione S-transferase from *Corynebacterium glutamicum* recently released by the Protein Data Bank (PDB code 3M1G).⁴ The similar dimerization mode appears clearly related to a monomer structure found by DALI (47) to be the closest to the PcGSTO1 structure (root mean square deviation, 1.092 Å for 233 superimposed residues).

PcGSTO1 also possesses an N-terminal extension with respect to other GSTs, by far much longer than the 20 residues observed in GSTOs, because 77 residues precede the entrance to β 1. No electron density was observed for the 37 first residues, which were thus supposed to be highly disordered. Residues Glu³⁸ to Ser⁵³ were only observed in monomer A (see under “Experimental Procedures”). The main chain of residues 38–53 first runs between the long loop that connects β 2 to α 2 and the

⁴ M. E. Cuff, N. Marshall, G. Cobb, and A. Joachimiak, unpublished results.

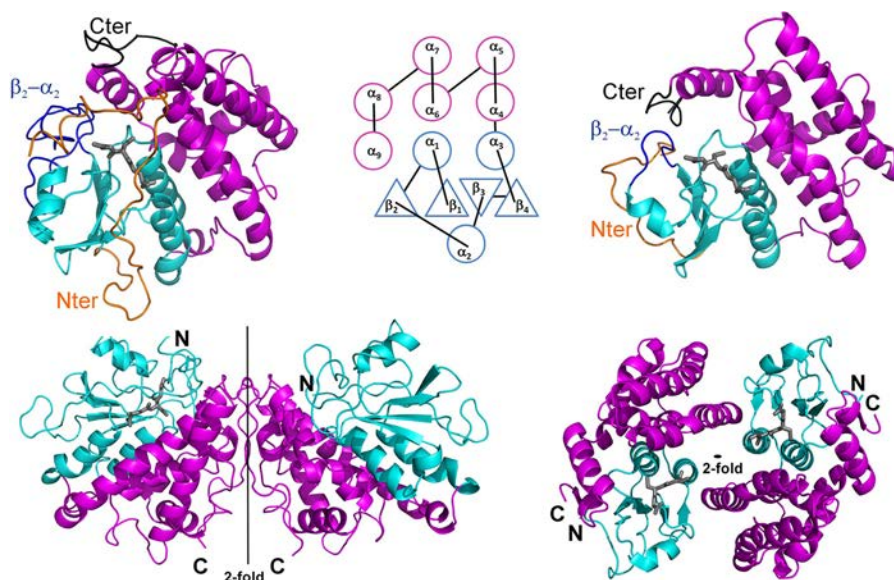


FIGURE 4. **Schematic drawing of the PcGSTO1 (left) and HsGSTO1-1 (10) (right) structures.** The monomers are displayed at the top separated by their common topology diagram mentioning the secondary structure numbering; the dimers are shown at the bottom, with orientations chosen to render their assembling at most. In each case, the thioredoxin-like domain is colored in cyan, and the α -helix domain is in purple. In monomers, the other colors emphasize the features that distinguish PcGSTO1 from HsGSTO1-1 as follows: the N-terminal coil in orange, the loop that connects the strand β_2 to the α -helix α_2 in blue, and the C-terminal coil in black. The gray sticks correspond to glutathione, only present in one monomer of PcGSTO1 and in the two monomers of HsGSTO1-1.

loop that goes from α_2 to β_3 in the N-terminal thioredoxin-like domain. Then it interacts with the short loop between α_4 and α_5 in the α -helix domain, where it forms a turn before it enters the region Phe⁵⁴–Arg⁷⁷ observed in both monomers. This segment adopts an extended conformation to return toward the N-terminal domain. There it interacts with the loops that connect α_2 to β_3 and β_4 to α_3 , before it runs all along α_3 , parallel to it. Then it enters β_1 . The conformation of the PcGSTO1 N-terminal end confers it with the original property to form part of the active site, composed of the G-site for GSH binding and the H-site, which receives the hydrophobic part of the glutathionylated substrate.

The G-site—Only monomer A displayed an electron density consistent with modeling of a GSH molecule (see under “Experimental Procedures”). However, no major structural difference between monomers A and B was observed that could account for an asymmetric binding of GSH. Nevertheless, in this structure only residues that belong to monomer A contributed to GSH binding.

No disulfide bridge exists between the GSH cysteine side chain and the catalytic residue Cys⁸⁶ situated at the N-terminal end of helix α_1 (Fig. 5). The sulfur to sulfur distance is 3.9 Å; the electron density is unambiguous, and careful analysis of the diffraction data reveals no radiation damage that could have disrupted a pre-existing disulfide bond. Superposition of the structures of PcGSTO1 and HsGSTO1-1 (where a disulfide bridge exists) shows a conserved orientation of the catalytic cysteine side chain. On the contrary, a displacement of the GSH Sγ2 atom is observed in PcGSTO1, which results from slight differences in the rotation angles around the bond between Cγ1 and Cδ1 in the GSH glutamyl residue and around the bond between Ca2 and Cβ2 in the GSH cysteinyl side chain. The latter points toward three tyrosine residues (Fig. 5), the hydroxyl groups of which form a hydrogen bond network; in

particular, the GSH Sγ2 atom lies at 3.25 Å from the Tyr²²³ OH group tightly hydrogen-bonded to the Tyr³²⁶ OH.

In addition to the usual interactions with the main chain of a residue (Val¹⁵⁸) that precedes the conserved *cis*-proline at the entrance of the strand β_3 , the GSH cysteine main chain forms an additional hydrogen bond between its CO group and the Nε1 atom of Trp¹¹⁹, situated in the long loop between β_2 and α_2 absent in most GSTs (Fig. 5). In the same way, besides the usual stabilization of the GSH glutamyl residue (main chain by residues Glu¹⁷³ and Ser¹⁷⁴ from the loop between β_4 and α_3 and aliphatic part of the side chain by hydrophobic contact with Trp⁸⁸ from the N-terminal end of α_1), an additional hydrogen bond was observed between the GSH glutamyl atom Oε1 and the Nη1 atom of Arg⁵⁶ in the long N-terminal extension of PcGSTO1. Finally, the oxygen atoms of the carboxylic group of the GSH glycyl residue form two hydrogen bonds with the side chain of Arg¹⁵⁵ situated in the loop between α_2 and β_3 slightly longer than in the other GSTs (Fig. 5), although usually only one bond is observed with a basic residue (48).

To summarize, some of the additional features that PcGSTO1 displays with respect to other GSTs (the long N-terminal end, the long loop between α_2 and β_2 , and the few supplementary residues between α_2 and β_3) contribute to GSH binding. They squeeze GSH so much that only 45 Å² of its surface is accessible to solvent (Fig. 5). As a comparison, this value is 148 Å² in HsGSTO1.1. The active site seems so enclosed that it raises the question of its accessibility not only to the GSH part of the glutathionylated substrate but also to its hydrophobic part.

The Putative H-site—The lack of a structure of PcGSTO1 with a bound *S*-glutathionylated substrate forbids direct experimental delineation of the H-site. The PcGSTO1 surface shows no clear accessible cavity that could accommodate the hydrophobic part of the aromatic *S*-glutathionylated substrate (Fig.

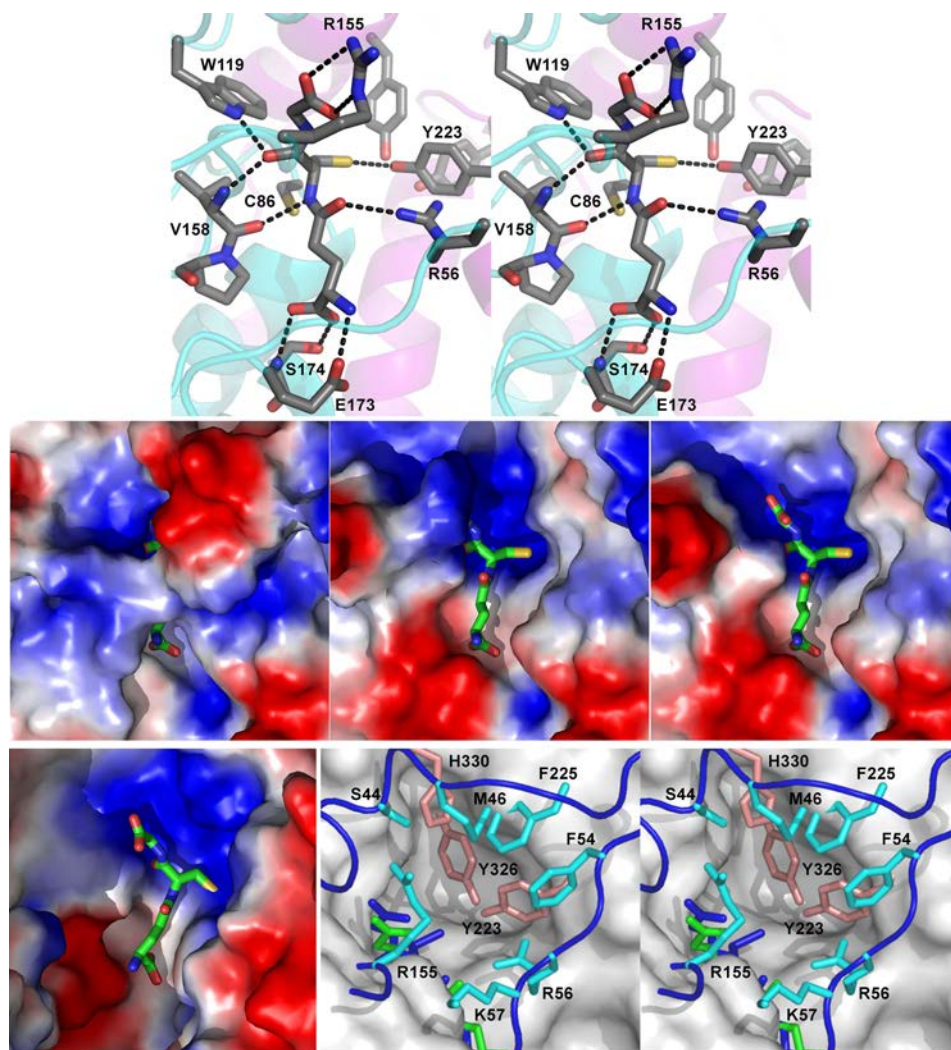


FIGURE 5. **Substrate-binding sites of PcGSTO1 and HsGSTO1-1 (10).** *Top*, stereo view of the hydrogen bond network formed by the active site residues around GSH in PcGSTO1. The schematic trace of the polypeptide main chain is suggested in cyan (thioredoxin-like domain) and purple (α -helix domain). *Middle*, PcGSTO1 electrostatic surface (blue, positive charge; red, negative charge) of PcGSTO1 in the region of GSH (shown as sticks). *Left panel*, calculated with all the residues observed for monomer A in the crystallographic model (Glu³⁸–Asp³⁵¹); *middle panel*, calculated without the N-terminal coil (*i.e.* with residues Tyr⁷⁸–Asp³⁵¹); *right panel*, same as previous but without Arg¹⁵⁵. *Bottom*, HsGSTO1-1 active site compared with PcGSTO1. *Left panel*, electrostatic surface calculated for the HsGSTO1-1 dimer, in the region of GSH (shown as sticks). *Right panel*, stereo view of the accessible surface of HsGSTO1-1 (gray) in the region of GSH (green), superimposed to the PcGSTO1 active site containing the GSH (blue sticks). Residues Tyr²²³, Tyr³²⁶, and His³³⁰ fill the pocket defined by Board *et al.* (10) as the HsGSTO1-1 active site. Residues in cyan and in orange form a second and a third layers of residues that almost close the PcGSTO1 active site.

5). Comparison with HsGSTO1-1 emphasizes the absence of a large binding pocket; the bottom of the HsGSTO1-1 putative H-site (formed by Phe³¹, Cys³², Pro³³, Arg¹⁸³, Trp²²², and nearby residues (10)) is filled, in PcGSTO1, by Tyr²²³ and Tyr³²⁶, which surround the GSH cysteinyl side chain, and by Arg⁵⁶, Cys⁸⁶, and His³²⁵ (Figs. 1 and 5). Ser⁴⁴, Met⁴⁶, Phe⁵⁴, Lys⁵⁷, Arg¹⁵⁵, Phe²²⁷, and His³³⁰ form a narrow, deep cylindrical hole, incompatible with access and binding of a bulky substrate.

Searching in the PDB for X-ray structures of GSTs in complex with *S*-glutathionylated substrates, 1-(*S*-glutathionyl)-(2,4-dinitrobenzene) was found to be the closest analog to *S*-glutathionyl-*p*-benzohydroquinone. It has been used as a substrate by the GSTs of the classes Mu from rat (PDB code 5GST (49)) and human (PDB code 1XWK (50)), Pi from human (PDB code 18GS (51)), Sigma from squid (PDB code 1GSQ (52)),

and Alpha from chicken (PDB code 1VF3).⁵ In each of these structures, 1-(*S*-glutathionyl)-(2,4-dinitrobenzene) leans its benzene ring against the hydrophobic side chains of the residues that belong to the α 4 C-terminal end, and it often interacts with the first N-terminal residue of α 1 (using PcGSTO1 numbering of secondary structures). Comparable interactions could be obtained using Trp⁸⁸, Tyr²²³, and Phe²²⁷, but they would require a slightly different positioning of the 1-(*S*-glutathionyl)-(2,4-dinitrobenzene) glutathionyl part with respect to the current position of GSH in PcGSTO1. Indeed, in the structure, GSH appears too shifted toward the α -helix domain, with its cysteinyl sulfur atom exactly aligned on the α 1 axis. The current position of the long N-terminal loop shows that residues such as Met⁴⁶, Phe⁵⁴, or Arg⁵⁶ could also be involved, but once again,

⁵ S. C. Lin, Y. C. Lo, M. F. Tam, and Y. C. Law, unpublished results.

the main question concerns access of the substrate to its binding site, which would likely require a movement of the N-terminal loop.

DISCUSSION

Compared with other organisms, the GSTO class of enzymes is considerably larger in saprotrophic fungi and particularly in *P. chrysosporium*. From primary structure homology, this class could be divided in three different subclasses in fungi (9), one related to plant Lambda GSTs and bacterial GSTs, whereas the second and the third subclasses are related to animal isoforms. In accordance with our first phylogenetic analysis (9), Xun *et al.* (17) have recently proposed from a study of the bacterial homologs of PcpF that the proteins belonging to the Omega subclass I constitute a new class of GSTs named *S*-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases.

The present x-ray structure of PcGSTO1 confirms that it should be considered as the member of a new class of GSTs. Indeed, the GST canonical fold (a thioredoxin-like domain followed by a α -helix domain) is complemented by additional specific features as follows: the long N-terminal coil (77 residues) that covers the active site and participates in glutathione binding, as does the long loop (about 30 residues) between the strand β 2 and the α -helix α 2, and finally the C-terminal coil (20 residues after the ninth α -helix) that allows an original dimerization mode where the monomers interact via their α -helix domain (also observed for a putative GST from *C. glutamicum*).⁴ All these features clearly contrast with the HsGSTO1-1 structure (10).

As shown for members of the Omega class, the main characteristic of GHRs is the presence of a conserved cysteine in their catalytic site. From a biochemical point of view, as shown previously (10) and in this study, GHRs and GSTOs share the ability to reduce various substrates such as HED and DHA using glutathione. Concerning PcGSTO1 and PcGSTO3, we propose from fluorescence experiments (for PcGSTO3) and free thiol and mass measurements that the catalytic cysteine is involved in the deglutathionylation activity leading to the formation of a disulfide bridge with the removed glutathione from their substrate. This hypothesis is in accordance with experiments performed using thiodione or PAP-SG as substrates, because the appearance of the deglutathionylated products is observed in the absence of added glutathione, a glutathione-adduct being detected in these conditions on the resulting proteins. Furthermore, these activities require the presence of the catalytic cysteine. This common mechanism has been described at least for monothiol glutaredoxin (23), human GSTOs (10), and bacterial GHRs (16). In PcGSTO3, as shown previously for HsGSTO1-1, a change of the catalytic cysteine to a serine allows reversal of the activity of the protein allowing the mutated protein to catalyze glutathione transfer, and it also confirms the presence of a disulfide bridge between Cys-37 and glutathione in PcGSTO3 WT. For PcGSTO1, biochemical data are also in accordance with the formation of a disulfide bridge between the catalytic Cys-86 and glutathione. Similar results have been obtained for the bacterial ortholog PcpF (16). However, this disulfide bridge is not present in the crystal structure of PcGSTO1. X-rays could have disrupted the bond, but this should have taken place very

rapidly at the beginning of the radiation exposure because no residual electron density corresponding to this bond was observed and the sulfur to sulfur distance is large (3.9 Å), contrary to documented cases where such a phenomenon has been described. At the moment, the reasons for the discrepancy between the PcGSTO1 x-ray structure and the results of thiol titrations concerning the presence of a disulfide bond remain to be elucidated.

As defined by Xun *et al.* (17), the main biochemical characteristic of GHRs is the ability to remove glutathione from *S*-glutathionyl-(chloro)hydroquinone substrates. In this study, we have shown that in contrast to PcGSTO3, PcGSTO1 is active against *S*-glutathionyl-*p*-hydroquinone. Binding of *S*-glutathionyl-*p*-hydroquinone can be modeled from the PcGSTO1 structure, one monomer of which was observed in complex with GSH. Glutathione adopts a conformation very close to that observed in HsGSTO1-1. However, on the contrary to the latter, GSH is more buried in PcGSTO1. It results from new interactions with residues that belong to the features characteristic of PcGSTO1 as follows: Arg⁵⁶ in the N-terminal coil, Trp¹¹⁹ in the loop β 2- α 2, and Arg¹⁵⁵ in the loop α 2- β 3. The additional coils close the cleft usually present between the Trx-like domain and the α -helix domain, near the loop β 1- α 1 in which is the catalytic residue Cys⁸⁶. Furthermore, the side chains of Tyr²²³ and Tyr³²⁶ here shut up the pocket present near the catalytic cysteine in HsGSTO1-1. Even if conformational adaptation occurs upon substrate binding, it would hardly concern these residues because they belong to α -helices. Hence, a substrate-binding site different from the putative pocket in HsGSTO1-1 has to be considered for the hydroquinone adduct. It could involve Trp⁸⁸, Tyr²²³, and Phe²²⁷. All the PcGSTO1 residues involved either in the G-site or the putative H-site are conserved in the bacterial homologs (ScPcpF and EcYqjG, see Fig. 1), although they are different or absent in other GSTs (see supplemental Fig. 1). Once again, comparison of the PcGSTO1 and HsGSTO1-1 structures in the light of their substrate-binding site emphasizes the need to consider GHRs as having a new GST structure, different from the Omega class.

In agreement with our previous phylogenetic analysis (9), the biochemical and structural data presented in this study and the recent proposition of Xun *et al.* (17), we propose to change the name of PcGSTO1 in PcGHR1 with regard to the enzymatic function and to define a new structural class of GSTs named GST xi, characterized by their canonical GST fold complemented by specific features and their new dimerization mode. Thus, this paper describes this newly defined *S*-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductase from *P. chrysosporium* as a member of the new structural class xi of GSTs, which would also contain the structure of the putative GST from *C. glutamicum*.

As for PcpF (16), PcGHR1 in *P. chrysosporium* could be involved in the catabolism of pentachlorophenol. In this fungus, the reductive dehalogenation of pentachlorophenol requires indeed at least two enzymes, a glutathione transferase for glutathionylation and an enzyme called glutathione conjugate reductase for deglutathionylation of the resulting *S*-glutathionyl-*p*-hydroquinones (53–55). From the biochemical data presented in this study, we postulated that PcGHR1 or the second

isoform PcGHR2 (formerly named PcGSTO2 (9)) is responsible for this latter reaction. The wide presence of GHRs in bacteria, fungi, and plants suggests an additional physiological role beyond the degradation of the recently introduced pentachlorophenol. Concerning the white rot fungi, their main physiological feature is their ability to mineralize wood components and in particular lignin. It has been suggested recently that chlorination of lignin is a phenomenon occurring through, at least in part, the activity of chloroperoxidase (56, 57). As a result, soils and decayed plant litter contain significant quantities of chlorinated aromatic polymers, which could lead after oxidation via various oxidative systems to the formation of chlorinated quinones. GHRs could play a central role in the intracellular detoxication pathways of such molecules. On the other hand, the significance of the Omega class extension in saprotrophic fungi remains unclear, and the function of the different GSTO isoforms in white rot fungi remains to be elucidated.

Acknowledgments—We thank the staff of the BM30A beamline at ESRF for their kind assistance during data collection, Arnaud Gruez for numerous discussions, and Jean-Michel Girardet for technical assistance.

REFERENCES

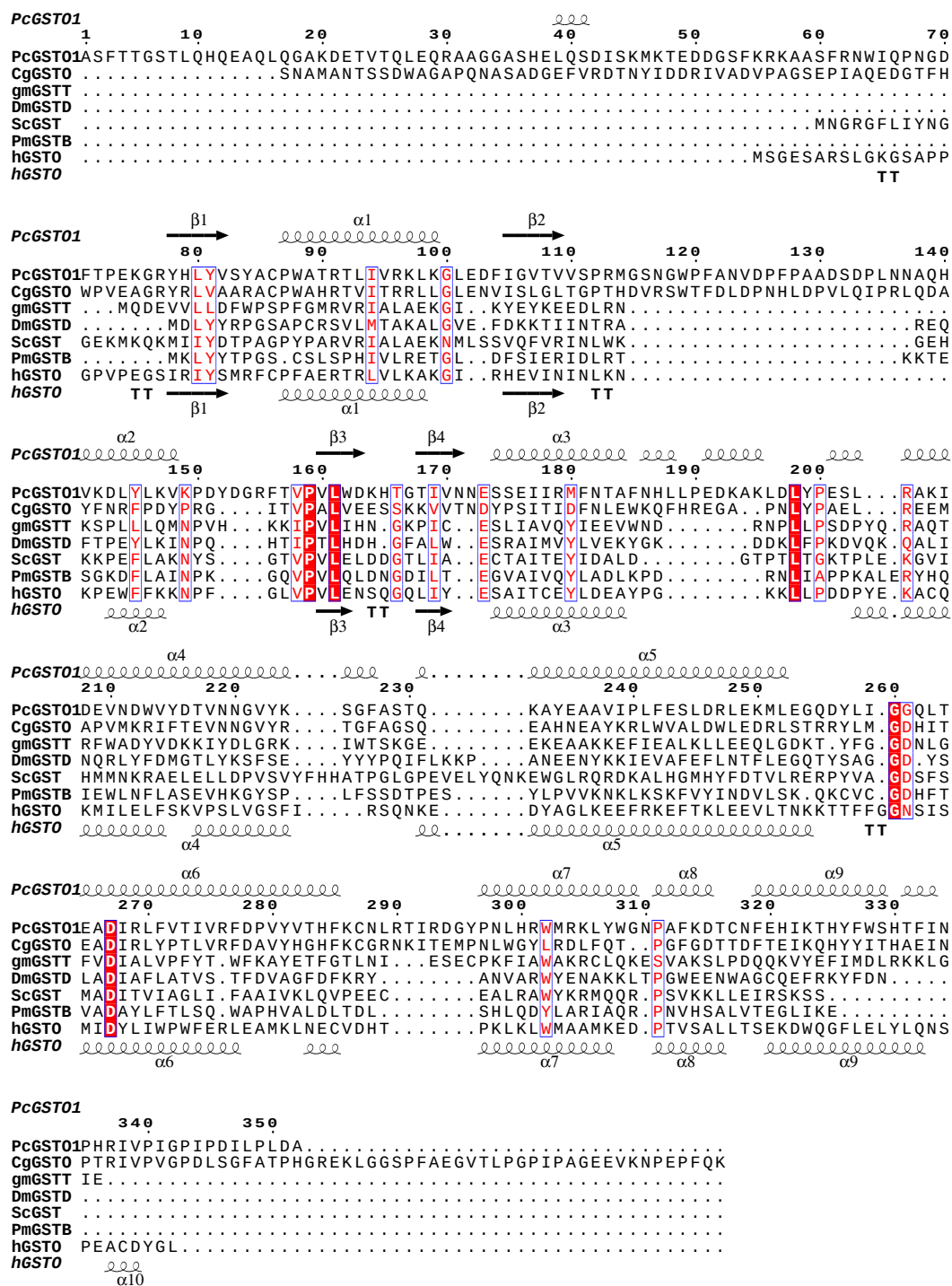
- Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henriissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokhsar, D. (2004) *Nat. Biotechnol.* **22**, 695–700
- Morel, M., Kohler, A., Martin, F., Gelhaye, E., and Rouhier, N. (2008) *New Phytol.* **180**, 391–407
- Morel, M., Ngadin, A. A., Jacquot, J. P., and Gelhaye, E. (2009) *Adv. Bot. Res.* **52**, 153–186
- Doddapaneni, H., and Yadav, J. S. (2005) *Mol. Genet. Genomics* **274**, 454–466
- Kasai, N., Ikushiro, S., Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., Ohta, M., and Sakaki, T. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 103–108
- Kasai, N., Ikushiro, S., Shinkyo, R., Yasuda, K., Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., and Sakaki, T. (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 773–780
- Matsuzaki, F., and Wariishi, H. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 387–393
- Schröder, P., Scheer, C. E., Diekmann, F., and Stampfl, A. (2007) *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **14**, 114–122
- Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P., and Gelhaye, E. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3711–3725
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrunk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F., and Pandit, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 24798–24806
- Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I., and Pearson, W. R. (2005) *Methods Enzymol.* **401**, 1–8
- Board, P. G., Coggan, M., Cappello, J., Zhou, H., Oakley, A. J., and Anders, M. W. (2008) *Anal. Biochem.* **374**, 25–30
- Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M., and Board, P. G. (2005) *Methods Enzymol.* **401**, 78–99
- Burmeister, C., Lüersen, K., Heinick, A., Hussein, A., Domagalski, M., Walter, R. D., and Liebau, E. (2008) *FASEB J.* **22**, 343–354
- Zakharyan, R. A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S. M., Tsapralis, G., Board, P. G., Liebler, D. C., and Aposhian, H. V. (2001) *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1051–1057
- Huang, Y., Xun, R., Chen, G., and Xun, L. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 7595–7600
- Xun, L., Belchik, S. M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H., Sanchez, E., Kang, C., and Board, P. G. (2010) *Biochem. J.* **428**, 419–427
- Garcera, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J., and Herrero, E. (2006) *Biochem. J.* **398**, 187–196
- Herrero, E., Ros, J., Tamarit, J., and Belli, G. (2006) *Photosynth. Res.* **89**, 127–140
- Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes, R., and Steinbiss, H. H. (1995) *Bio-Techniques* **19**, 196–198, 200
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L., and Sweet, R. M. (1993) *Nature* **362**, 219–223
- Koh, C. S., Navrot, N., Didierjean, C., Rouhier, N., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wingsle, G., Samian, R., Jacquot, J. P., Corbier, C., and Gelhaye, E. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 23062–23072
- Couturier, J., Koh, C. S., Zaffagnini, M., Winger, A. M., Gualberto, J. M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J. P., Lemaire, S. D., Didierjean, C., and Rouhier, N. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 9299–9310
- Nickerson, W. J., Falcone, G., and Strauss, G. (1963) *Biochemistry* **2**, 537–543
- Vince, R., Daluge, S., and Wadd, W. B. (1971) *J. Med. Chem.* **14**, 402–404
- Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charraut, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P., and Ferrer, J. L. (2002) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 805–814
- Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800
- Collaborative Computational Project No. 4 (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S., and Tucker, P. A. (2005) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61**, 449–457
- Schneider, T. R., and Sheldrick, G. M. (2002) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1772–1779
- Sheldrick, G. M. (2002) *Z. Kristallogr.* **217**, 644–650
- Cowan, K. (1994) *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**, 34–38
- Morris, R. J., Zwart, P. H., Cohen, S., Fernandez, F. J., Kakaris, M., Kirillova, O., Vonnrhein, C., Perrakis, A., and Lamzin, V. S. (2004) *J. Synchr. Rad.* **11**, 56–59
- Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S. (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458–463
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P. I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y., and Jacquot, J. P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14545–14550
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Laurent, P., Sautière, P. E., Martin, F., and Jacquot, J. P. (2002) *Physiol. Plant.* **114**, 165–171
- Board, P. G., and Anders, M. W. (2007) *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 149–154
- Rao, D. N., Takahashi, N., and Mason, R. P. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17981–17986
- Song, Y., Wagner, B. A., Witmer, J. R., Lehmler, H. J., and Buettner, G. R. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 9725–9730
- Brunmark, A., and Cadenas, E. (1988) *Chem. Biol. Interact.* **68**, 273–298
- Mauzeroll, J., and Bard, A. J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7862–7867
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797
- Thom, R., Cummins, I., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J., and Laphorn, A. J. (2002) *Biochemistry* **41**, 7008–7020
- Oakley, A. J., Harnnoi, T., Udomsinprasert, R., Jirajaroenrat, K., Ketterman, A. J., and Wilce, M. C. (2001) *Protein Sci.* **10**, 2176–2185
- Holm, L., and Rosenström, P. (2010) *Nucleic Acids Res.* **38**, Suppl. W545–W549
- Vararattanavech, A., and Ketterman, A. J. (2007) *Biochem. J.* **406**, 247–256
- Ji, X., Armstrong, R. N., and Gilliland, G. L. (1993) *Biochemistry* **32**, 12949–12954

50. Patskovsky, Y., Patskovska, L., Almo, S. C., and Listowsky, I. (2006) *Biochemistry* **45**, 3852–3862
51. Oakley, A. J., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Mazzetti, A. P., and Parker, M. W. (1999) *J. Mol. Biol.* **291**, 913–926
52. Ji, X., von Rosenvinge, E. C., Johnson, W. W., Tomarev, S. I., Piatigorsky, J., Armstrong, R. N., and Gilliland, G. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 5317–5328
53. McCarthy, D. L., Navarrete, S., Willett, W. S., Babbitt, P. C., and Copley, S. D. (1996) *Biochemistry* **35**, 14634–14642
54. Reddy, G. V., and Gold, M. H. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 901–905
55. Reddy, G. V., and Gold, M. H. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **391**, 271–277
56. Ortiz-Bermúdez, P., Hirth, K. C., Srebotnik, E., and Hammel, K. E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 3895–3900
57. Ortiz-Bermúdez, P., Srebotnik, E., and Hammel, K. E. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5015–5018

Supplemental Figure 1: Sequence alignment based on the structural superimposition of PcGSTO1 and GSTs representative of different classes found by DALI (46) to be the closest structural neighbors of PcGSTO1.

CgGSTO : GST from *Corynebacterium glutamicum* (PDB ID 3M1G, UniProKB ref. Q8NR03, Midwest Center for Structural Genomics, unpublished results); gmGSTT : a tau class GST from *glycine max* (PDB ID 2VO4 (58), UniProKB ref. O49235); DmGSTD: a delta class GST from *Drosophila melanogaster* (PDB ID 3F6F, UniProKB ref. Q9VGA1, Wongsantichon and coworkers, unpublished results); ScGST, a GST from *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID 3ERF (59), UniProKB ref. Q12390); PmGSTB, a beta class GST from *Proteus mirabilis* (PDB ID 2PMT (60), UniProKB ref. P15214); hGSTO, a omega class GST from human (PDB ID 1EEM (10), UniProKB ref. P78417). The sequence alignment was generated with the programs STRAP (61) and ESPript (62). PcGSTO1 and hGSTO secondary structure elements are shown above and below the sequence alignment, respectively.

58. Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., and Labrou, N. E. (2009) *J. Mol. Biol.* **385**, 984-1002
59. Ma, X. X., Jiang, Y. L., He, Y. X., Bao, R., Chen, Y., and Zhou, C. Z. (2009) *EMBO Rep.* **10**, 1320-1326
60. Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S. C., Allocati, N., Masulli, M., De Illio, C., and Parker, M. W. (1998) *Structure (Lond.)* **6**, 721-734
61. Gille, C., and Frommel, C. (2001) *Bioinformatics* **17**, 377-378
62. Gouet, P., Robert, X., and Courcelle, E. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3320-3323



Supplemental Table 1 : Primers used in this study.

The *Nco*I and *Bam*HI cloning restriction sites are underlined in the primers. The mutagenic codons are in bold.

Name	Sequence
GSTO1 full length for	5'CCCCCATGGCTACCACCATCTGCCTGCGA 3'
GSTO1 truncated for	5'CCCCCATGGCTAGCTTCACAACCGGCAGC 3'
GSTO1 rev	5'CCCCGGATCCTCAGGCGTCGAGAGGGAG 3'
GSTO3 for	5'CCCCCATGGCTCCCATCCCCGACGAG 3'
GSTO3 rev	5'CCCCGGATCCCTACGGGATATCACGGCC 3'
GSTO1 C86S for	5'TACGTCTCGTACGCGTCCCCTTGGGGCCACCCGC 3'
GSTO1 C86S rev	5'GCGGGTGGCCCAAGGGGACGCGTACGAGACGTA 3'
GSTO3 C37S for	5'TACGCTGGCTGGTTCAGTCCGTTTGTCCAGAGG 3'
GSTO3 C37S rev	5'CCTCTGGACAAACGGAAGTGAACCAGCCAGCGTA 3'

Article 3: Reduction of S-(glutathionyl)-benzoquinone by Glutathione hydroquinone reductases

Edgar MEUX, Pierre Alexandre LALLEMENT, Mélanie MOREL, Arnaud HECKER, Stéphane DUMARCAY, & Eric GELHAYE

Biochemistry - Rapid Reports (en préparation)

L'article précédent présentait la première caractérisation biochimique et structurale d'une GST fongique à cystéine catalytique appartenant la classe nouvellement identifiée des glutathionyl hydroquinone réductases (GHR). Présente chez les bactéries, champignons ou encore les plantes, cette classe d'enzymes catalyse spécifiquement la réduction de dérivés d'hydroquinones glutathionylés (GS-hydroquinone). Les hydroquinones sont considérées comme des polluants issus majoritairement de la dégradation et de la combustion de biomasse (plantes, dérivés ligninolytiques). Hautement réactifs, ces composés réagissent spontanément avec le glutathion présent au sein des cellules pour former un adduit glutathionylé possédant un fort pouvoir oxydant, et à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou de dommages sur les molécules biologiques. Ces travaux révèlent qu'en dépit d'une efficacité catalytique inférieure, les GHR fongiques et bactériennes (PcGHR1, EcYqjg) catalysent également la déglutathionylation de GS-benzoquinones (forme oxydée). Néanmoins ces enzymes ont une affinité 500 fois supérieure envers la forme GS-hydroquinone (forme réduite). Ces résultats indiquent que la reconnaissance du substrat et la catalyse impliquent la mise en place d'interactions entre le site actif des GHR et les atomes d'oxygène des noyaux quinones.

Reduction of S-(glutathionyl)-benzoquinone by Glutathione hydroquinone reductases

Edgar MEUX ^{a,b}, Pierre Alexandre LALLEMENT ^{a,b}, Mélanie MOREL ^{a,b}, Arnaud HECKER ^{a,b}, Stéphane DUMARCAY ^c and Eric GELHAYE ^{a,b,*}

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

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

c : Laboratoire d'études et de Recherches sur le Matériau Bois, EA 1093 UHP, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France

Corresponding author:

Eric Gelhaye, Université de Lorraine, IAM, UMR 1136, IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences et Technologies, Bld des Aiguillettes, BP 70239, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France.

Telephone : +33 3 83 68 42 28. Fax : + 33 3 68 42 28. Email : eric.gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr

Abstract

Glutathionyl hydroquinone reductases are members of the glutathione transferase superfamily and are involved in the deglutathionylation of quinones. In accordance with our previous data (Meux et al. 2011) and in contrast with the results of Lam et al. (Lam et al. 2012), we confirmed here that GHRs from *Phanerochaete chrysosporium* and *Escherichia coli* are active against both oxidized and reduced quinones, despite a clear preference of these enzymes for Glutathionyl hydroquinones. In addition, our data are in accordance with the presence of an enone intermediate during the deglutathionylation process.

Glutathionyl hydroquinone reductases (GHRs), which have been described in bacteria, fungi and plants, are enzymes related to the cytosolic glutathione transferase superfamily (Garcera et al. 2006; Xun et al. 2010; Belchik and Xun 2011; Meux et al. 2011). They exhibit specific structural features defining a new structural class Xi and are involved in the reduction of glutathionyl hydroquinones through the reactivity of a conserved cysteinyl residue (Garcera et al. 2006; Meux et al. 2011). In contrast with our previous observations on a fungal GHR (PcGHR1) from *Phanerochaete chrysosporium*, Lam et al. (Lam et al. 2012) reported in a recent paper that GHRs from different organisms are unable to react with the oxidized form of quinones (GS-benzoquinones) and are specific to the fully reduced forms (GS-hydroquinones). The aim of this paper was to confirm that GHRs and in particular PcGHR1 are able to reduce both GS-hydroquinone and GS-benzoquinones.

In order to investigate the specificity of *Phanerochaete chrysosporium* PcGHR1, S-glutathionyl-menadione, which is not commercially available, was *in vitro* synthesized from menadione and glutathione as described previously (Nickerson et al. 1963; Meux et al. 2011). ^{13}C NMR experiments of commercially available menadione and prepared GS-menadione carried out in deuterated DMSO on a Bruker AC200 spectrometer confirmed that the spontaneous conjugation of glutathione to menadione leading to the formation of GS-menadione with the observation of the characteristic signals for carbonyl carbons at 181.9 and 180.3 ppm (data not shown). In conjunction with NMR analysis, UV/visible spectral experiments were performed on Cary 50 Scan (VARIAN). The *in vitro* synthesized product exhibits absorption at 430 nm characteristic of GS-menadione in 100 mM Tris-HCl buffer pH 8. Addition of 1 mM NaBH_4 strongly modified the absorbance spectrum with the loss of the peak at 430 nm and the appearance of a maximum absorption at 320 nm in accordance with the reduction of GS-menadione (100 μM) to GS-menadiol (Figure 1). In contrast, addition of 1 mM of GSH induced no change in absorption spectra suggesting that 1 mM GSH did not induce apparent reduction of GS-menadione to GS-menadiol as shown previously (Lam et al. 2012). Nevertheless, addition of 1.3 μM of PcGHR1 prepared as described previously (Meux et al. 2011) to 100 μM GS-menadione and 1 mM GSH led to the loss of the absorbance at 430 nm characteristic of GS-menadione within a few minutes. The resulting products exhibit an absorption spectrum similar to that one induced by the commercial menadione suggesting that PcGHR1 is active against GS-menadione catalyzing the release of the glutathione adduct. Similar experiments have been performed using the recombinant protein EcYqjG, a GHR from *Escherichia coli*, which has been cloned, produced and

purified in a similar way than PcGHR1. When 1.2 μ M of EcYqjG was added to a mixture of 1 mM GSH and 100 μ M GS-menadione, the disappearance of the 430 nm absorption peak was also observed suggesting that EcYqjG is also active against GS-menadione.

In complementary experiment, GS-menadione (100 μ M) was added to 100 mM Tris buffer (pH 8) and the absorption at 430 nm was recorded during 10 minutes. After addition of GSH, no apparent change of absorption change at 430 nm was recorded, confirming that addition of 1 mM GSH did not result in apparent reduction of GS-menadione to GS-menadiol (Figure 2). Addition of 100 μ g of either PcGHR1 or EcYqjg to the mix led to the loss of the absorbance at 430 nm characteristic of GS-menadione, confirming that PcGHR1 and EcYqjg used GS-menadione as a substrate. To confirm the enzymatic action of both proteins, the catalytic mutants PcGHR1 C86S and EcYqjg C63S were prepared as described previously (Meux et al. 2011). No effect on GS-menadione was observed in the presence of these mutants. All these data were consistent with a deglutathionylation reaction of GS-menadione through the action of the catalytic cysteinyl residue.

In order to confirm the enzymatic reduction of GS-menadione, HPLC and mass analysis were performed. Two products were eluted at different retention times (figure 3c) using *in vitro* synthesized GS-menadione. The first product was eluted at 6.7 min with a molecular mass of 479 Da, corresponding to the GS-menadiol. The main second product was eluted at 6.9 min and exhibited a molecular mass of 477 Da consistent with GS-menadione. These results confirmed that the synthesis led primarily to the formation of GS-menadione with small amounts of GS-menadiol. After NaBH_4 reduction of GS-menadione to GS-menadiol, one single majority product (479Da) was eluted as expected at 6.7 min (figure 3d). When 100 μ M of *in vitro* synthesized GS-menadione was incubated with 150 μ M of PcGHR1, the elution profile revealed one single peak eluted at 10.7 min with a molecular mass of 172 Da (figure 3g), corresponding to the commercial menadione (figure 3a). Same results were obtained when NaBH_4 was added to the mix to reduce GS-menadione into GS-menadiol before enzyme addition (figure 3h). Thus it appears clearly that PcGHR1 was able to reduce both GS-menadiol and GS-menadione. In complementary experiments, when 5 μ M of recombinant protein and 1 mM of GS-menadione were mixed in presence of GSH or NaBH_4 for enzymatic regeneration, same elution detection profiles were obtained (results not shown). The same set of experiments has been carried out with EcYqjG and

similar results have been obtained, suggesting that both enzymes are both able to reduce GS-menadione and GS-menadiol.

Enzymes activities were assayed by following the appearance of deglutathionylated menadione. In 30 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 8, GS-menadione (from 2.3 to 692.3 μM) was added and then reduced by NaBH_4 (3 mM) to GS-menadiol in a final volume of 650 μL . In absence of enzyme, NaBH_4 or GSH are not able to cleave the carbon-sulfur link of GS-menadione. The reaction was started by adding enzyme (from 0.01 to 0.05 μM), and then stopped after 20 sec by ethanol (350 μL) and vigorous mixing by vortex. After centrifugation at 14,500 rpm during 15 min, the reaction products were analyzed by HPLC. Analytical separations were performed with a Gemini 5u C18 110A Phenomenex column (3 mm x 150 mm) at 20 °C. The column was eluted (1 mL.min⁻¹) with water containing 30 mM acetic acid, pH 4.16, in a linear gradient from 10 to 50 % acetonitrile, in 5 min, followed by isocratic elution with 100 % acetonitrile. Detection was performed at 250 nm and the quantity of menadione was estimated. The software Graphpad using the Michaelis-Menten equation as model was used to determine catalytic parameters of enzymes. The K_m values for GS-menadiol were respectively 5.1 μM and 21.2 μM for PcGHR1 and EcYqjg respectively (table 1). Without NaBH_4 , GS-menadione was not reduced into GS-menadiol (as described above), thus the apparent kinetic parameters for GS-menadione were determined using 3 mM GSH. Surprisingly the turnovers were comparable than those obtained with GS-menadiol whereas the apparent affinity constants were around 1000 times lower. The catalytic efficiency for EcYqjG against GS-menadiol was similar to that one reported previously by Lam et al (Lam et al. 2012). In accordance with Lam and co-workers, the obtained results confirmed a clear preference of GHRs for GS-hydroquinones.

Using a similar approach than Lam et al (Lam et al. 2012) we confirmed our previous results showing that PcGHR1 is active against GS-menadione and obtained similar results using the bacterial EcYqjG in contrast of the data reported on the yeast GHR ECM4. Nevertheless, at least for the both enzymes tested in this study, it appears clearly that GHRs exhibit a much higher apparent affinity (around 1000 fold) for the reduced form of glutathionylated quinones in comparison to the corresponding oxidized compounds, whereas the turnovers remain similar for both compounds. In the proposed mechanism by Reddy and Gold,(Reddy and Gold 1999) an

initial tautomerization occurs through an interaction between a nucleophilic amino acid and the hydroxyl group of hydroquinone facilitating the nucleophilic attack of the catalytic cysteine. This initial ketonization reaction could explain the difference of affinity observed between the reduced and oxidized quinones and also the similar turnover of GHRs towards both forms. In the proposed mechanism, the catalytic intermediate is indeed an enone (Figure 4). This intermediate has been also proposed in the catalytic mechanism of the tetrachlorohydroquinone reductase of *Sphingobium chlorophenolicum* pcpC (Kiefer and Copley 2002). Additional structural data, in particular the structure of the complex enzyme/substrate, are required to identify the potential amino-acids involved in this tautomerization process and also to validate this hypothesis.

As stated previously, it is clear that glutathione could react spontaneously with benzoquinones via Michael addition leading to the formation of glutathionyl-hydroquinones, these latter being potentially more toxic due to their redox reactivity.(Brunmark and Cadenas 1988) Nevertheless, it appears that some organisms have developed enzymatic processes catalyzing this conjugation step in particular during dehalogenation process. It is particularly true in *Phanerochaete chrysosporium*, where a membrane-bound glutathione transferase has been shown to be involved in this conjugation step (Reddy and Gold 1999). The oxidative degradation of lignin and other wood components led to the production of various more or less halogenated quinines (Hammel et al. 1986), which could be further metabolized by such fungi. It seems clear that GHRs could be important in such processes.

REFERENCES

- Belchik, S. M. and L. Xun (2011). "S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases." Drug Metab Rev **43**(2): 307-316.
- Brunmark, A. and E. Cadenas (1988). "Reductive addition of glutathione to p-benzoquinone, 2-hydroxy-p-benzoquinone, and p-benzoquinone epoxides. Effect of the hydroxy- and glutathionyl substituents on p-benzohydroquinone autoxidation." Chem Biol Interact **68**(3-4): 273-298.
- Garcera, A., L. Barreto, et al. (2006). "Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases." Biochem J **398**(2): 187-196.
- Hammel, K. E., B. Kalyanaraman, et al. (1986). "Substrate free radicals are intermediates in ligninase catalysis." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3708-3712.
- Kiefer, P. M., Jr. and S. D. Copley (2002). "Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase." Biochemistry **41**(4): 1315-1322.
- Lam, L. K., Z. Zhang, et al. (2012). "Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases." Biochemistry **51**(25): 5014-5021.
- Meux, E., P. Prosper, et al. (2011). "Glutathione transferases of Phanerochaete chrysosporium: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class." J Biol Chem **286**(11): 9162-9173.
- Nickerson, W. J., G. Falcone, et al. (1963). "Studies on Quinone-Thioethers. I. Mechanism of Formation and Properties of Thiodione." Biochemistry **2**: 537-543.
- Reddy, G. V. B. and M. H. Gold (1999). "A Two-Component Tetrachlorohydroquinone Reductive Dehalogenase System from the Lignin-Degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Biochemical and Biophysical Research Communications **257**(3): 901-905.
- Xun, L., S. M. Belchik, et al. (2010). "S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases." Biochem J **428**(3): 419-427.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: UV/visible spectra of GS-menadione and enzymatic reduction by PcGHR1. The produced GS-menadione (thiodione) was added to Tris HCl 30 mM buffer pH 8 at a final concentration of 100 μ M. When GSH (1 mM) and PcGHR1 (100 μ g) were added, the absorbance at 430 nm characteristic of GS-menadione peak was lost.

Figure 2: Monitoring the reduction of GS-menadione by (A) EcYqjg and (B) PcGHR1. GS-menadione (300 μ M) was added to Tris buffer and mixed with 3 mM GSH. Then 100 μ g of recombinant enzymes were added after 2 min and absorbance at 430 nm was recorded.

Figure 3: HPLC Analysis of the glutathionyl hydroquinone reductase activity of PcGHR1. (c) In vitro synthesized GS-Menadione incubated with (d) NaBH₄, (e) GSH, and (f) recombinant PCGHR1. As a control, (a) commercial menadione has been incubated with NaBH₄ (b). HPLC analyses were performed on a 20 series Shimadzu Prominence UPLC system equipped with a 150 x 2 mm Luna C18(2) 100A Phenomenex column with a particle size of 3 μ m. The column temperature was of 40 °C with a constant flow rate of 0.4 mL.min⁻¹. Chromatographic separation was performed using a binary gradient consisting of (A) water and (B) methanol, both with 0.1% formic acid (v/v). The elution profile was: 0 min 5% B, 3 min 10% B, 14 min 80% B, 15 min 5% B then 1 min for equilibration. Sample volumes of 2 μ L were injected and UV spectra recorded in the range of 200-800 nm.

Mass spectrometric detection was achieved with a Shimadzu TQD LC-MS8030 working simultaneously in positive and negative ion mode after electrospray ionization. For HPLC-MS analyses, the mass spectrometer was set to the following optimised tune parameters: desolvation line and heat block temperature of respectively 250 °C and 400 °C, nebulizing and drying gas flow of 3 and 15 L.min⁻¹ respectively, capillary voltage of 4 kV. Q3Scan mode was used to record both positive and negative total ion currents in the range of 100 to 800 m/z.

Figure 4: Proposed mechanism for the glutathione conjugate hydroquinone reduction catalyzed by GHRs.

Table 1. Apparent kinetic parameters of recombinant GHRs

	PcGHR1	EcYQJG
<i>GS-menadiol</i>		
K_m (μM)	5.1 ± 1.3	21.2 ± 4.3
k_{cat} (s^{-1})	24.7 ± 1.6	40.8 ± 1.5
k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	4.82 ± 0.31	1.92 ± 0.34
<i>GS-menadione</i>		
K_m (μM)	$2 \times 10^3 \pm 0.62$	$1.2 \times 10^3 \pm 0.3$
k_{cat} (s^{-1})	19.6 ± 2.3	23.8 ± 1.9
k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	$9.8 \times 10^{-3} \pm 0.31$	$19.2 \times 10^{-3} \pm 0.34$

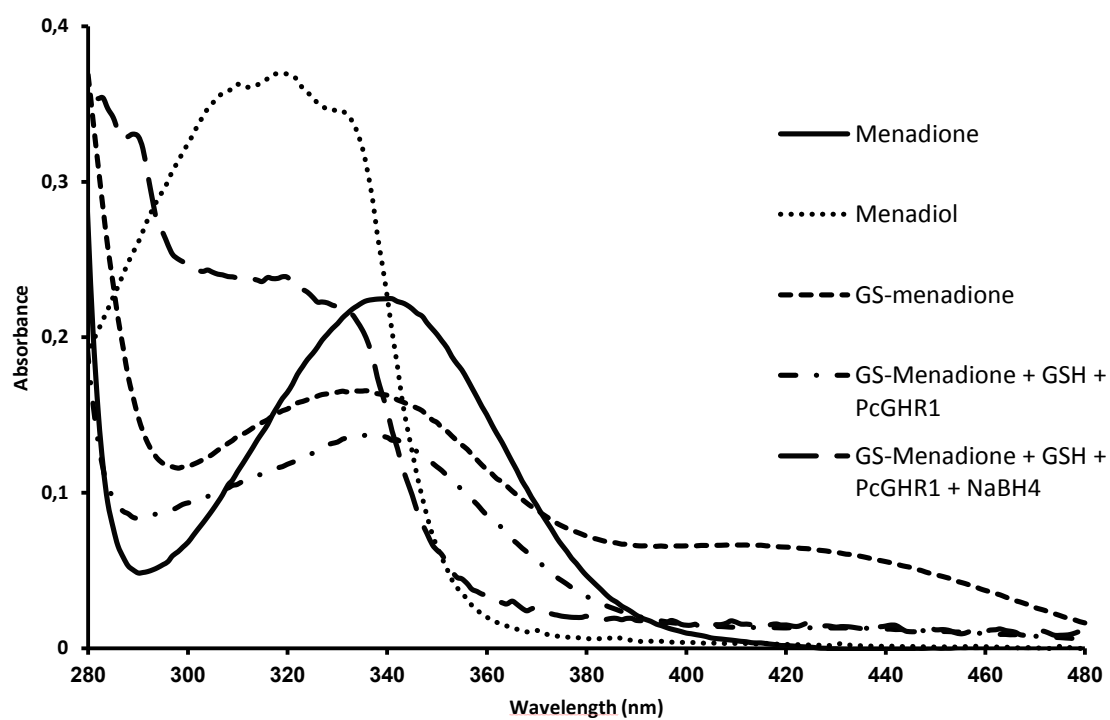
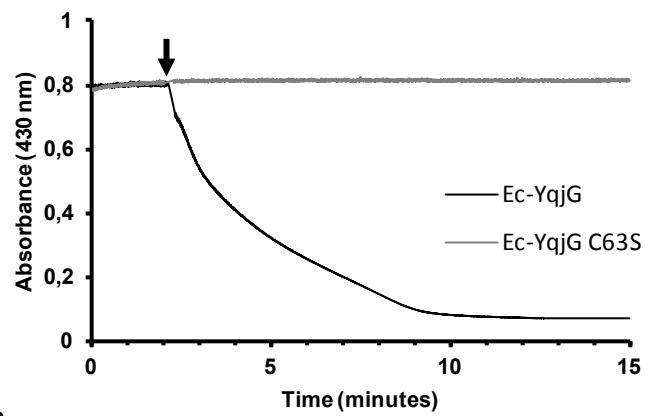


Figure 1

A.



B.

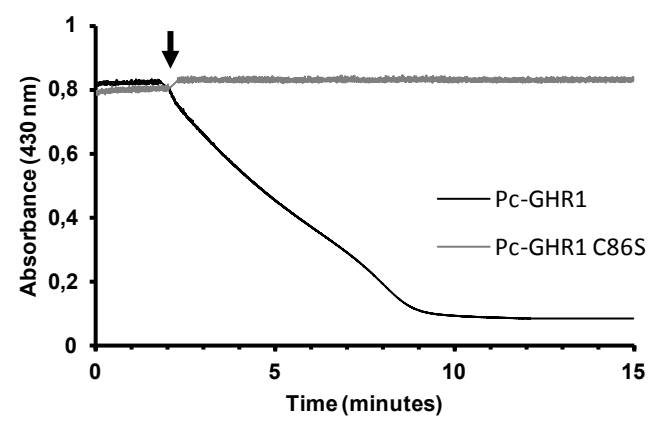


Figure 2

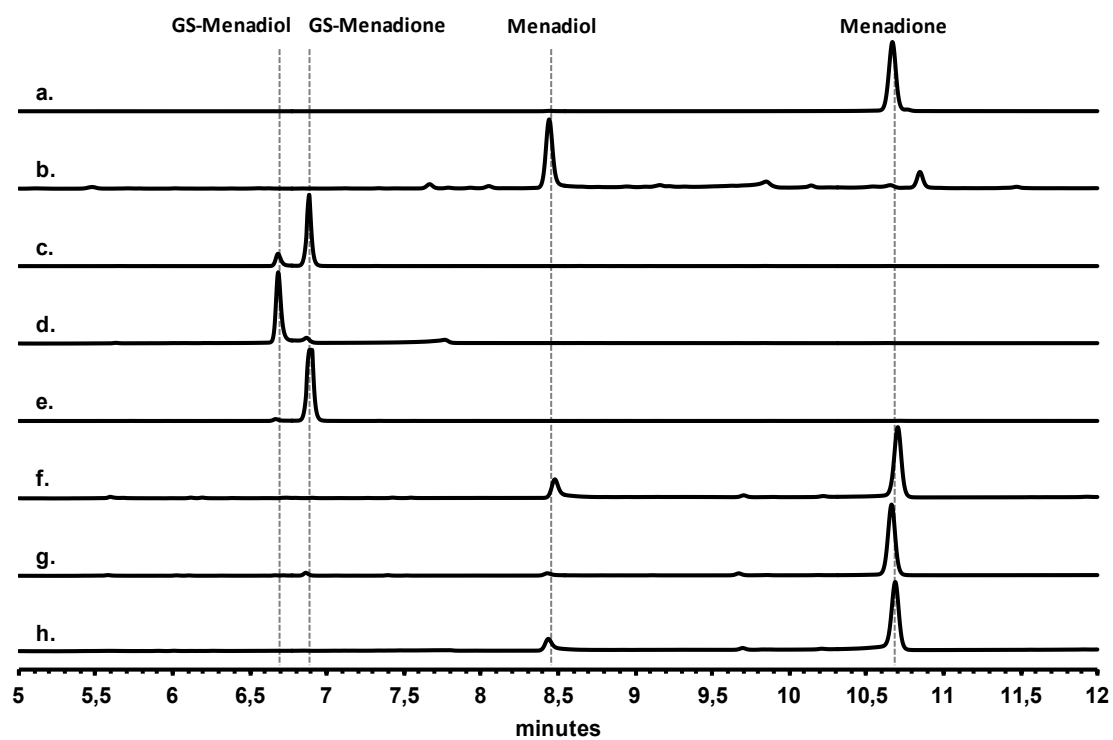


Figure 3

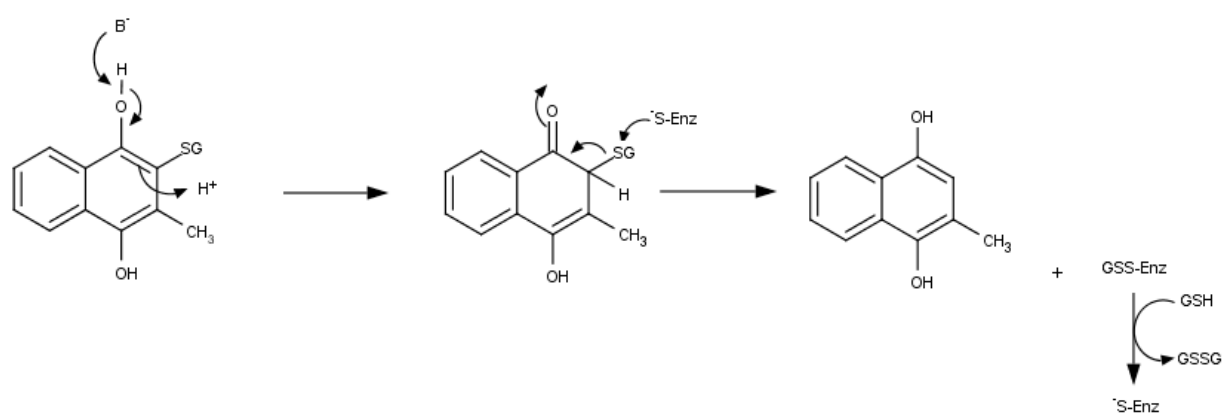


Figure 4

Article 4: *Sphingobium* sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase Omega class

Edgar MEUX, Pascalita PROSPER, Eiji MASAI, Guillermo MULLIERT, Stéphane DUMARÇAY, Mélanie MOREL, Claude DIDIERJEAN, Eric GELHAYE, Frédérique FAVIER

***FEBS letters*, 2012, 586 (22) 3944-50**

Chez la bactérie *Sphingobium* sp. SYK-6, SpLigG représente l'un des trois gènes codant pour des GST au sein d'un opéron impliqué dans le processus de dégradation de la lignine. Des comparaisons de séquences avec l'ensemble des génomes accessibles en ligne révèlent que SpLigG ne présente qu'un nombre très limité d'orthologues. Identifiées uniquement chez quelques protéobactéries, ces enzymes forment un groupe distinct des autres GST à cystéine catalytique identifiées à ce jour. Cependant, l'analyse structurale et fonctionnelle de SpLigG montre que cette enzyme présente en réalité les mêmes caractéristiques générales que les GST Oméga. Néanmoins, les caractéristiques du site H de SpLigG, ainsi que sa capacité spécifique à déglutathionyler de façon stéréosélective l'intermédiaire de dégradation de la lignine en font une Oméga originale et indiquent un certain degré d'hétérogénéité au sein de cette classe de GST. Ces travaux démontrent également la nécessité d'associer aux analyses phylogénétiques, des études physico-chimiques afin de parvenir aux fonctions des gènes étudiés, et soulignent qu'il est parfois trompeur d'assigner une fonction à une enzyme uniquement sur la base de sa similarité de séquence.



Spingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase omega class

Edgar Meux^{a,b,1}, Pascalita Prosper^{c,d,1}, Eiji Masai^e, Guillermo Mulliert^{c,d}, Stéphane Dumarçay^f,
Mélanie Morel^{a,b}, Claude Didierjean^{c,d}, Eric Gelhaye^{a,b,*}, Frédérique Favier^{c,d,*}

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

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

^c Université de Lorraine, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France

^d CNRS, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France

^e Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology, Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

^f Université de Lorraine, LERMAB, EA 1093, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2012

Revised 13 September 2012

Accepted 21 September 2012

Available online 8 October 2012

Edited by Stuart Ferguson

Keywords:

Glutathione transferase

LigG

Lignin

X-ray structure

Omega class

Thiol transferase

ABSTRACT

SpLigG is one of the three glutathione transferases (GSTs) involved in the process of lignin breakdown in the soil bacterium *Spingobium* sp. SYK-6. Sequence comparisons showed that SpLigG and several proteobacteria homologues form an independent cluster within cysteine-containing GSTs. The relationship between SpLigG and other GSTs was investigated. The X-ray structure and biochemical properties of SpLigG indicate that this enzyme belongs to the omega class of glutathione transferases. However, the hydrophilic substrate binding site of SpLigG, together with its known ability to stereoselectively deglutathionylate the physiological substrate α -glutathionyl- β -hydroxy-propiovanillone, argues for broadening the definition of the omega class.

Structured summary of protein interactions:

SpLigG and **SpLigG** bind by X-ray crystallography (View interaction).

© 2012 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glutathione transferases (GSTs) constitute a multigenic family with fundamental roles in cellular detoxification of a wide range of exogenous and endogenous compounds. Most GSTs characterized until now catalyze the conjugation of the tripeptide glutathione (GSH) to compounds containing an electrophilic center, generally increasing the solubility and diminishing the toxicity of the resulting compounds. The highly reactive thiolate anion of GSH is usually stabilized by a serinyl or tyrosinyl residue conserved in the GSH binding site (G-site) of GSTs [1]. In contrast, several classes of GSTs contain at this place a catalytic cysteine conferring

* Corresponding authors. Addresses: Université de Lorraine, Interactions Arbres/Micro-Organismes (IAM), UMR 1136, IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences et Technologies, Bld des Aiguillettes, BP 70239, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France. Fax: +33 3 68 42 28 (E. Gelhaye), Université de Lorraine, Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2), Equipe Biocristallographie, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, Bld des Aiguillettes, BP2239, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France. Fax: +33 3 68 43 00 (F. Favier).

E-mail addresses: eric.gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr (E. Gelhaye), frederique.favier@crm2.uhp-nancy.fr (F. Favier).

¹ Both authors contributed equally to this work.

them thiol transferase activity [1]. Whereas a number of cysteine-containing GST classes span several kingdoms and phyla (for example omega (O) in mammals, fungi and insects [2]; S-glutathionyl hydroquinone reductase (GHR) in fungi and prokaryotes), others are limited to a specific kingdom or phylum (lambda (L) and DHAR in plants; beta (B) and LigG in bacteria). Although the principle in vivo activities of cysteine-containing GSTs remain unclear, recent advances indicate that they are able to bind a large range of small molecules and could thus be involved in various metabolic pathways. Supporting this view, human omega class GSTs could participate in arsenic biotransformation [3], while bacterial and fungal GHRs could be involved in the catabolism of chlorinated quinones such as pentachlorophenol, a fungicide used for wood preservation [4]. In addition *Arabidopsis thaliana* lambda GSTs were recently shown to bind oxidized anthocyanidins and tocopherols, suggesting putative roles in response to oxidative stress [5].

In *Spingobium* sp. strain SYK-6 (an aerobic Gram-negative soil bacillus), *ligE*, *ligF* and *ligG* are the three GST encoding genes found in an operon involved in the process of lignin breakdown. SpLigE and SpLigF catalyze the transfer of GSH to an aryl ether substrate resulting in a β -thioether intermediate and SpLigG catalyzes elimination of GSH from the conjugate product [6,7]. Sequence

comparison shows that SpLigG possesses several proteobacteria homologues with which it forms an independent cluster among cysteine-containing GSTs (Fig. 1).

In this study we present the three-dimensional structure of SpLigG, and the comparison of its biochemical properties with omega and xi (GHR) GSTs from *Phanerochaete chrysosporium* characterized recently by our group [8]. The results show a clear relationship between SpLigG and omega GSTs.

2. Materials and methods

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

The cloning of the *Sphingobium* sp. SYK-6 LigG and LigF into pET-21 (+) has been described previously [9]. The LigG_C15S mutant of the active site cysteine has been obtained by PCR-based site-directed mutagenesis using two complementary mutagenic primers (5'TCACATTCCTCCGCGACCCCTTCTCCGAGCG3' and 5'CGCT

CGGAGAAGGGGCTGCCGGAATGTGA3'). *Escherichia coli* BL21(DE3) culture conditions and protein purification procedures were similar to the ones previously described [8]. For the production of the selenomethionine tagged SpLigG, recombinant plasmid carrying the gene of interest was electroporated into methionine auxotrophic strain of *E. coli* BL21 (DE3) and further production and purification steps were performed as described by Koh et al. [10]. After purification to homogeneity, electrospray mass analysis of SpLigG (30830 Da) showed that the N-terminal methionine residue had been cleaved, that a GSH adduct was present and that all eight methioninyl residues had been substituted.

2.2. Structure determination of SpLigG

The selenomethionylated form of SpLigG (19 mg/ml in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer) was mixed (ratio 1:1) with DMSO containing 10 mM of glutathionylated-menadione. Droplets for the batch method under oil were prepared by mixing 1.5 µl of this solution with 1.5 µl of a solution containing 0.2 M ammonium

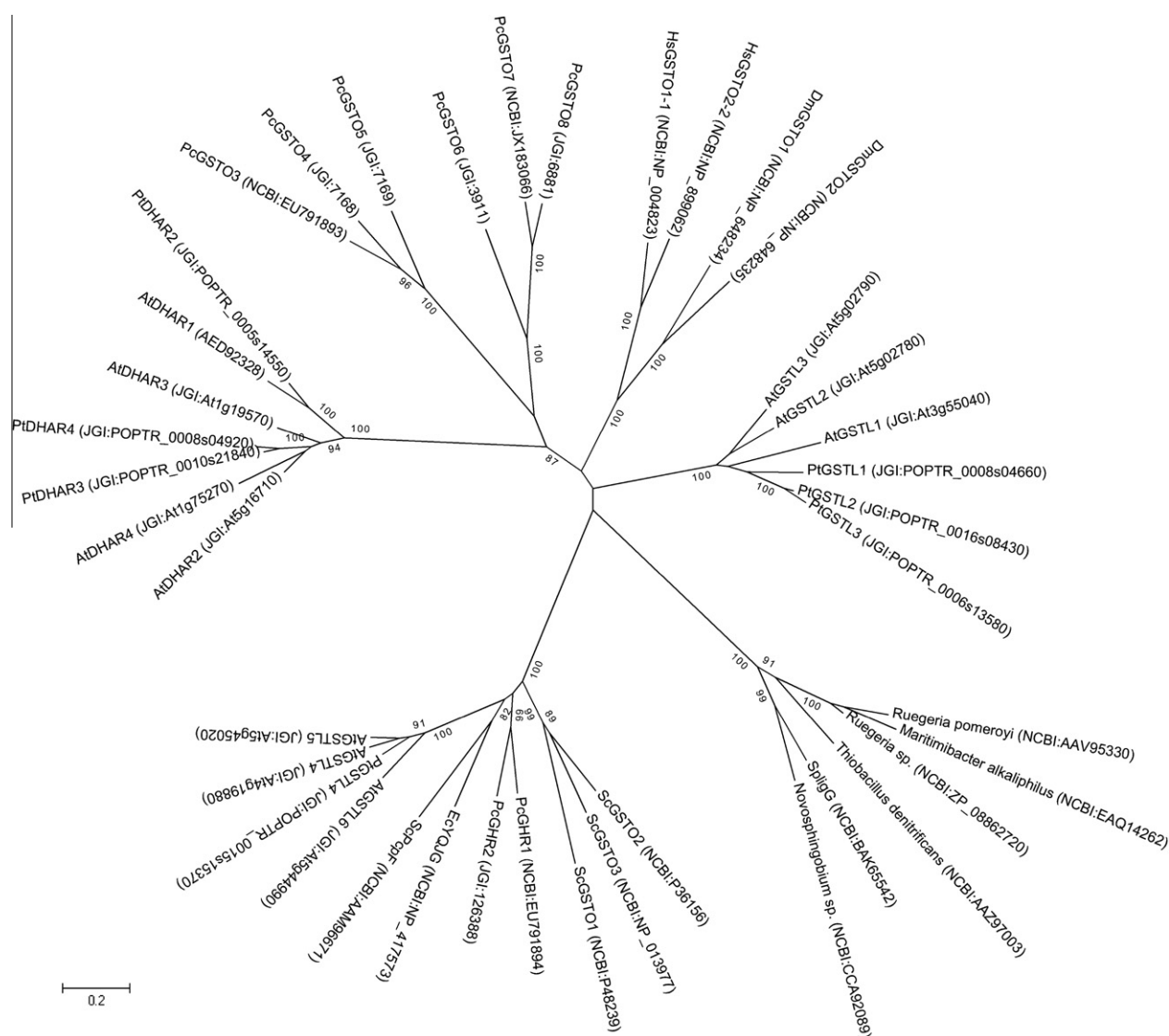


Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree of cysteine-containing glutathione transferases from different phyla (At = *Arabidopsis thaliana*; Pt = *Populus trichocarpa*; Pc = *Phanerochaete chrysosporium*; Hs = *Homo sapiens*; Dm = *Drosophila melanogaster*; Sc = *Sphingobium chlorophenolicum*; Ec = *Escherichia coli*; Sp = *Sphingobium* sp. strain SYK-6). SpLigG homologues (bottom right) share less than 20% of sequence identity with the other represented GSTs. Sequence alignments were done by ClustalW. The tree was constructed with the neighbour-joining method in MEGA 5.0 software. The robustness of the branches was assessed by the bootstrap method with 1000 replications. Bootstrap values are placed at the nodes where the value is >70.

sulfate, 0.1 M sodium acetate pH 4.6, 25% polyethylene glycol 4,000 (corresponding to reagent #20 of the Crystal Screen 1 by Hampton Research) The samples stored at 277 K gave crystals suitable for X-ray measurement within 4–7 days. They were flash-frozen at 100 K using glycerol (10%) as the cryoprotectant.

The diffraction data (Table 1) were collected at the FIP-BM30A synchrotron beamline (ESRF, Grenoble) at two wavelengths corresponding to the peak and inflection of the Se K-edge, and at a remote one. The three data sets were processed with XDS [11] and SCALA [12]. Se atom search (eight atoms) and phasing by multiple anomalous diffraction (MAD) were performed at 2.2 Å resolution with SHELXC/D/E [13], leading to a correlation coefficient of 57.7% at the end of SHELXD. Further processing with SHELXE revealed a pseudo-free CC of 83.9% allowing for identification of the correct hand (48.0% for the reverse one). A preliminary model was built with BUCANEER (251 residues) [14]. It was completed/corrected manually with COOT [15] and refined with PHENIX [16]. Complete statistics are reported in Table 1.

2.3. Enzyme assays

Guaiacylglycerol- β -O-4-methylumbelliferone (GOU) has been prepared as described previously [17] and used as a β -aryl ether substrate. SpLigF (5 μ M) was mixed with 2 mM GSH, 50 μ M GOU in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and stirred for 20 min at room temperature. Thus, all GOU molecules were expected to be transformed in 4-methylumbelliferone and α -glutathionyl- β -hydroxypropiovanillone (GS-HPV) [18]. Then cysteine-containing GSTs (1 μ M) have been added to the mix with NADPH (200 μ M) and 0.5 IU glutathione reductase. The deglutathionylation activity was followed by monitoring the decrease in absorbance arising from NADPH oxidation in this coupled enzyme assay system which reflects the formation of glutathione disulfide (GSSG).

All experiments were performed with enzymes as purified, or after reduction with a 10-fold excess of dithiothreitol (DTT) at 25 °C during 30 min. In the latter case, the mixture was passed through a Sephadex G-25 gel-filtration column (GE Healthcare)

to eliminate the DTT excess. Thiol transferase and glutathione transferase activities against various substrates have been tested according to Meux et al. [8].

Cysteine pK_a values were determined by measuring the reactivity of the enzymes toward 5-nitrofluoresceine at various pH ranging from 3 to 10.

2.4. Substrate docking

In order to dock GS-HPV onto SpLigG, (R)- or (S)-GS-HPV molecules, together with the refined coordinates of SpLigG (with the non-bonded molecules deleted) were submitted to the SwissDock server [19] using the default parameters. The possible GS-HPV positions returned by the software were filtered using two different criteria. First, the positions of the glutamyl residues of GS-HPV in the modeled complex were compared to that of GSH in the SpLigG crystal structure. Solutions in which the rmsd was larger than 1.6 Å were eliminated. Second, a maximal distance between the sulfur atoms of GS-HPV and Cys15 was set to 2.5 Å, in order to retain positions proximal enough for attack by Cys15. These filters resulted in only one solution for (R)-GS-HPV, and no solution for (S)-GS-HPV.

3. Results and discussion

3.1. X-ray structure of SpLigG

The three-dimensional structure of SpLigG was solved at a resolution of 1.2 Å, using the MAD method on tetragonal crystals of the selenomethionylated enzyme (see Section 2 and Table 1).

SpLigG possesses the characteristics of the canonical GST fold [20] (Fig. 2): it is a homo-dimer (generated by a crystallographic twofold axis) where the N-terminal thioredoxin-like domain of the monomer contained in the asymmetric unit interacts with the α -helical C-terminal domain of the related monomer in a neighboring asymmetric unit. PDBeFold [21], DALI [22] and VAST [23] were used to search the PDB for similar structures. The

Table 1
Data collection and refinement statistics.

SpLigG crystal parameters			
Space group		P4 ₁ 2 ₁ 2	
a, b, c (Å)		56.801, 56.801, 183.730	
Protein molecule in a.u.		1	
Matthews coefficient (Å ³ /Da)		2.55	
Data collection statistics	Peak	Inflection	Remote
Wavelength (Å)	0.98007	0.98020	0.97856
Resolution (Å)	48.26–1.75 (1.85–1.75) ^a	48.27–1.73 (1.83–1.73)	48.31–1.20 (1.27–1.20)
Unique reflections	23598 (1108)	23661 (863)	93486 (13146)
Completeness ^b (%)	75.0/73.7 (25.2/21.3)	72.9/71.5 (19.1/15.0)	98.7/98.6 (96.7/96.0)
R-Merge ^c (%)	3.8 (7.8)	3.6 (8.0)	5.8 (4.8)
I/ σ I	44.6 (11.0)	47.6 (10.4)	16.8 (4.0)
Redundancy ^b	11.3/6.1 (3.5/2.0)	11.3/6.1 (3.2/1.8)	6.8/3.6 (6.7/3.4)
Refinement statistics			
# Residues/water molecules/ligands	263/376/1 GSH, 1 ACT, 1 SO ₄ ^d		
R-All/R-work/R-free ^e (%)	14.04/13.96/15.47		
RMSD bond length (Å)/angles (°)	0.011/1.443		
Mean B factor (Å ²)	14.9 (protein)/25.1 (H ₂ O)		
Ramachandran plot regions (%)	97.81 (most favored)/2.19 (additional allowed)/0.0 (disallowed)		
PDB ID	4G10		

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^b In the first value of the completeness (resp. redundancy), the anomalous signal is ignored (lmean), in the second value it has been taken into account (unmerged l+ and l-).

^c R-Merge = $\sum_{hkl} \sum_j |<I_{hkl}> - I_{hkl,j}| / \sum_{hkl} <I_{hkl}>$, where $I_{hkl,j}$ is the intensity of the j^{th} measurement of a reflection hkl and $<I_{hkl}>$ is the average intensity of that reflection on its total number of measurements.

^d GSH: glutathione, ACT: acetate ion, SO₄: sulfate ion.

^e R_{all} is determined for all reflections (working set + test set), R_{work} corresponds to a subset of 95% of reflections (working set), R_{free} is for the complementary 5% (test set).

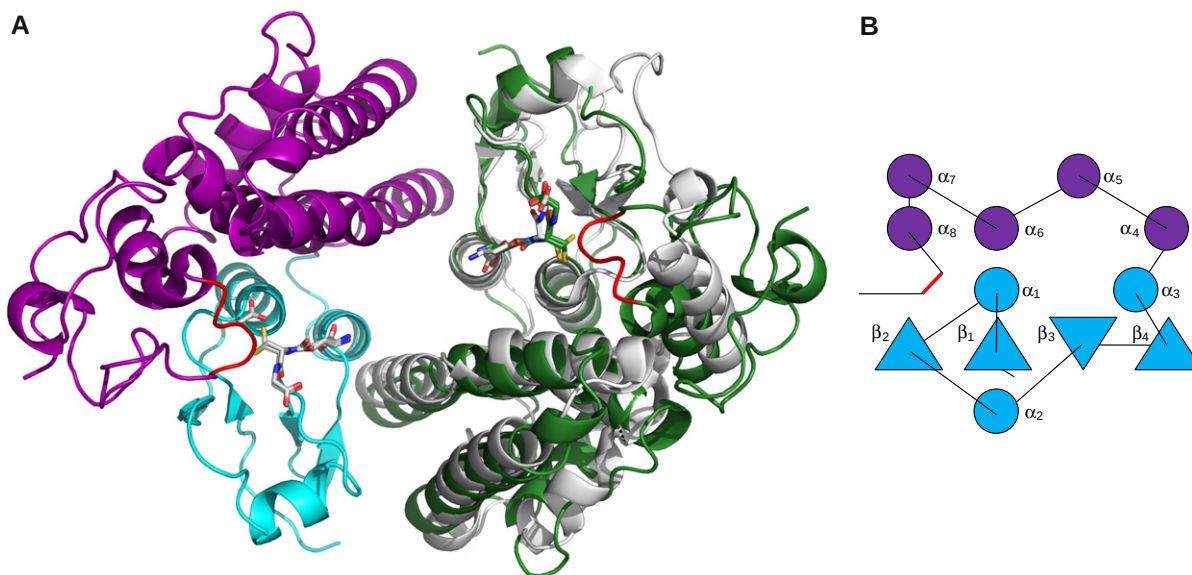


Fig. 2. Schematic drawings of the SpLigG structure. (A) The dimer in ribbon mode. The corresponding amino acid sequences are shown in Fig. S1. In the left monomer, the thioredoxin-like domain is colored in cyan, the α -helix domain is in purple, the gray sticks correspond to GSH (with two alternative conformations) and to the acetate ion. The symmetry-related SpLigG monomer (green) is shown superimposed to the human GSTO2 (in gray, PDB ID: 3Q19), and their corresponding GSH are colored accordingly. The loop specific to SpLigG homologues is in red; (B) topology diagram with the secondary structures numbered.

ranking changed significantly depending on the program used, but regardless the program, hGSTO1-1 (PDB IDs: 3LFL, 1EEM) and hGSTO2-2 (3Q18, 3Q19, 3QAG) followed by GSTO3 from *Bombyx mori* (3RBT) clearly appear as the closest structural neighbors while xi GSTs (3PPU, 3M1G), as well as beta GSTs (1A0F, 1F2E, 1N2A, 1PMT, 2DSA, 2GDR, 2NTO, 2PMT, 2PVQ, 2X64) were found far from the top of the list. The distant ranking of xi GSTs is consistent with the distinctive features characterizing this class of structures, notably where significant loop elongations lead to an atypical dimer [8]. In the same way, beta class GSTs lack both the α -helix $\alpha 8$ (Fig. 2) conserved in SpLigG and omega GSTs, and the long C-terminal loop specific to SpLigG.

Interestingly, the invariant aspartyl residue, that belongs to a N-capping box motif present at the beginning of $\alpha 6$ in the second domain of GSTs [24] is replaced by a glutamate residue (in this case Glu161) which is strictly conserved in close SpLigG homologues. Among the roughly one hundred independent structures available in the Protein Data Bank, only the uncharacterized GST-like proteins from *Pseudomonas fluorescens* (PDB IDs: 3LXT, 3M0F) and *E. coli* (3R2Q) present a natural mutation of Asp in the motif (Gly and Thr, respectively). Despite this difference in its N-capping box motif, SpLigG did not reveal any problems in overexpression or stability, although a critical role in rapid enzyme folding and stability was attributed to the usual aspartyl residue in studies concerning the human pi and alpha class GSTs [25–27].

Despite the high structural similarity between SpLigG and hGSTO1-1 [28,29] or hGSTO2-2 [30], major differences can be observed. In SpLigG, $\alpha 8$ shows a strong bend ($\sim 60^\circ$), due to the insertion of the Ser234 side chain which breaks the hydrogen bond network between the second and third turns of the helix. Furthermore, $\alpha 8$ is followed by a long extension of 44 amino acids the beginning of which forms a very specific cap on one side of the GSH binding site. Its residues $^{220}\text{GGGNG}^{224}$ display a loop which directs the Asn223 side chain towards GSH: a hydrogen bond is formed between its atom OD1 and a water molecule, itself hydrogen bonded to the nitrogen atom of the glycyl moiety of GSH. Sequence comparison shows the high conservation of the C-terminal end in SpLigG homologues (Fig. S1).

3.2. Active site of SpLigG

The anchoring motif of GSH in the G-site of SpLigG is conserved in many GSTs, with the exception of the supplemental hydrogen bond provided by the water molecule stabilized by the Asn223 side chain (see Section 3.1). The side chain of the GSH cysteinyl residue is observed in two distinct positions (Fig. 3), one with its sulfur atom at 3 Å of the catalytic Cys15, the second at 2.4 Å with the highest occupancy (0.63). The latter corresponds possibly to a disulfide bridge disrupted upon X-ray exposure. The presence of a 2/3:1/3 mix of two forms with and without the disulfide bridge is corroborated by the mass spectrometry measurements on the native enzyme (data not shown).

GSH positions itself at the surface of the huge basin observed at the interface between the two SpLigG monomers. This positioning orients the GSH sulfur atom towards a cavity defined by the N-terminal residues of helix $\alpha 1$ (with the sequence $^{14}\text{GCPF}_{17}$, among which is the catalytic Cys15), Ile39 at the C-terminal end of strand $\beta 2$, Tyr113 from helix $\alpha 4$, Tyr214 and Tyr217 from $\alpha 8$, and finally Asn223 and Phe235 from the C-terminal loop. This constitutes an area less hydrophobic than in many GSTs (in particular in GSTOs), and forms an environment that favors hydrogen bonding and ion binding, as attested by the presence of an acetate anion observed in the vicinity. One oxygen atom forms two hydrogen bonds with the hydroxyl groups of Tyr113 and Tyr214, and the second with the water molecule that bridges the nitrogen atoms of the GSH glycyl residue and of the Asn223 side chain (see first Section 3). Conversely, the methyl group of the acetate molecule faces the side chains of Ile39 and Phe235. All of the described residues are strictly conserved in the sequences homologous to SpLigG (Fig. S1). They could constitute one part of the H-site, so called because it corresponds to a usually hydrophobic region of GSTs where the electrophilic substrate or the non-GSH moiety of a glutathionylated substrate can bind.

3.3. Biochemical assays using GST substrates

SpLigG exhibits thiol transferase activity towards hydroxyethyl-disulfide (HED) and dehydroascorbate (DHA), with kinetic param-

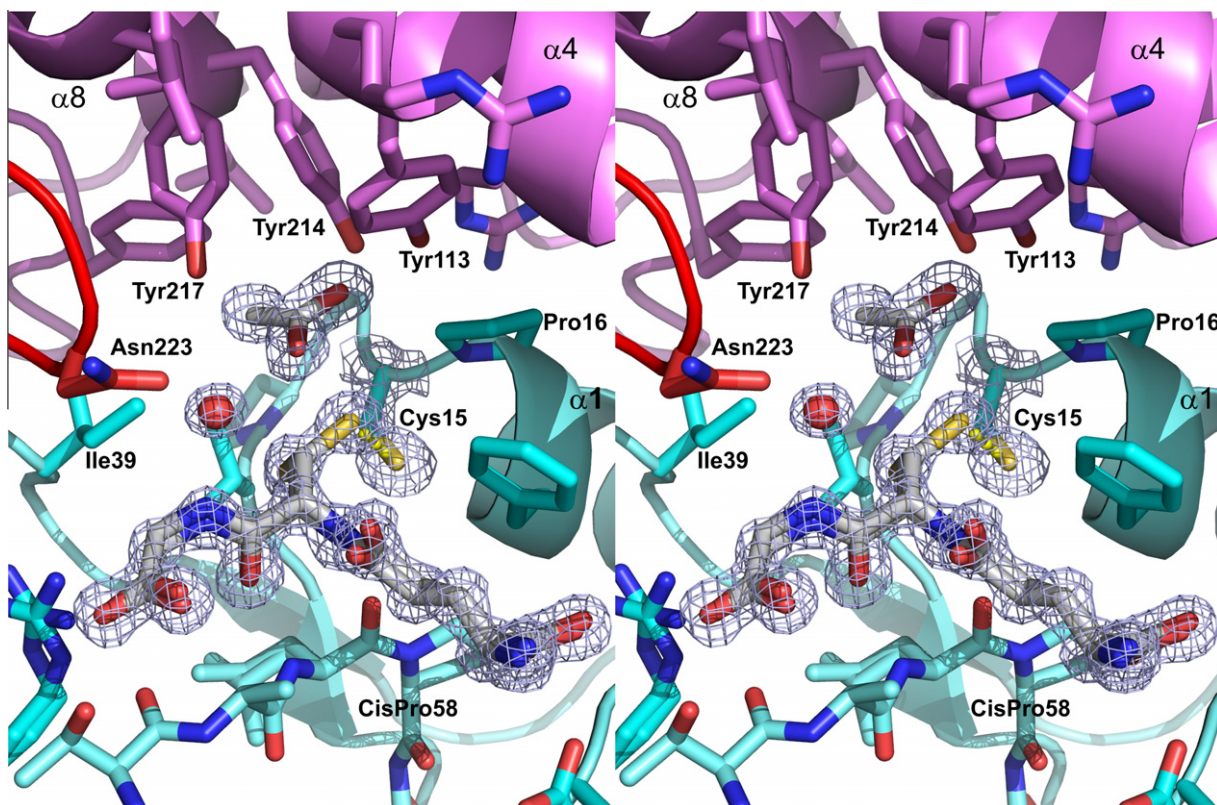


Fig. 3. Stereo view of the active site of SpLigG. The GSH and acetate molecules are shown as gray sticks; the red sphere corresponds to a water molecule; the main residues that form the active site together with the ribbon which figures the SpLigG polypeptide main chain are displayed with the same color code as in Fig. 2. For clarity, only some selected residues are labeled. The 2Fo-Fc electron density map is shown in light blue (contour level 1.2 σ) at the ligand and Cys15 positions. The disulfide bond between Cys15 and GSH probably disrupted upon X-ray exposure is figured as a yellow dashed line.

eters comparable to those obtained with omega 3 GST from *P. chrysosporium* (PcGSTO3) and ten times higher than those obtained with fungal GHR 1 (PcGHR1) towards HED (Table 2). However, as expected, the mutation of Cys15 to serine abolishes thioltransferase activity. It indicates that the active site cysteine is necessary for both DHA and HED reduction as observed for other cysteine-containing GSTs.

Additionally, we used S-(phenylacetophenone)-glutathione (PAP-SG), S-(tetralone)-glutathione and S-(menadione)-glutathione to investigate the ability of SpLigG to catalyze deglutathionylation of small aromatic molecules. SpLigG as well as PcGSTO3

[8] are active against PAP-SG from which they remove GSH. The reaction between DTT-treated SpLigG (allowing removal of GSH found in the untreated protein) and PAP-SG in the absence of GSH led to the formation of phenylacetophenone detected by HPLC and of glutathionylated SpLigG as shown by Q-TOF analysis of the reaction products (data not shown). In these conditions the reaction occurs only once and does not proceed any further. The deglutathionylated product is neither detected using the native purified protein (i.e. with a GSH adduct) nor with the C15S mutant. These results are in accordance with the involvement of Cys15 in the deglutathionylation reaction leading to the formation of a disulfide bridge with the GSH molecule removed from PAP-SG. When GSH is added to the mix, glutathione disulfide is detected by mass spectrometry (data not shown), in accordance with a role of GSH in the enzyme regeneration. SpLigG as well as PcGSTO3 are inactive towards S-(menadione)-glutathione which is a specific substrate of GHRs [4,8] (Table 2). On the other hand, SpLigG is also inactive against tetralone conjugates in contrast to PcGSTO3. Furthermore, subsequent studies showed that SpLigG is largely inactive as a glutathione transferase against 1-chloro-2,4-dinitrobenzene or hydroperoxides. The mutation of the catalytic cysteine to a serine does not confer a transferase activity as previously described for GSTOs [8]. Thus from a biochemical point of view, it appears clearly that SpLigG does not possess GHR activity and that it is functionally related to the omega class although it is not able to use all described GSTO substrates.

3.4. β -Thioether lignin intermediate as a natural substrate of SpLigG

SpLigG is able to catalyze the second step of the β -aryl ether bond cleavage initiated by SpLigF and SpLigE [6]. The standard sub-

Table 2

Activity of the recombinant fungal PcGHR1, PcGSTO3 and the bacterial SpLigG with various "classical" substrates.

	PcGHR1	SpLigG	PcGSTO3
S-(Menadione)-glutathione	1 185	–	–
DHA	108.6	356.8	58.2
HED	160.2	1 350	943
PAP-SG	–	1 025	1 141
Tetralone-SG	–	–	449.2
Cumene hydroperoxide	–	–	–
Hydrogene peroxide	–	–	–
<i>t</i> -Butyl hydroperoxide	–	–	–
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	–	–	–
Isothiocyanate	–	–	–
	PcGHR1 C117S	SpLig C15S	PcGSTO3 C37S
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	–	–	1 105
Isothiocyanate	–	–	10.4

Specific activity is shown in $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol}$. Data were compiled from Meux et al. [8]. Symbol (–) means not detectable.

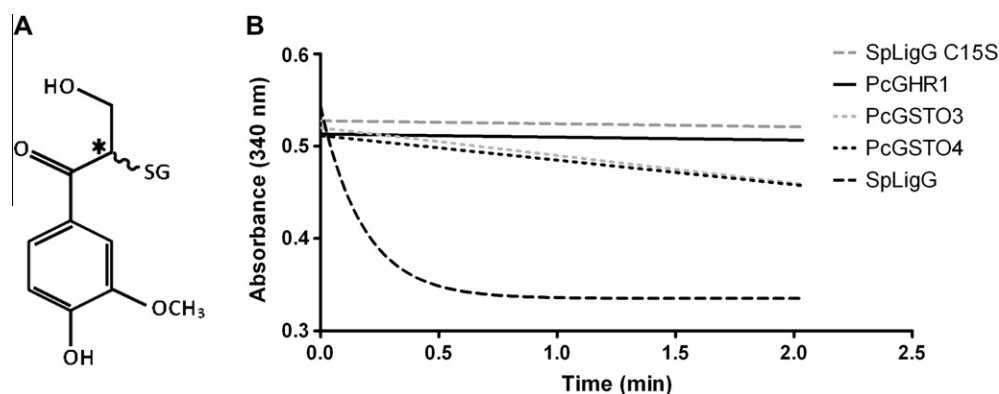


Fig. 4. Degradation of the β -thioether intermediate (GS-HPV) by recombinant PcGHR1, PcGSTO3, PcGSTO4, SpLigG and the C15S mutant in the presence of GSH. In (A), SG represent the glutathione linked to the asymmetric carbon (*) by its sulfur atom. In (B), the activity was followed by monitoring the decrease in absorbance arising from NADPH oxidation (B).

strate GOU was first incubated with the purified β -etherase SpLigF and reduced GSH in order to generate a β -thioether intermediate (GS-HPV) and then different cysteine-containing GSTs were added to the mix. The addition of SpLigG (0.25 μ M) led to a decrease in the OD at 340 nm which reflects the production and the subsequent reduction of GSSG by the coupled system NADPH/glutathione reductase (Fig. 4). As expected, the mutant SpLigG C15S was inactive. PcGHR1 (2 μ M) was also inactive, whereas a weak activity was detected using PcGSTO3 or PcGSTO4. In complementary experiments, comparable cysteine pK_a values around 6.3 were obtained for the different enzymes. As a consequence, the better turnover of SpLigG towards its natural substrate likely results from specific structural features of the active site.

In order to confirm this hypothesis, docking of GS-HPV to the SpLigG model was attempted. Two distinct ligands were tested in SwissDock [19], corresponding to the *R* and *S* configurations of the HPV carbon atom linked to GSH (Fig. 4). In both cases, multiple positions for the ligand in the region of the active site were obtained. Among them, a unique one fulfills the requirements for a roughly conserved position of the GSH part of the ligand and for a distance of less than 2.5 Å between the sulfur atoms of GS-HPV and Cys15. Only the *R* form of GS-HPV provides a position compatible with the reaction catalyzed at the SpLigG active site. These results are in agreement with the stereoselectivity of SpLigG previously observed by Masai et al. [6,7]. This suggests that the formation of GS-HPV catalyzed by SpLigF was accompanied by an inversion of the configuration of the asymmetric carbon of the SpLigF substrate during the nucleophilic substitution [6,7]. In the modeled complex between SpLigG and GS-HPV (Fig. S2), the HPV part of the substrate would take advantage of the hydrophilic region formed by Tyr 113, 214 and 217 and Asn223 to stabilize its carbonyl and hydroxymethyl groups linked to the asymmetric center (Fig. 4). The HPV aromatic ring, located at the dimer interface, could interact with Tyr113 through a π - π stacking.

4. Conclusion

SpLigG belongs to a subfamily of GSTs that possess a catalytic cysteine residue, as confirmed by its loss of activity after Cys15 mutation. Accordingly, it displays activity with the classical glutaredoxin substrates DHA and HED. Sequence analysis links SpLigG to a few proteins that form a group separated from other known GST classes. Our structural and biochemical studies demonstrate that SpLigG clearly does not belong to the xi or beta class GSTs. On the other hand, the overall three-dimensional structure of SpLigG together with its activity with phenyl-acetophenone links

it to the omega class GSTs. However, structural and sequence particularities, as well as biochemical properties specific to SpLigG, redefine the boundaries of the omega class of GSTs. Indeed, SpLigG possesses a small cavity that can provide hydrogen bonds near Cys15 and an original loop that contains the conserved motif Gly-Ala/Gly-Gly-Asn-Gly in which Asn223 belongs to the active site. Furthermore, it stereoselectively deglutathionylates α -glutathionyl- β -hydroxypropiovanillone proposed to be its main physiological substrate, and does not gain GSH transferase activity upon mutation of its catalytic cysteine to a serine residue. These properties make SpLigG a marginal omega class GST and highlight the unexpected extent of this class. On a more general note, this study demonstrates the challenge provided by GSTs regarding the prediction of their classification solely from sequence, and emphasizes the advantage of coupling structural and biochemical analyses.

4.1. PDB accession number

Atomic coordinates and structure factors of SpLigG have been deposited in the Protein Data Bank under accession number 4G10.

Acknowledgements

We thank the staff and particularly David Cobessi at ESRF beamline FIP-BM30A for assistance with synchrotron data collection. We are grateful to Lynn Pauron, Jean-Pierre Jacquot and the reviewers for their kind help in improving the manuscript. Financial support for this project was provided by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0012).

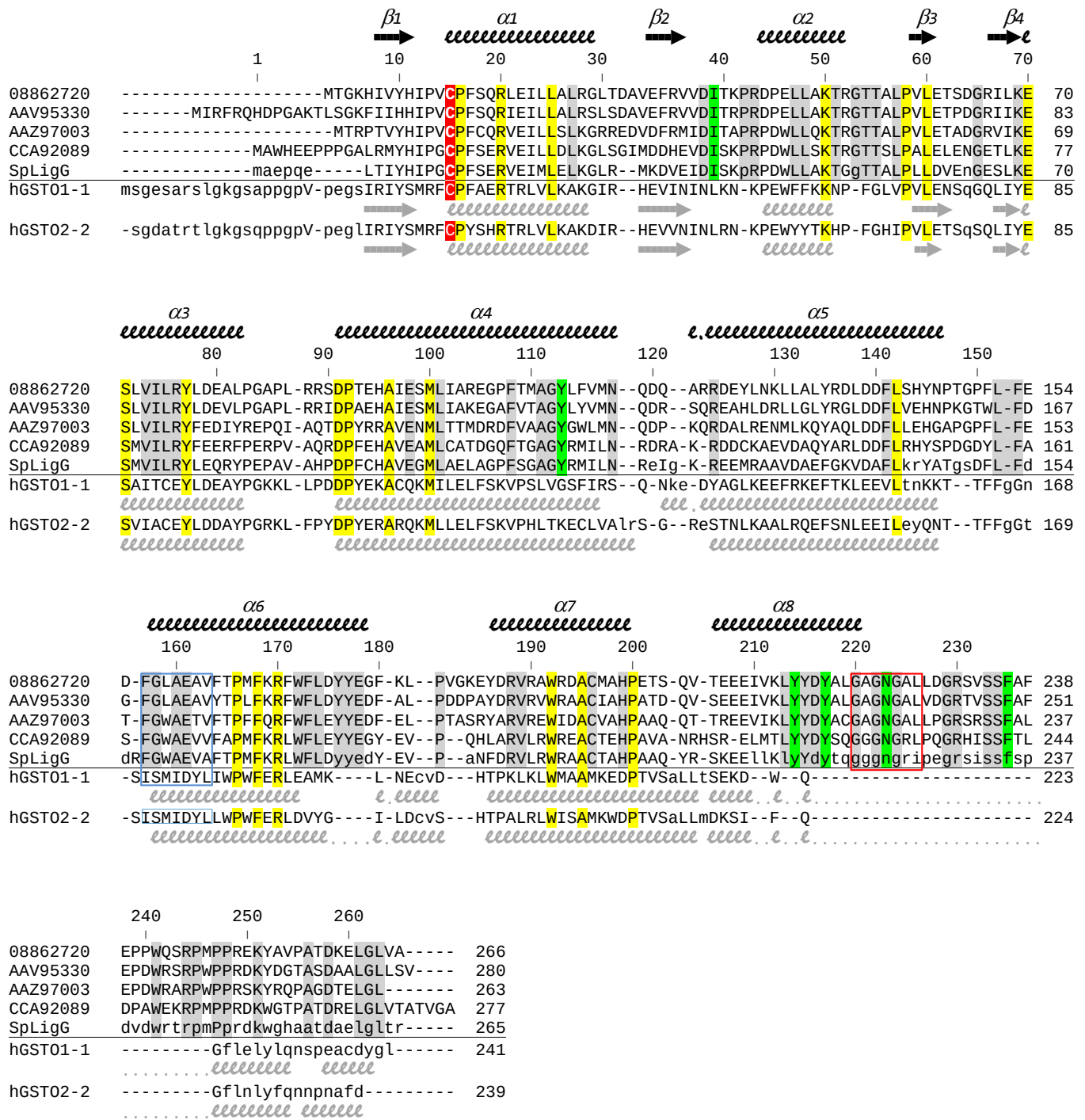
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.036>.

References

- Oakley, A. (2011) Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 43, 138–151.
- Board, P.G. (2011) The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. *Drug Metab. Rev.* 43, 226–235.
- Zakharyan, R.A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S.M., Tsapralis, G., Board, P.G., Liebler, D.C. and Aposhian, H.V. (2001) Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1051–1057.
- Xun, L.Y., Belchik, S.M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H.N., Sanchez, E., Kang, C. and Board, P.G. (2010) S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. *Biochem. J.* 428, 419–427.

- [5] Dixon, D.P. and Edwards, R. (2010) Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J. Biol. Chem.* 285, 36322–36329.
- [6] Masai, E., Ichimura, A., Sato, Y., Miyauchi, K., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2003) Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. *J. Bacteriol.* 185, 1768–1775.
- [7] Sato, Y. et al. (2009) Identification of three alcohol dehydrogenase genes involved in the stereospecific catabolism of arylglycerol-beta-aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5195–5201.
- [8] Meux, E. et al. (2011) Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class. *J. Biol. Chem.* 286, 9162–9173.
- [9] Peng, X., Masai, E., Kitayama, H., Harada, K., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2002) Characterization of the 5-carboxyvanillate decarboxylase gene and its role in lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4407–4415.
- [10] Koh, C.S. et al. (2007) Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *J. Mol. Biol.* 370, 512–529.
- [11] Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- [12] Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 62, 72–82.
- [13] Sheldrick, G.M. (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr., Sect. A* 64, 112–122.
- [14] Cowtan, K. (2006) The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 62, 1002–1011.
- [15] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66, 486–501.
- [16] Adams, P.D. et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66, 213–221.
- [17] Masai, E., Katayama, Y., Nishikawa, S., Yamasaki, M., Morohoshi, N. and Haraguchi, T. (1989) Detection and localization of a new enzyme catalyzing the β -aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Lett.* 249, 348–352.
- [18] Otsuka, Y., Sonoki, T., Ikeda, S., Kajita, S., Nakamura, M. and Katayama, Y. (2003) Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyzes the specific and hydrolytic cleavage of lignin guaiacylglycerol β -aryl ether linkages. *Eur. J. Biochem.* 270, 2353–2362.
- [19] Grosdidier, A., Zoete, V. and Michielin, O. (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 39, W270–W277.
- [20] Armstrong, R.N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10, 2–18.
- [21] Krissinel, E. and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60, 2256–2268.
- [22] Holm, L. and Sander, C. (1993) Protein-structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* 233, 123–138.
- [23] Gibrat, J.F., Madej, T. and Bryant, S.H. (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 377–385.
- [24] Aceto, A., Dragani, B., Melino, S., Allocati, N., Masulli, M., Dillio, C. and Petruzzelli, R. (1997) Identification of an N-capping box that affects the alpha 6-helix propensity in glutathione S-transferase superfamily proteins: a role for an invariant aspartic residue. *Biochem. J.* 322, 229–234.
- [25] Cocco, R., Stenberg, G., Dragani, B., Principe, D.R., Paludi, D., Mannervik, B. and Aceto, A. (2001) The folding and stability of human alpha class glutathione transferase A1–1 depend on distinct roles of a conserved N-capping box and hydrophobic staple motif. *J. Biol. Chem.* 276, 32177–32183.
- [26] Dragani, B., Stenberg, G., Melino, S., Petruzzelli, R., Mannervik, B. and Aceto, A. (1997) The conserved N-capping box in the hydrophobic core of glutathione S-transferase P1-1 is essential for refolding – identification of a buried and conserved hydrogen bond important for protein stability. *J. Biol. Chem.* 272, 25518–25523.
- [27] Rossjohn, J. et al. (2000) Structures of thermolabile mutants of human glutathione transferase P1-1. *J. Mol. Biol.* 302, 295–302.
- [28] Board, P.G. et al. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798–24806.
- [29] Zhou, H.N., Brock, J., Casarotto, M.G., Oakley, A.J. and Board, P.G. (2011) Novel folding and stability defects cause a deficiency of human glutathione transferase omega 1. *J. Biol. Chem.* 286, 4271–4279.
- [30] Zhou, H., Brock, J., Liu, D., Board, P.G. and Oakley, A.J. (2012) Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases. *J. Mol. Biol.* 420, 190–203.



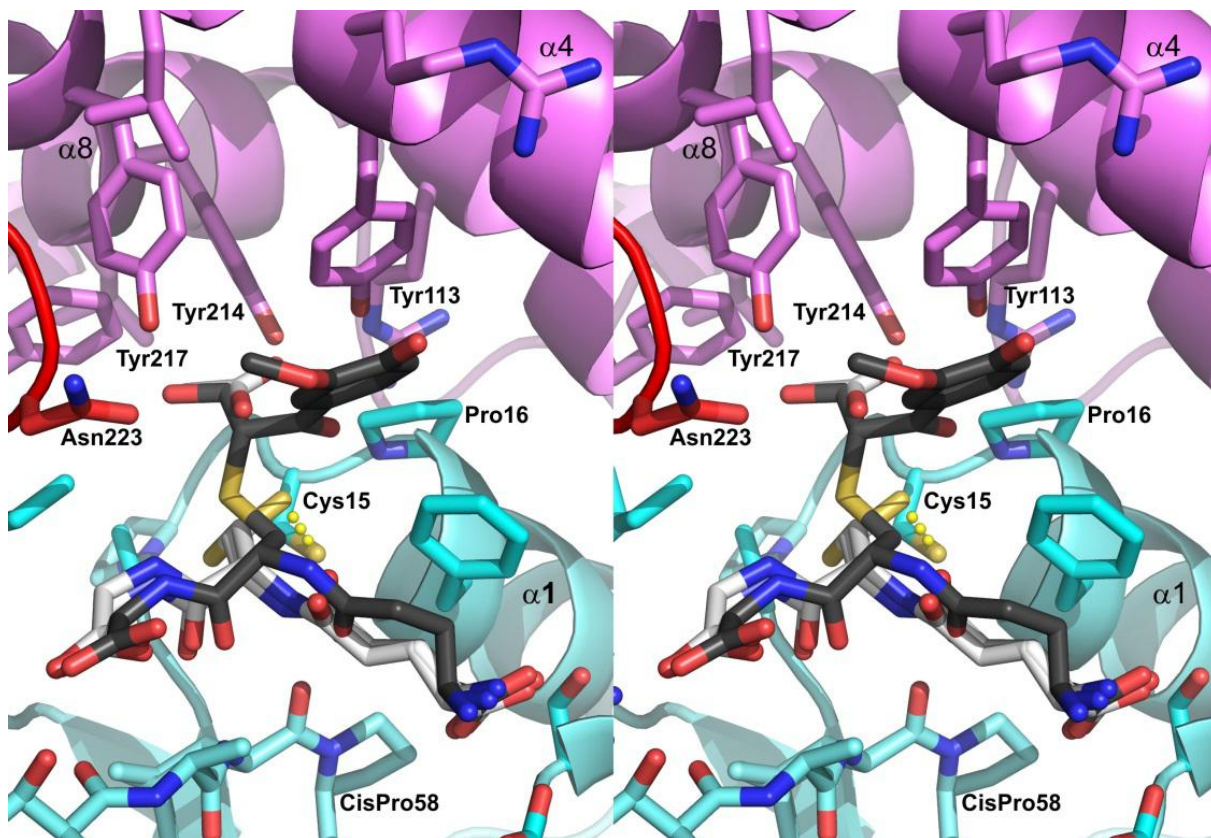
Supplementary Figure 1 : Sequence and structure alignment

The top four sequences correspond to hypothetical proteins found to be SpLigG homologues, and aligned to it by ClustalW. NCBI:ZP_08862720 is from *Ruegeria* sp. TW15; NCBI:AAV95330 from *Ruegeria pomeroyi* DSS3; NCBI:AAZ97003 from *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259; NCBI:CCA92089 from *Novosphingobium* sp. PP1Y; SpLigG is the product of the *Sphingobium* sp. strain SYK-6 gene NCBI:CCA92089. The bottom two sequences are derived from the PDB entries 1eem (hGSTO1-1) and 3qag (hGSTO2-2), and were aligned to SpLigG according to the three dimensional structures, using PDBeFold [2]. Aminoacid numbering indicated above the alignment corresponds to SpLigG. The secondary structures (arrows: β -strands; coils: helices) were determined by PDBeFold (black: SpLigG; gray: hGSTO1-1 and hGSTO2-2). The catalytic cysteine is coloured in red, residues that are conserved in all the sequences are in yellow, residues that are conserved in SpLigG homologues only are in gray, and residues that delineate the putative H-site of SpLigG are in green. The lower-case characters correspond to residues that do not superimpose in the 3-D structures. The blue box highlights the residues involved in the N-capping box [3]. The red box corresponds to the residues highlighted in red in Fig. 2.

[1]: Larkin, M.A. et al. (2007). Clustal W and clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947-2948.

[2]: PDBeFold: Protein structure comparison service Fold at European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>), authored by E. Krissinel and K. Henrick [Krissinel, E. and Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (PDBeFold), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. Acta Cryst. D60, 2256-2268].

[3]: Dragani, B., Stenberg, G., Melino, S., Petruzzelli, R., Mannervik, B. and Aceto, A. (1997). The conserved N-capping box in the hydrophobic core of glutathione S-transferase P1-1 is essential for refolding. J. Biol. Chem. 272, 25518-25523.



Supplementary Figure 2 : GS-HPV docked in the active site of SpLigG

The active site of SpLigG is displayed as it is shown in Fig. 4, with the same color code and details but the electron density. The substrate GS-HPV (Fig. 3, here represented in gray sticks) is docked as described in sections 2.4 and 3.4.

Article 5: New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega Glutathione transferases

Edgar Meux, Mélanie Morel, Tiphaine Lamant, Philippe Gérardin, Jean-Pierre Jacquot, Stéphane Dumarçay, Eric Gelhaye

Biochimie, 2012

Les précédents résultats ont permis de mettre en évidence plusieurs classes au sein des GST à cystéine catalytique, dont la classe des Oméga représentée par six isoformes chez *P. chrysosporium*. Une analyse phylogénétique montre que cette classe d'enzyme est surreprésentée au sein de la population fongique et en particulier chez les saprophytes, suggérant des fonctions associées aux processus de décomposition du bois. Afin d'élucider les fonctions putatives de ces enzymes au sein de cette population, des expériences de criblage de substrat ont été mises au point. Le principe consiste dans un premier temps à identifier les molécules pouvant interagir avec le site actif de ces enzymes et à évaluer leurs propriétés en tant que substrats. Via leur résidu cystéine, les GST Oméga sont capables de cliver les liaisons ester présentes sur des dérivés de fluorescéine (activité estérase). Cette réaction entraîne une émission de fluorescence par le composé clivé qui rend alors compte de l'accessibilité du site actif des enzymes. Des expériences de mutagenèse dirigée démontrent que cette activité estérase est dépendante de la cystéine catalytique. Ainsi ces dérivés de fluorescéine représentent des sondes spécifiques du site actif des GSTO. De plus, l'incubation des substrats identifiés dans l'article 1 avec les enzymes recombinantes induit une baisse significative de la fluorescence émise. Par compétition avec ces sondes spécifiques il est donc possible d'identifier des molécules interagissant avec le site actif des GSTO. Cette technologie a permis de mettre en évidence de nouvelles propriétés biochimiques pour cette classe d'enzyme. En effet une interaction spécifique avec un dérivé bromé de la tetralone a permis d'envisager la synthèse *in vitro* de S-(glutathionyl)-tetralone, et soumis à l'action de PcGSTO3 et PcGSTO4 un nouveau substrat a été identifié. Couplée à des expériences de « ligand fishing », cette technologie a également permis de mettre en évidence des interactions entre les GSTO et des terpènes présent au sein d'extractibles de bois. Cet article présente donc un nouvel outil d'analyse fonctionnelle pouvant être utilisé pour identifier les substrats physiologiques des GST Oméga.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

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

Research paper

New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases

Edgar Meux^{a,b}, Mélanie Morel^{a,b}, Tiphaine Lamant^{a,b}, Philippe Gérardin^c, Jean-Pierre Jacquot^{a,b}, Stéphane Dumarçay^c, Eric Gelhaye^{a,b,*}

^a UMR 1136 INRA-UHP "Interactions Arbres/Micro-Organismes", IFR110 "Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation", Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

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

^c Laboratoire d'études et de Recherches sur le Matériau Bois, EA 1093 UHP, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2012

Accepted 4 October 2012

Available online xxx

Keywords:

Omega class GST

Fluorescent probe

Activity-based protein profiling

Esterase

Tetralone

Terpenes

ABSTRACT

Omega glutathione transferases (GSTO) constitute a family of proteins with variable distribution throughout living organisms. It is notably expanded in several fungi and particularly in the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, raising questions concerning the function(s) and potential redundancy of these enzymes. Within the fungal families, GSTOs have been poorly studied and their functions remain rather sketchy. In this study, we have used fluorescent compounds as activity reporters to identify putative ligands. Experiments using 5-chloromethylfluorescein diacetate as a tool combined with mass analyses showed that GSTOs are able to cleave ester bonds. Using this property, we developed a specific activity-based profiling method for identifying ligands of PcGSTO3 and PcGSTO4. The results suggest that GSTOs could be involved in the catabolism of toxic compounds like tetralone derivatives. Biochemical investigations demonstrated that these enzymes are able to catalyze deglutathionylation reactions thanks to the presence of a catalytic cysteine residue. To access the physiological function of these enzymes and notably during the wood interaction, recombinant proteins have been immobilized on CNBr Sepharose and challenged with beech wood extracts. Coupled with GC–MS experiments this ligand fishing method allowed to identify terpenes as potential substrates of Omega GST suggesting a physiological role during the wood–fungus interactions.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Glutathione transferases (GST) constitute a large superfamily found in all living organisms from prokaryotes to eukaryotes. GSTs are usually homodimeric enzymes. Each monomer is composed of two domains, one conserved within the GST family and involved in glutathione (GSH) binding (the G-site), the other one more variable and involved in the binding of alternate substrates (the H-site) [1,2]. The classical catalytic activity of these enzymes is the addition of

a glutathione moiety on electrophilic molecules, the specificity of these enzymes vs electrophilic compounds being rather loose [3–5]. However, several GST enzymes have also the capacity to perform deglutathionylation reactions on various substrates [6–9]. This reaction is mainly due to the presence of a cysteinyl residue in their catalytic active site. This kind of activity has been demonstrated for enzymes of the Omega class (GSTO) in various organisms (mammals, insects and fungi) [10–15], of the Lambda class (GSTL) found in plants [6] and the recently described S-glutathionyl-hydroquinone reductase (GHR) which belongs to the structural xi class found in bacteria and fungi [7]. The physiological functions of these enzymes remain elusive. However, human GSTOs are involved in arsenic biotransformation, reducing methyl and dimethyl arsenate [16,17], whereas GSTLs are involved in the flavonoid metabolism [6]. Concerning GHR, the different orthologs characterized so far are involved in the catabolism of chlorinated quinones as shown for PcpF in the bacterium *Sphingobium chlorophenolicum* [18] or PcGHR1 in the wood-decaying fungus *Phanerochaete chrysosporium* [7]. This activity is likely related to the

Abbreviations: GSTO, glutathione transferase Omega; ABPP, activity-based protein profiling; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; PAP-SG, S-glutathionyl-phenylacetophenone; DHA, dehydroascorbate; HED, hydroxyethyl disulfide; Tetralone-SG, S-glutathionyl-tetralone; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; DTT, dithiothreitol; PCP, Pentachlorophenol; CNBr, Cyanogen bromide.

* Corresponding author. UMR 1136 INRA-UHP "Interactions Arbres/Micro-Organismes", IFR110 "Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation", Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 42 28.

E-mail address: Eric.Gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr (E. Gelhaye).

0300-9084/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.003>

previously called “reductive dehalogenases”, a two-component system comprising a “classical” GST producing glutathionylated conjugates with concomitant chlorine removal and a glutathione conjugate reductase that releases glutathione from this conjugate in basidiomycetes [19,20].

The number of GSTO encoding genes differs considerably in various fungal genomes, this variation being neither related to the phylogeny nor to the way of life of the fungi [21]. Still, the GSTO class is mainly expanded in wood-decaying fungi, irrespective of the lignin degradation mechanisms employed (brown or white-rot). These variations raise the question of the function(s) and the potential redundancy of these enzymes. In *P. chrysosporium*, a white-rot model used to study wood degradation mechanisms, six GSTO encoding genes have been detected from phylogenetic analyses [21]. As described previously, PcGSTO3, PcGSTO4 and PcGSTO5 belong to subclass II, with 69.5% amino acid identity between PcGSTO3 and PcGSTO4, suggesting recent duplication events [21]. These proteins are closely related to the human HsGSTO1-1 and exhibit a CP(F/Y)(V/A)(Q/E)R active site, characteristic of the members of this subclass. Subclass III comprises PcGSTO6–PcGSTO8 with a (S/C)PY(C/A)(D/H)R active site and surprisingly PcGSTO7 possesses a catalytic serine instead of the conserved cysteinyl residue. Based on 3D structures, this cysteine (or the corresponding serine) is located at the beginning of the first α -helix, in a position similar to the first thiol group of the CxxC motif of thioredoxin and glutaredoxin, and it has been shown to be essential for activity in many GSTOs [7,10,22].

Apart from a previous partial biochemical characterization of PcGSTO3 [7], nearly nothing is known about the functions of these enzymes in filamentous fungi. In the present study, we extend our investigations on GSTOs from the model fungus *P. chrysosporium*, developing new tools to unravel the potential functions of these enzymes.

2. Material and methods

2.1. Cloning of PcGSTOs and site-directed mutagenesis

Full-length coding sequences of *P. chrysosporium* GHR1 (NCBI accession number: EU791894), GSTO3 (EU791893), GSTO4 (JGI protein accession number: 7254) and GSTO7 (JX183066) were PCR-amplified from cDNA using specific primer pairs and cloned after digestion with the appropriate restriction enzyme into the bacterial expression vector pET3d (Novagen). Site-directed mutagenesis of the cDNA sequences was performed using two complementary mutagenic primers. The list of cloning and mutagenic primers is provided in Supplemental Table 1.

2.2. Expression and purification of the recombinant proteins

In all cases, the recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3), containing the pSBET helper plasmid carrying a kanamycin resistance gene which corrects for low abundance Arg tRNAs. The proteins of interest were purified to homogeneity as described previously [7].

2.3. Enzymatic assays

The ability of wild type and mutated recombinant enzymes to catalyze GSH transfer on phenethyl isothiocyanate (ITC) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was estimated as described previously [23]. For these three substrates the reactions were monitored respectively at 275 nm and 340 nm following the increase in absorbance arising from the formation of the S-glutathionylated adduct. The reactions with ITC were performed in

100 mM phosphate buffer pH 6.5 in presence of GSH (2 mM) while the reactions with CDNB were performed at pH 7.5 with an identical GSH concentration. The reactions were started by adding enzymes (0.05–1 μ M) and monitored with a Cary 50 UV–Visible spectrophotometer (VARIAN). To determine catalytic properties, the assays were performed in steady state using various concentrations of substrate (from 10 μ M to 5 mM) and the catalytic parameters were calculated using the Graph Pad[®] software.

Dehydroascorbate (DHA) and hydroxyethyl disulfide (HED) reductions were monitored in 30 mM Tris–HCl buffer pH 8.0 in presence of 200 μ M NADPH and 0.5 IU of glutathione reductase from Bakers yeast [24]. Before the addition of recombinant proteins, substrates with a concentration ranging from 20 μ M to 4 mM were added, and the decrease of absorbance at 340 nm, showing the oxidation of NADPH concomitant with the glutathione disulfide (GSSG) reduction, was followed.

The deglutathionylation activity was also monitored using S-glutathionyl-tetralone (tetralone-SG) as substrate. First tetralone was *in vitro* synthesized. A catalytic amount of potassium carbonate was poured on a mixture obtained by addition of 97 mg of reduced glutathione in 0.5 mL of water on a solution of 71 mg of 2-bromotetral-1-one in 1.5 mL of dimethylformamide. The slurry was stirred overnight at room temperature, and then lyophilized to give around 65 mg of a crude white solid product. This compound has been characterized, without further purification step, by mass spectrometry with a positive electrospray ionization mode, giving a mass product at 451.75 Da. Activities of the recombinant enzymes were then performed in 30 mM Tris–HCl pH 8, containing GSH (3 mM) and tetralone-SG (from 0.1 mM to 3 mM) in a final volume of 650 μ L. The reactions were initiated by adding the recombinant enzyme, stopped by addition of 350 μ L of ethanol, vigorously vortexed, centrifuged at 14,500 rpm during 15 min, and the supernatant was analyzed by HPLC using a Gemini 5- μ m C18 column at 254 nm. Preparation and deglutathionylation of thiodone and S-glutathionyl-phenylacetophenone (PAP-SG) were monitored as described previously [7].

2.4. Esterase activity

Esterase activity toward 5-chloromethylfluorescein diacetate (Green CMFDA[®] – Invitrogen) was investigated measuring specific fluorescence emission of the substrate and by SDS-PAGE. Briefly, the product remains nonfluorescent until cleaved by esterases. All experiments were performed on enzymes as purified, or after reduction with a 10-fold excess of dithiothreitol (DTT) at 25 °C during 30 min. In the latter case, the mixture was passed through a Sephadex G-25 gel-filtration column (GE Healthcare) to eliminate the DTT excess. Treated or untreated enzymes (8 μ M) were incubated with CMFDA (2 μ M) in a final 200 μ L reaction volume (50 mM phosphate buffer pH 8). The mixture was incubated during 40 min at 20 °C, passed through a Sephadex G-25 gel-filtration column (GE Healthcare) to eliminate the excess of compounds. Then, the fluorescein signal was monitored using a fluorescence spectrophotometer Cary Eclipse (VARIAN). Excitation was performed at 495 nm, and fluorescence emission was recorded in the range 495–580 nm.

In complementary experiments, interactions between probes and recombinant proteins were evaluated by SDS-PAGE in similar conditions to those described above. Recombinant enzymes (5 μ g) from the reaction mix were separated using SDS-PAGE and the labeled enzymes were visualized using a UV table and a Geldoc[®]. For broader testing, reactions have been performed in 96-well plates using a VictorX5 plate reader (Perkin Elmer). Briefly, 500 nM of recombinant enzyme were mixed with 2 μ M green CMFDA[®], then plates were read at 25 °C with excitation at 485 nm, fluorescence being recorded during 0.1 s at 535 nm. As a control same experiments were performed with 5-nitrofluorescein diacetate.

As for green CMFDA, esters of 4-methylumbelliferone (4-MU) do not emit a fluorescent signal unless cleaved to release the fluorophore. Fluorometric enzymatic assays are based on the hydrolysis and the release of 4-MU that emits at 460 nm when excited at 365 nm. Reactions were performed in 100 mM phosphate buffer pH 8 in presence of 500 nM recombinant enzymes and the signal was detected using a VictorX5 plate reader (Perkin Elmer). Kinetic parameters were obtained in steady state using various substrate concentrations (from 0.01 μ M to 1000 μ M).

2.5. Activity-based protein profiling (ABPP)

Fluorescent and gel-based ABPP assays were performed in similar conditions to those of the corresponding measurement method. Recombinant reduced enzymes were incubated with a 10-fold excess of each tested compound for 40 min at 20 °C before addition of CMFDA and the fluorescence was then detected. Similar experiments were conducted without enzyme and with DMSO as negative-control. For the determination of the dissociation constants, the overall procedure remained the same but it was performed in steady state conditions. The K_i values were determined using catalytic parameters of the recombinant enzymes (500 nM) in presence of various inhibitor concentrations (from 10 μ M to 500 μ M). K_i values were calculated resolving the nonlinear mixed-model inhibition equation [25]: $V_{max_{App}} = V_{max}/(1 + I/(Alpha * K_i))$; $K_{m_{App}} = K_m * (1 + I/(Alpha * K_i))$; $Y = V_{max_{App}} * X/(K_{m_{App}} + X)$, X being the substrate concentration and Y the enzyme activity. The mixed model is a general equation that includes competitive, uncompetitive and noncompetitive inhibition as special cases. The model has one more parameter ($Alpha$) than the others, and this parameter determining the mechanism of inhibition. V_{max} and K_m represent the maximum enzyme velocity and the Michaelis–Menten constant without inhibitor respectively, whereas $V_{max_{App}}$ and $K_{m_{App}}$ are determined for each inhibitor concentration I . K_i corresponds to the inhibition constant.

2.6. Wood extraction

Beech wood samples were ground to a fine powder, passed through a 115-mesh sieve and dried at 60 °C until minimal weight was obtained. Extraction was performed overnight with HPLC grade acetone using a Soxhlet apparatus then the solvent was evaporated under vacuum. Beech extracts were suspended in DMSO and subsequently loaded on GSTOs immobilized on CNBr Sepharose column. The column was washed with TE buffer containing Tris–HCl 30 mM and EDTA 1 mM, and then TE NaCl 500 mM and first eluted with 50 mM acetic acid. A second elution was performed with TE buffer containing 50 mM DTT and the collected samples were further analyzed by GC–MS.

2.7. GC–MS analysis

The eluate was treated with 300 μ L of anhydrous ethyl acetate. GC/MS analysis was performed on a Clarus 500 gas chromatograph coupled to a Clarus 500 MS quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer Inc., USA). Gas chromatography was carried out on a 5%

diphenyl/95% dimethyl polysiloxane fused-silica capillary column (DB-5ms, 30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific, USA) with helium as a carrier gas at a constant flow of 1 mL/min. The gas chromatograph was equipped with an electronically controlled split/splitless injection. The injection (1 μ L) was performed at 250 °C in the splitless mode. The oven temperature program was as follows: 80 °C for 2 min, 80 °C–190 °C at a rate of 10 °C/min, 190 °C–280 °C at a rate of 15 °C/min and hold for 5 min, then 10 °C/min until 300 °C hold for 14 min. Ionization was achieved under the electron impact mode (70 eV ionization energy). The source and transfer line temperatures were 200 °C and 300 °C, respectively. Detection was carried out in scan mode: $m/z = 35$ to $m/z = 700$. The detector was switched off in the initial 2 min (solvent delay). Compounds were identified by comparison with spectra from the NIST (US National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) mass spectral library (Edition of 2005).

2.8. LC–MS analysis

Wild type and mutated recombinant proteins were analyzed by Q-TOF MS as described by Koh et al. [26]. When oxidation or reduction was required, all protein treatments were performed at 25 °C during 60 min whatever the reductant (GSH/DTT) or the oxidant (GSSG) used.

3. Results

Only three of the six PcGSTOs detected in the genome of *P. chrysosporium*, have been successfully amplified and subsequently cloned. Despite numerous tests using various culture conditions (in presence of wood, arsenate or polycyclic aromatic hydrocarbons in static and agitated conditions), we found that PcGSTO5, 6 and 8 were not expressed, in accordance with previous transcriptomic data suggesting that adequate expression conditions of these three Omega-encoding genes have not yet been found [27].

3.1. Subclass II PcGSTOs bind glutathione through their catalytic cysteine

Mass spectrometry analysis of the untreated enzyme showed a mass of 30,019 Da, a feature consistent with a cleavage of the initiator methionine and with the presence of one glutathione adduct (Table 1). Experiments with DTT-treated PcGSTO4 revealed a mass of 27,713 Da consistent with the release of glutathione by the DTT treatment. Additionally, after treatment with GSSG the mass of the previously reduced protein increased by about 306 Da. The fact that no glutathione adduct was detected on the C37S mutated protein, suggests that PcGSTO4 is able to bind covalently a glutathione through its catalytic cysteine. Similar results have been obtained previously using PcGSTO3 [7]. Concerning PcGSTO7 from subclass III, the obtained mass was in accordance with the expected value (26,938 Da) without methionine, either in absence or presence of DTT treatment demonstrating the absence of

Table 1

Molecular masses of wt and mutated PcGSTOs under various redox conditions. The native column corresponds to proteins obtained after purification. Proteins were reduced by 10 mM DTT and oxidized by 10 mM GSSG.

	Mass expected (Da)	Mass of native proteins (Da)	Mass of reduced proteins (Da)	Mass of reduced further oxidized proteins (Da)
PcGSTO4	27,713	30,019 (+306)	27,713	30,019 (+306)
PcGSTO4 C37S	29,697	29,697	29,697	29,697
PcGSTO7	26,938	26,938	26,938	26,938
PcGSTO7 S15C	26,952	27,258 (+306)	26,952	27,258 (+306)

a glutathione adduct in this isoform. By contrast PcGSTO7 S15C, is able to bind covalently a glutathione.

3.2. Substrate specificities between PcGSTO subclasses II and III

As shown previously for PcGHR1 and PcGSTO3 [7], PcGSTO4 catalyzes “thiol transferase” activity, in particular the reduction of the two classical DHA and HED substrates in presence of glutathione (Table 2). By contrast, PcGSTO4 C37S is fully inactive in these assays. Additionally, we used S-glutathionyl-phenylacetophenone (PAP-SG) and 2-methyl-S-glutathionyl-naphthoquinone (thiodione) to investigate the ability of the *P. chrysosporium* GSTOs to catalyze deglutathionylation of small aromatic molecules. HPLC analysis revealed that PcGSTO4 is able to remove glutathione from PAP-SG whereas no activity was detected with thiodione in contrast to PcGHR1 [7] (data not shown). As expected, no deglutathionylated product was detected with the mutated PcGSTO4 C37S. The reaction between DTT-treated PcGSTO4 and PAP-SG in the absence of glutathione led to the formation of phenylacetophenone and also of glutathionylated protein through a covalent adduct as shown by Q-TOF analysis of the reaction products (data not shown). Overall, these experiments indicate that PcGSTO4 catalyzes deglutathionylation of PAP-SG using the catalytic Cys³⁷. Interestingly, whereas PcGSTO4 C37S remained inactive in all deglutathionylation assays, a “classical” glutathione transferase activity was gained with this mutant using CDNB or phenethyl isothiocyanate as substrates. A similar pattern of activity was detected for PcGSTO7, which possesses a serine at that position, whereas the PcGSTO7 S15C mutant became inactive with these substrates, showing the importance of Ser15 in glutathione transfer. Interestingly, this mutated protein was also inactive as a thiol transferase (HED, DHA) and against PAP-SG and thiodione (Table 2). Nevertheless, this mutant, in contrast to the wild type, is able to bind a glutathione through a disulfide bridge as shown by mass spectrometry and

reduction experiments (Table 1). PcGSTO7 exhibits two additional cysteinyl residues, Cys¹⁸ close to the putative catalytic residue and Cys⁹¹. The mutants PcGSTO7 C18S and C91S exhibit a similar pattern of activities than the wild type protein suggesting that these residues are not essential for catalysis at least with the tested substrates (Table 2).

3.3. Subclass II PcGSTOs possess an esterase activity

CMFDA exhibits two ester bonds and a reactive chloromethyl group (Fig. 1A). It is colorless and nonfluorescent unless the acetate groups are cleaved by esterases. After incubation of the enzymes with CMFDA and removal of the excess substrate by gel filtration, the resulting proteins were tested for fluorescent labeling by spectrofluorometry. The appearance of a signal at 525 nm indicates the cleavage of the ester bonds and the interaction with the enzyme. The fluorescent signal was detected only for DTT-treated PcGSTO3, PcGSTO4 and PcGSTO7 S15C proteins. As example, the experiments performed with PcGSTO4 are shown in Fig. 1B. In contrast, PcGHR1, untreated PcGSTO3, PcGSTO4, PcGSTO7 S15C and catalytically mutants were devoid of esterase activity. In complementary experiments, the binding of the probe onto PcGSTOs was tested by fluorescence detection on SDS-PAGE gels. In this case, the fluorescent labeling reflects both the ester bonds cleavage and the covalently methylfluorescein fixation onto the enzymes. Only the reduced forms of PcGSTO3, PcGSTO4 and PcGSTO7 S15C exhibited a clear fluorescent band confirming the importance of the free cysteine in the active site for the reaction and the complex formation (Fig. 2). In addition, a fluorescent band with very low

Table 2

Kinetic parameters of PcGSTO4 and PcGSTO7 in both glutathionylation and reductive deglutathionylation activity assays. Various concentrations of HED, DHA, PAP-SG and tetralone-SG ranging from 0.01 mM to 4 mM in the presence of 2 mM GSH were used to determine the apparent kinetic parameters of PcGSTOs in reductive deglutathionylation reaction. Catalytic parameters for glutathione transferase activity were determined using a substrate (CDNB or ITC) concentration range of 0.1–5 mM in the presence of 2 mM GSH. The apparent k_{cat} values were calculated resolving the Michaelis–Menten nonlinear regression. Data are represented as mean $\pm$ S.D. ($n \geq 3$). ND means not detected and NM means no measurable.

	HED	DHA	PAP-SG	CDNB	ITC
K_m (mM)					
PcGSTO4	NM	1.66 ± 0.05	0.207 ± 0.03	ND	ND
PcGSTO4 C37S	ND	ND	ND	0.8 ± 0.08	0.067 ± 0.01
PcGSTO7	ND	ND	ND	1.211 ± 0.27	0.14 ± 0.03
PcGSTO7 C18S	ND	ND	ND	2.915 ± 0.84	0.11 ± 0.005
PcGSTO7 C91S	ND	ND	ND	1.57 ± 0.36	0.04 ± 0.009
PcGSTO7 S15C	ND	ND	ND	ND	ND
k_{cat} (s^{-1})					
PcGSTO4	20 ± 0.26	1.26 ± 0.1	180 ± 6.48	ND	ND
PcGSTO4 C37S	ND	ND	ND	0.557 ± 0.018	0.27 ± 0.013
PcGSTO7	ND	ND	ND	2.08 ± 0.26	1.69 ± 0.11
PcGSTO7 C18S	ND	ND	ND	10.78 ± 1.72	3.80 ± 0.05
PcGSTO7 C91S	ND	ND	ND	12.75 ± 1.02	4.18 ± 0.19
PcGSTO7 S15C	ND	ND	ND	ND	ND

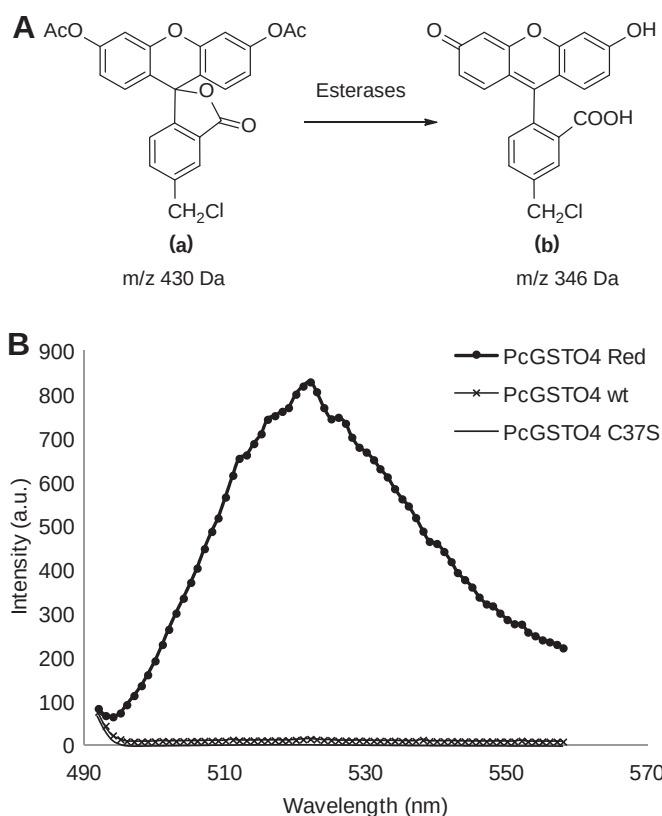


Fig. 1. A, Greenfluorescent chloromethyl derivative of fluorescein diacetate (a) is colorless and nonfluorescent until cleavage of the ester links, releasing a brightly fluorescent product (b). B, green CMFDA was incubated with recombinant enzymes and fluorescence detection ($\lambda_{ex} = 495$ nm) revealed a label only in the assay containing pre-reduced PcGSTO4 (without glutathione adduct on Cys³⁷).

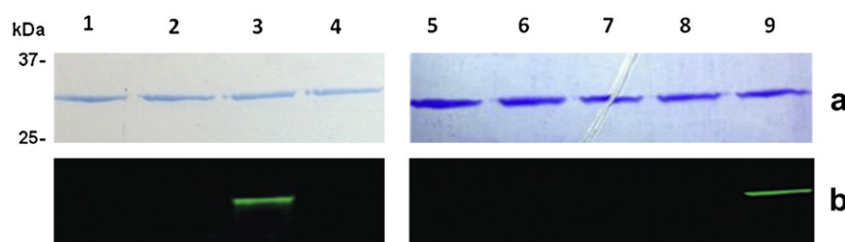


Fig. 2. Protein labeling by 5-chloromethylfluorescein diacetate analyzed by (a) SDS-PAGE with Coomassie blue staining and (b) detected by Geldoc® (λ_{Ex} 488 and λ_{Em} 520 nm). Different forms of PcGSTO4 (1–4) and PcGSTO7 (5–9) were incubated with the CMFDA at 25° for 30 min and the Coomassie staining of 1 μg of proteins revealed a single band consistent with the recombinant enzyme mass (≈ 30 kDa). By contrast some deviations in the fluorescent profile proved that only reduced PcGSTO4 (3) was able to bind the probe, whereas in case of the wild type (1) and the C37S mutant (2), no labeling was detected. When the reduced protein was pretreated with PAP-SG (4) before addition of the substrate, no fluorescent label was detected suggesting that the catalytic cysteine cannot attack the CMFDA anymore (same results were obtained for PcGSTO3). In case of PcGSTO7, the labeling was detected only when the reduced form of the S15C mutant (9) was incubated with CMFDA, whereas wild type (5) and C18S (6), C91S (7), S15C (8) mutants cannot bind the fluorescein derivative. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

intensity was detected with reduced PcGHR1 (data not shown). Finally, the reaction products were analyzed by mass spectrometry. After incubation with CMFDA, the DTT-treated PcGSTO3, PcGSTO4 and PcGSTO7 S15C exhibited a mass increase of 345 Da consistent with the binding of (b) methylfluorescein (Fig. 1A), whereas DTT-treated PcGHR1 revealed an increase of 429 Da consistent with the binding of (a) methylfluorescein diacetate. Similar experiments using a nitrofluorescein diacetate derivative without reactive chloromethyl group led to a protein mass increase of 43 Da. These results are consistent with the binding of an acetyl group only on the reduced PcGSTO3, PcGSTO4 and PcGSTO7 S15C. Furthermore, mass analysis after GSH addition revealed a glutathione adduct in place of the chloromethyl group on the tested proteins, suggesting that the esterase reaction occurs through an acyl-enzyme transition state.

In conjunction with previous experiments, the esterase activity of the PcGSTOs was also evaluated following the hydrolysis reaction in a microplate spectrofluorometer. Various wild type and mutated enzymes were incubated with CMFDA and the fluorescence emission at 535 nm was recorded. As shown in Fig. 3, when the substrate was incubated with reduced form of PcGSTO3 a strong time-dependant increase in fluorescence emission was generated.

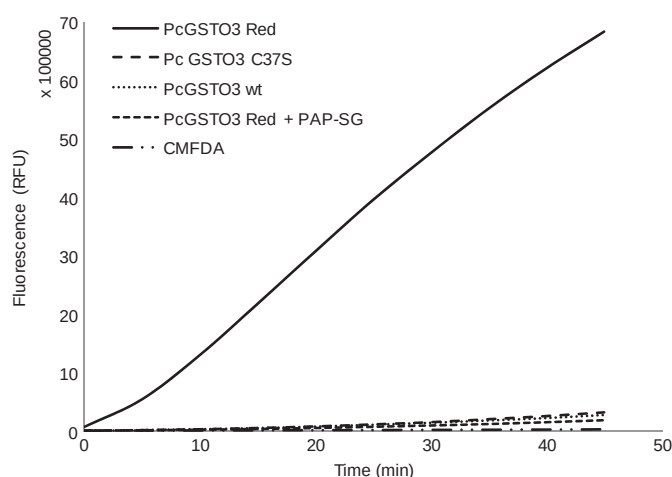


Fig. 3. Spectrofluorometer analysis of the esterase reaction with 5-chloromethylfluorescein diacetate. Reduced PcGSTO3 (500 nM) and CMFDA (2 μM) generated a strong, time-dependent increase in fluorescence emission at 535 nm contrary to the experiments with native PcGSTO3 or with the C37S mutant. As a control the emission of fluorescence was also recorded without enzyme addition (CMFDA). Interestingly when reduced PcGSTO3 was preincubated with PAP-SG (5 μM), no fluorescence emission was recorded suggesting that the esterase reaction on CMFDA was inhibited.

By contrast, both PcGSTO3 wt (i.e. with glutathione adduct on Cys³⁷) and PcGSTO3 C37S were inactive. These results confirmed the importance of the free catalytic cysteine for the ester bonds cleavage. As expected, same results were obtained with reduced form of PcGSTO4 and PcGSTO7 S15C (data not shown). Taken together, these results suggest that PcGSTO3, PcGSTO4 and PcGSTO7 S15C possess an esterase activity with CMFDA and that this activity requires the presence of the catalytic cysteine in the reduced form (i.e. without glutathione adduct). Furthermore, these reduced enzymes as well as reduced PcGHR1 are able to remove chlorine from CMFDA.

The kinetic parameters of this esterase activity have been determined using microplate-based tests. No significant differences were found between PcGSTO3 and PcGSTO4 whereas the catalytic efficiency of PcGSTO7 S15C was 8-fold higher (Table 3). As the reactivity of the catalytic cysteine should give insight on the enzyme velocity differences, we compared esterase activity against CMFDA of the different isoforms at various pH ranging from 3 to 9 (data not shown). The catalytic cysteinyl residues of PcGSTO3, PcGSTO4 and PcGSTO7 S15C exhibit a similar pKa = 6.9 suggesting that the N-terminus cysteine is in the thiolate form at the pH of the activity assays.

In complementary experiments, the esterase activity of these three proteins was confirmed using methylumbelliferone acetate as a substrate (Table 3).

3.4. Screening of PcGSTO3 and PcGSTO4 inhibitors by ABPP

Recently, new tools using fluorescent substrates have been developed for activity-based protein profiling (ABPP) [28,29]. CMFDA has been previously used in combination with intracellular esterase as HsGSTO1-1 specific inhibitor [28,29]. In this study, we used the esterase property of PcGSTOs onto CMFDA to directly screen ligands of GSTOs. As it is well known that GSTs have broad

Table 3

Catalytic efficiency of PcGSTOs esterase activities toward green CMFDA and 4-methylumbelliferyl acetate. The parameters values were obtained in steady state using substrate concentration ranges from 1 μM to 1000 μM with 500 nM recombinant enzyme. The fluorescence of green CMFDA and 4-methylumbelliferyl acetate was detected using 485/535 and 355/460 as excitation/emission wavelengths. Estimated standard errors in the fitted model are shown.

Enzyme	CMFDA	4-Methylumbelliferyl acetate
	$\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$	$\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$
PcGSTO3	9.30 ± 0.50	1.46 ± 0.01
PcGSTO4	9.84 ± 0.35	0.43 ± 0.005
PcGSTO7 S15C	68.85 ± 4.81	0.46 ± 0.006

specificities and that small modifications in their catalytic site lead to major activity changes [30], we did not screen potential substrates using the nonphysiological PcGSTO7 S15C but instead focused on PcGSTO3 and PcGSTO4.

We screened various commercial compounds for their ability to inhibit esterase activity of PcGSTOs. We ran experiments using derivatives of propane, butane, benzene, phenyl, tetralone and imidazole, as well as various compounds known to be present in wood (Fig. 4). Since the interaction between PcGSTOs and CMFDA depends on the catalytic cysteine, its inhibition will lead to the identification of potential substrates of the tested enzymes. Interestingly, when PcGSTO3 and PcGSTO4 were incubated with 2-Br-1-tetralone, they cannot bind the fluorescent probe anymore suggesting that these GSTOs are able to recognize tetralone derivatives as potential ligands/substrates (Fig. 4). In contrast, PcGHR1 cannot bind 2-Br-1-tetralone, confirming the specificity of GHR toward quinone motifs.

Since the gel-based method does not permit a rapid and comparative analysis with a large number of compounds, experiments using a multiplate reader were performed with numerous commercial compounds and various wood components as vanillin, epicatechin, coniferaldehyde, lignin or acetophenone derivatives. The recombinant enzyme was equally distributed into a 96-well plate and a different compound was added to each well. CMFDA was then added to all wells and the fluorescence measured during a fixed interval. Using this approach, we identified thiodione, phenylacetophenone and tetralone derivatives as PcGSTO3 and

PcGSTO4 ligands and potential substrates (Fig. 5A), and also phenol derivatives like pentachlorophenol (PCP) (d) and trihydroxybenzoic acid including gallic acid (g). In addition, we found that rifampicin (h) inhibits esterase activity of PcGSTO3 and PcGSTO4 with 5-chloromethylfluorescein diacetate, proving that both PcGSTOs of subclass II could recognize a broad range of molecules.

To investigate the selectivity of the proteins, we have determined the dissociation constants of the complex enzyme/inhibitor (K_i) measuring reactivity of the enzymes, in presence of various concentrations of inhibitors (0.1–500 μ M). The K_i values were calculated with the mixed-model inhibition that includes noncompetitive, competitive and uncompetitive models. In all experiments, best K_i values matched with the noncompetitive inhibition model. As example, the data obtained in presence of various concentrations of PAP-SG are reported in Fig. 6. We found affinities ranged from 0.61 μ M to 293 μ M depending on the tested compounds (Table 4). In most cases, PcGSTO3 and PcGSTO4 exhibit similar affinity toward the identified inhibitors. Nevertheless, the affinity for pentachlorophenol is 5-fold higher for PcGSTO4 than for PcGSTO3, indicating an apparent selectivity between these proteins.

3.5. Subclass II Omega glutathione transferases catalyze the deglutathionylation of S-glutathionyl-tetralone

The glutathionylation of PAP and menadione increases strongly the affinity of these compounds for PcGSTOs (Table 4). In addition,

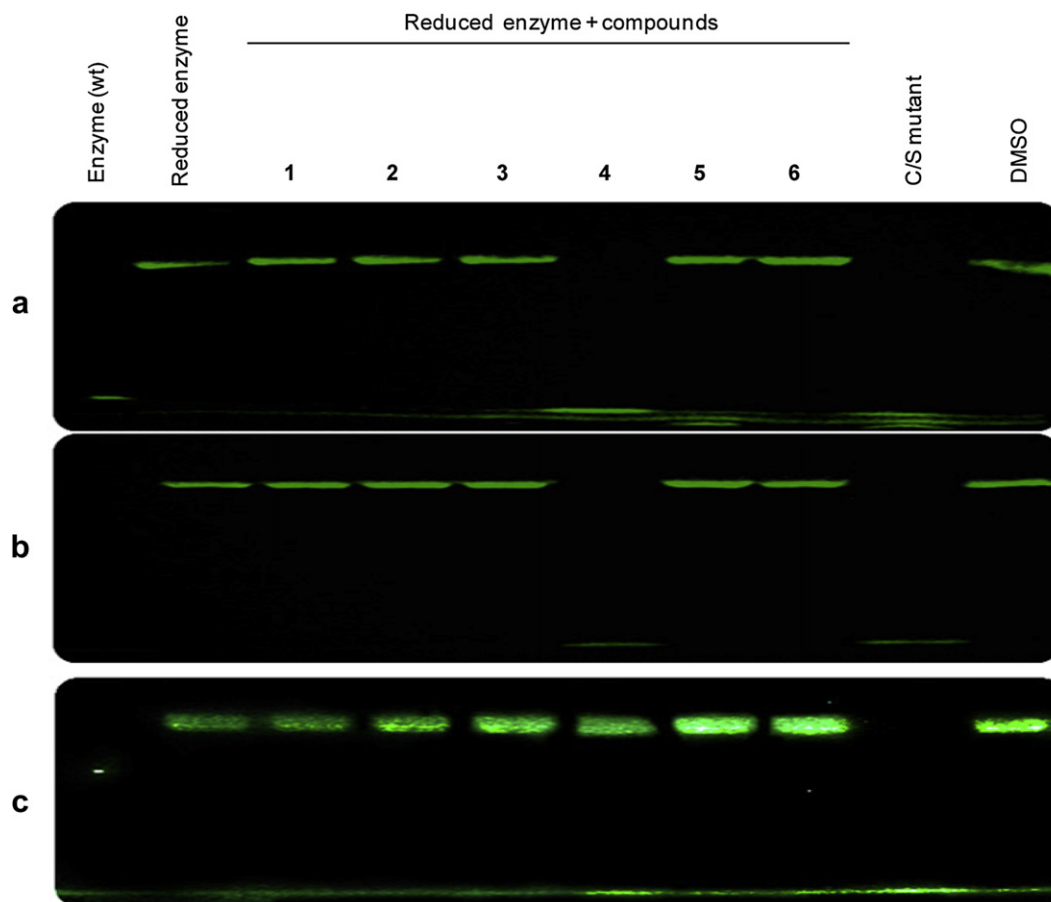


Fig. 4. Gel-based activity-based protein profiling. Selectivity and potency of potential inhibitors can be determined by initial incubation of reduced PcGSTO3 (a), PcGSTO4 (b) or PcGHR1 (c) with derivatives of propane (1 and 6), butane (2), benzene (5), phenyl (3), and tetralone (4) before addition of 5-chloromethylfluorescein diacetate. Because PcGHR1 do not catalyze esterase reaction on CMFDA, the gel was overexposed in order to see the small amount of autoreduced fluorescein bound on recombinant protein. To prove that binding is not dependent on solvent addition, the enzymes were also incubated with 5% DMSO before addition of 5-chloromethylfluorescein diacetate.

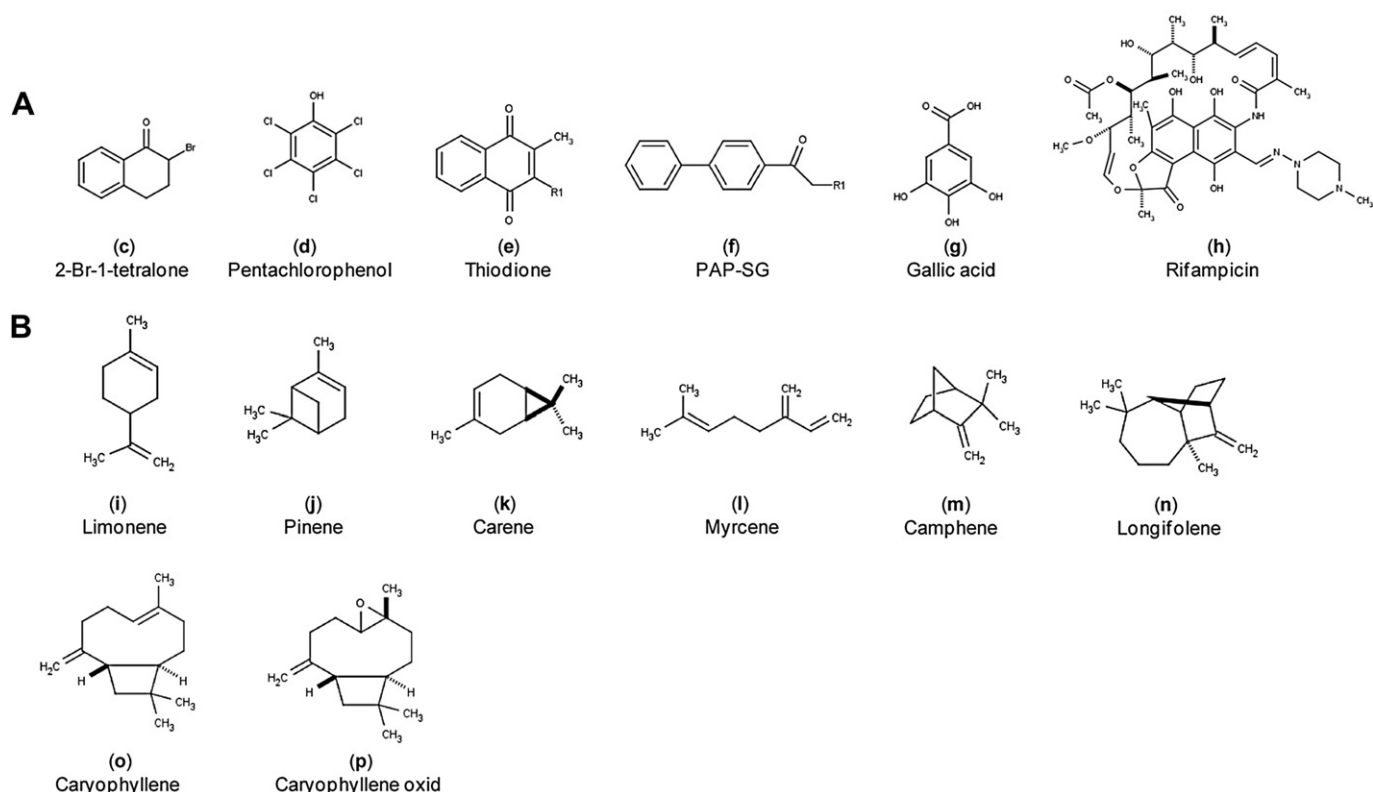


Fig. 5. Structure of PcGSTO3 and PcGSTO4 activity inhibitors. (A) PAP-SG and thiodione are glutathionylated forms in which R1 corresponds to the (S-glutathionyl) adduct, whereas the nonglutathionylated molecules (R1 = H) are called respectively phenylacetophenone and menadione. (B) Structure of the tested terpenes.

the specific deglutathionylation catalyzed by these enzymes suggest a potential activity toward compounds identified by ABPP (Section 3.4). To evaluate tetralone derivatives as potential substrates, a glutathione conjugate has been synthesized starting from commercially available GSH and 2-bromotetral-1-one (see experimental part 2.3). Both tetralone and S-glutathionyl-tetralone (tetralone-SG) are characterized by an absorbance at 254 nm but on HPLC C18 columns they elute at very different times (6.5 min for tetralone-SG and 9 min for tetralone). In presence of GSH, addition of PcGSTO3 or PcGSTO4 led to a strong modification of the elution

profile with the disappearance of the main peak at 6.5 min and the formation of a new peak corresponding to tetralone at 9 min (Fig. 7). In these conditions, the catalytic parameters of the deglutathionylation activity against tetralone-SG were determined (Table 5). Only subclass II GSTOs are active against this substrate. As a control, PcGHR1 and PcGSTO7 S15C were fully inactive in this test.

The incubation of previously reduced PcGSTO3 and PcGSTO4 in the presence of tetralone-SG without addition of GSH led to the formation of a minimal amount of tetralone (in absence of glutathione the reaction does not turn over and is limited to a single catalytic turnover) and a glutathione adduct on the proteins detected by mass spectrometry analyses. The deglutathionylated product is not detected either in presence of native purified (with a glutathione adduct) proteins or with a C37S mutant (data not shown). These results are in accordance with the involvement of the Cys³⁷ in the deglutathionylation reaction leading to the formation of a disulfide bridge with the glutathione removed from tetralone-SG. When GSH is added to the mix, glutathione disulfide is detected by mass spectrometry (data not shown), in accordance with the role of GSH in the enzyme regeneration. Taking together, all these results are in agreement with a reaction of PcGSTO3 and PcGSTO4 against S-glutathionyl-tetralone validating the screening method developed in this study.

3.6. Identification of terpenes as PcGSTOs ligands

In order to access the physiological function of these enzymes during the interaction between the fungus and its natural substrate, we developed an approach to screen natural wood compounds. We showed that beech acetonic extracts are able to inhibit the esterase activity of PcGSTOs (data not shown). The chosen strategy was to use an affinity chromatography immobilizing recombinant

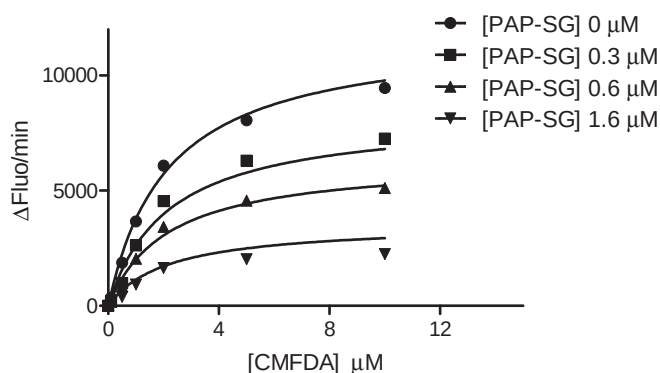


Fig. 6. PAP-SG inhibited the esterase activity of PcGSTO3 toward 5-chloromethylfluorescein diacetate. Kinetic parameters of reduced PcGSTO3 (500 nm) with CFMDA were measured in steady state conditions, with various concentrations of inhibitor (PAP-SG). Then plots were analyzed with mixed-model inhibition. The dissociation constants of the enzyme–inhibitor complex (K_i) were calculated with Alpha value of 1.22 ± 0.6 corresponding to the noncompetitive inhibition mechanism ($r^2 = 0.991$).

Table 4
 K_i values for inhibition of PcGSTO3 and PcGSTO4 by various compounds determined by competitive ABPP. Catalytic parameters of PcGSTO3 and PcGSTO4 for esterase activity were determined at various concentrations of inhibitors and the dissociation constants of the enzyme–inhibitor complex were calculated from the mixed-model nonlinear regression. Plots fitted with the noncompetitive inhibition model ($r^2 > 0.99$) and estimated standard errors in the fitted model are shown ($n = 3$).

Enzyme	Inhibition constant K_i (μ M)						
	PAP-SG	PAP	2-Br-1-tetralone	Thiodione	Menadione	Rifampicin	PCP
PcGSTO3	0.61 ± 0.06	1.691 ± 0.17	16.32 ± 0.97	3.148 ± 0.43	24.98 ± 3.62	21.11 ± 1.41	69.04 ± 8.55
PcGSTO4	0.87 ± 0.07	3.168 ± 0.3	16.10 ± 0.73	4.542 ± 0.66	35.91 ± 4.56	45.58 ± 3.84	14.44 ± 1.33

PcGSTO4 on a CNBr Sepharose and subsequently challenging it with beech acetic wood extracts, allowing any ligand present to be bound by the immobilized protein. After extensive washing steps and DTT elution, GC–MS analyses were performed to identify the beech extract compounds that had been bound by subclass II PcGSTOs. Chromatograms acquired for PcGSTO4 alone (A) and PcGSTO4 (B) in mixture with beech extracts were very similar, however the elution profiles gave substantial indications between 4 and 6 min (Fig. 8). The main peak detected with a retention time of 4.87 in both chromatograms was identified as the DTT reagent, which was used in the second elution. However, some small peaks were present in the second chromatogram and absent in the first one, or in the starting extract (not shown), indicating enzymatic by-product formation. Identification of these compounds was carried out by comparison of their mass spectra with those of the NIST database. Several of these peaks did not lead to a significant identification. However one peak with a retention time of 4.58 min was of particular interest. Interestingly, its molecular mass coincides

with a thiolate cysteine addition on a monoterpene followed by hydrolysis of the resulting covalent complex.

To confirm the potential interactions between subclass II PcGSTOs and terpene derivatives, the effect of various purified terpenes (Fig. 5B) on enzyme activity (PcGSTO3 and PcGSTO4) was then investigated. We identified several compounds that inhibited the activity of the PcGSTOs toward CMFDA (Table 6). While several exhibit low binding affinity (menthol, pinene or camphene), other compounds as carene (k) and caryophyllene oxide (p) resulted in a strong inhibition. As small modifications in terpene structure lead to major affinity changes, the recognition between the enzymes and their substrates was not a random occurrence and depended on the structure of the tested compounds. Interestingly, oxidation of caryophyllene increased strongly (tenfold) the affinity of the resulting oxidized compound (caryophyllene oxide) for PcGSTOs. This result combined with the known glutathione-dependent reductase activity of the enzymes suggested a new potential redox function for subclass II GSTOs toward terpene derivatives.

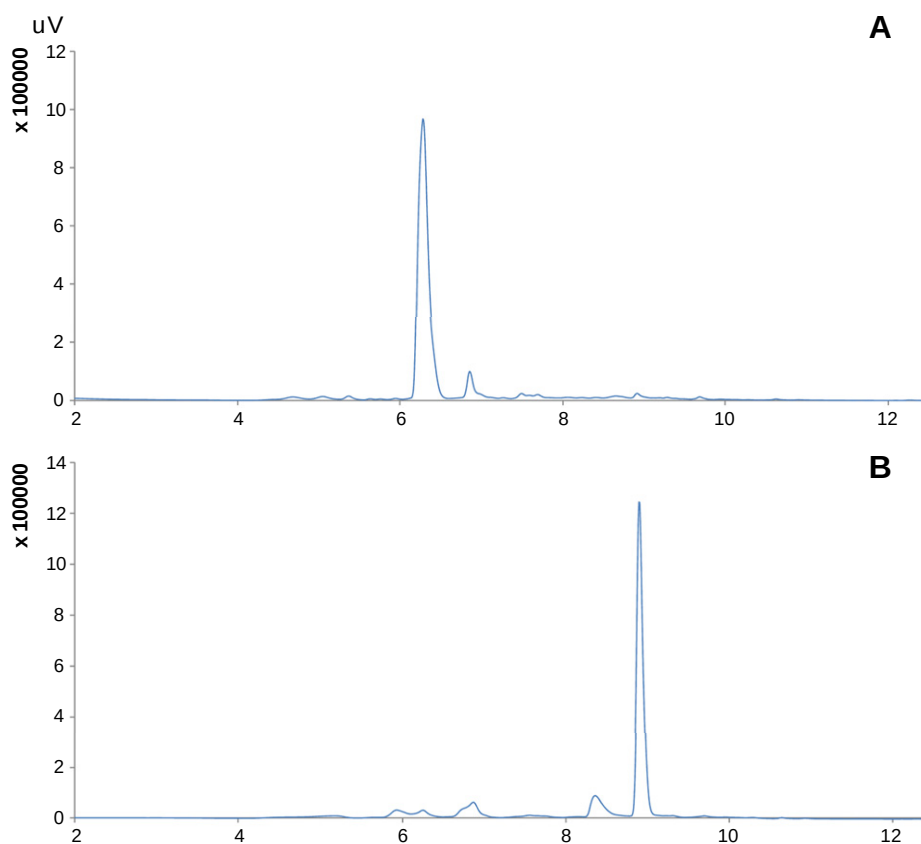


Fig. 7. HPLC analysis of S-glutathionyl-tetralone challenged with recombinant PcGSTO4. Purified S-glutathionyl-tetralone was detected at 254 nm after 6.5 min (A). Addition of reduced proteins leads to the formation of tetralone (9 min) and disappearance of the glutathionylated substrate (B). No activity was detected in presence of PcGSTO3 C37S or PcGSTO4 C37S.

Table 5

Activities of the PcGSTOs in the reductive deglutathionylation of the S-glutathionyl-tetralone (tetralone-SG). No activity was detected for both PcGSTO3 C37S and PcGSTO4 C37S mutants.

	Tetralone-SG
K_m (mM)	
PcGSTO3	0.48 ± 0.11
PcGSTO4	0.38 ± 0.05
k_{cat} (s^{-1})	
PcGSTO3	7.33 ± 0.71
PcGSTO4	2.9 ± 0.09

4. Discussion

Almost all glutathione-containing organisms contain Omega glutathione transferases, sharing overall similar structural topology and capable of performing glutathione-dependent reductions. Widely distributed in fungi, GSTOs have been poorly studied and their functions remain usually evasive mainly because of their high diversity and also of the lack of knowledge concerning their catalytic specificities. In yeast, three GSTOs have been partially characterized. Although they exhibit thiol transferase activity, they display a CPWATR active site defining them as members of the newly identified glutathionyl-hydroquinone reductase subclass. Omega GSTs exhibit glutathione-dependant activity and could also be involved in arsenic biotransformation. In accordance with previous studies, we demonstrate here that the corresponding enzymes from *P. chrysosporium* exhibit a conserved catalytic mechanism implying a conserved cysteine. This latter is involved in the nucleophilic attack of a carbon–sulfur bond leading to the formation of a disulfide bridge with the removal of glutathione from their substrate, with the exception of PcGSTO7 which displays a catalytic serine, and has thus the capacity to catalyze glutathione transfer on electrophilic compounds. From these data, Omega GSTs occupy a distinct catalytic niche in the overall repertoire of the GSTs superfamily, and to date their physiological function remains to be determined.

In this study, using fluorescence measurements and mass analyses we demonstrate that PcGSTOs from subclass II display an esterase activity against 5-chloromethylfluorescein diacetate.

Biochemical experiments with catalytic mutants coupled with mass analyses revealed that the free cysteinyl group attacks the ester bonds. Since it can be cleaved by GSTOs, CMFDA was used for activity-based substrate profiling. The observation that these enzymes contain a catalytic cysteine combined with the reduction of the observed esterase activity following incubation with various compounds lead to propose that these interactions occur at the active site. Although gel-based experiments are reliable and permit comparative analysis of many samples, the multiplate method combines reduction of the working material amount and high-resolution analysis. Using this strategy, various molecules were found able to inhibit esterase activity displayed by PcGSTO3 and PcGSTO4. Among the identified substrates, tetralone and pentachlorophenol are known to be cell toxic, suggesting a potential function of GSTOs in toxic compounds catabolism, through thiol-dependent reductase activity.

As a confirmation, we demonstrated that GSTOs from subclass II are able to catalyze the glutathione-dependent reduction of *in vitro* synthesized S-glutathionyl-tetralone derivatives confirming the robustness of the activity-based substrate profiling method. Additionally, tetralone derivatives have been recently isolated from various fungi associated with plants as potential secondary metabolites during plant infection confirming their role as potential physiological substrates. In agreement with a potential detoxification function of GSTOs against tetralone derivatives, it has been shown that these compounds possess an antifungal activity against many plant pathogenic fungi and bacteria [31,32]. Thus we propose that Omega GSTs could be involved in detoxification of various compounds through thiol-dependent reductase activity leading to less toxic compounds. We also identified rifampicin, which has been previously identified as a potential inhibitor of the human HsGSTO1-1, suggesting that this molecule could be a common ligand of GSTOs. In addition, it has been recently shown that cysteine containing Lambda glutathione transferases, which correspond to plant Omega orthologs should take part in tocopherol reduction [33,34]. Moreover, using affinity chromatography we identified a group of monoterpenes as endogenous ligands. These results were confirmed using ABPP methods, which revealed two major compounds that decreased the fluorescence signal, identified as monoterpene (carene) and sesquiterpene (caryophyllene oxide). This observation could be explained as the result of cysteine

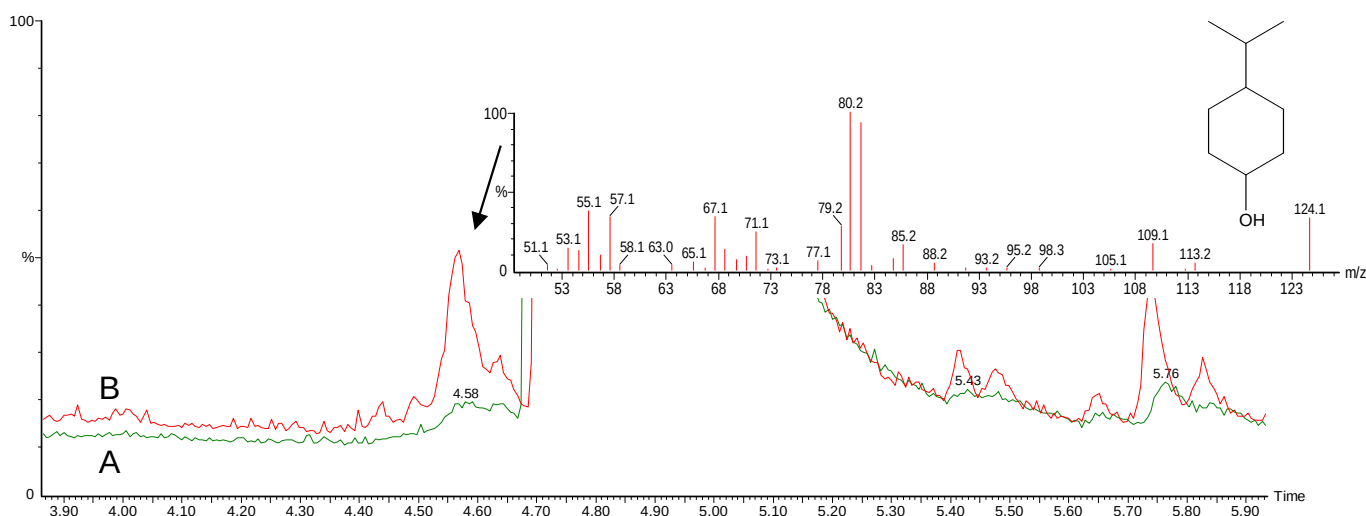


Fig. 8. GC–MS analysis of eluted compounds from CNBr-immobilized PcGSTO4. Control elution profile obtained for PcGSTO4 without beech extract incubation (A). Identification of ethyl acetate soluble compounds obtained from a mixture of PcGSTO4 and beech acetonic extract (B). The major peak detected with a retention time of 4.87 in both chromatograms was identified as the DTT reagent, which was used in the second elution.

Table 6Dissociation constants between recombinant PcGSTO and various monoterpenes and sesquiterpenes. Data are represented as mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

Enzyme	Inhibition constant K_i (μ M)							
	Limonene	Camphene	Pinene	Longifolene	Carene	Myrcene	Caryophyllene	Caryophyllene oxide
PcGSTO3	113 $\pm$ 37.7	575 $\pm$ 124	636 $\pm$ 208	293 $\pm$ 53	29.6 $\pm$ 6.39	122 $\pm$ 36	127 $\pm$ 44	12.93 $\pm$ 2.89
PcGSTO4	118 $\pm$ 34.3	470 $\pm$ 108	417 $\pm$ 97	276 $\pm$ 111	40.9 $\pm$ 6.76	97.1 $\pm$ 31	143 $\pm$ 73	15.96 $\pm$ 2.11

thiolate attack followed by the hydrolysis of the resulting covalent complex, in accordance with recent experiments, which have shown that terpenes could be reduced via thiol addition [35]. Although terpenes presence seemed to be quite unexpected in beech extracts, some studies have reported the emission of some monoterpenes by beech under stress conditions [36,37]. Terpenes being the largest class of natural products (around 25,000 terpene structures reported), just a few have been investigated from a functional perspective. However some terpenes were demonstrated to be toxic to other organisms, which led to the hypothesis that they might have ecological roles in antagonistic interactions between organisms [38].

From these data, it appears clearly that Omega GST could be involved in deglutathionylation reaction toward various compounds suggesting a link with phase I detoxification enzymes as cytochrome P450 monooxygenases. The wood-decaying fungi and in particular basidiomycetes have developed complex extracellular systems allowing efficient modification/degradation of the recalcitrant lignocellulosic complexes. The oxidative processes generate a myriad of compounds more or less toxic, their nature depending both on the extracellular enzymatic systems and of the wood molecular composition. To cope with these compounds, wood-decaying fungi exhibit a large number of CytP450 [39,40]. As stated before, the activities of CytP450 lead in numerous cases to unstable intermediates [10], which could react spontaneously with the intracellular reduced glutathione (present in a millimolar range concentration in fungi). Beside a potential mechanistic role of the GSTOs in deglutathionylation (thiol transferase activity), these enzymes could be also involved in intermediate metabolic/catabolic pathway, allowing the pursuit of the following steps. In the context of wood decomposing fungi, a realistic hypothesis is that the variability of wood chemical composition could be one of the main factors responsible for the selection of expanded GST families. Moreover, it has been recently shown that Omega GSTs from *P. chrysosporium* and *Phanerochaete carnosae* were upregulated during growth on medium containing fir, pine or aspen wood [41,42]. Thus we postulate that the diversity in Omega glutathione transferases actually reflects the variability of wood chemical compounds coming from phase I detoxification enzymes. No interaction was found between GSTOs and aromatic breakdown products as benzoic acid, vanillic acid or benzaldehyde derivatives, detected from lignin breakdown suggesting a relative specificity and proving the sensibility of the ABPP method. In this study, we have shown that duplication has been followed by neo-functionalization for PcGSTO3 and PcGSTO4 since enzymes which display 70% amino acid identity and similar activities, exhibit nevertheless differences in ligand affinity in particular relative to pentachlorophenol. In addition, it has been recently demonstrated that the transcript level is sixfold higher for PcGSTO3 than PcGSTO4 during growth on medium containing white pine or aspen as sole carbon source, whereas no difference between the expression levels of both genes was observed on a medium containing glucose [41]. Interaction properties of these enzymes could be dramatically modified by changing a single residue in the G-site and/or in the H-site [30]. A similar phenomenon is detected inside the subclass ure2p [43] and more largely for GSTs, known to be versatile

enzymes accepting a large range of substrates. We postulate that the large GST-encoding gene copy number variation found in wood-decaying fungi [21] could reflect adaptation to their environment and more particularly to their various substrates as teralones or terpenes. Functional tools as ABPP developed in this study could be useful to identify specificity within the GSTO class and could be a way to connect genomic variability to environmental adaptation in wood-decaying fungi.

5. Funding

This work was supported by Agence National de la Recherche Research (ANRBlanc «etherase»), Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de la Technologie and INRA.

Acknowledgments

We thank François Dupire for LC–MS analysis and Jérémy Couturier for technical advices.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.003>.

References

- [1] D.V. Sheehan, Attaining remission in generalized anxiety disorder: venlafaxine extended release comparative data, *J. Clin. Psychiatry* 62 (Suppl. 19) (2001) 26–31.
- [2] R.N. Armstrong, Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 2–18.
- [3] J.H. Keen, W.B. Jakoby, Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 5654–5657.
- [4] J.D. Hayes, D.J. Pulford, The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30 (1995) 445–600.
- [5] J.D. Hayes, L.I. McLellan, Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress, *Free Radic. Res.* 31 (1999) 273–300.
- [6] D.P. Dixon, R. Edwards, Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 36322–36329.
- [7] E. Meux, P. Prosper, A. Ngadin, C. Didierjean, M. Morel, S. Dumarcay, T. Lamant, J.P. Jacquot, F. Favier, E. Gelhaye, Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 9162–9173.
- [8] L. Xun, S.M. Belchik, R. Xun, Y. Huang, H. Zhou, E. Sanchez, C. Kang, P.G. Board, S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases, *Biochem. J.* 428 (2010) 419–427.
- [9] P.G. Board, The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics, *Drug Metab. Rev.* 43 (2011) 226–235.
- [10] P.G. Board, M. Coggan, G. Chelvanayagam, S. Easteal, L.S. Jermini, G.K. Schulte, D.E. Danley, L.R. Hoth, M.C. Griffor, A.V. Kamath, M.H. Rosner, B.A. Chrnyk, D.E. Perregaux, C.A. Gabel, K.F. Geoghegan, J. Pandit, Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 24798–24806.
- [11] K. Yamamoto, S. Nagaoka, Y. Banno, Y. Aso, Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori*, *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 149 (2009) 461–467.
- [12] J. Kim, H. Suh, S. Kim, K. Kim, C. Ahn, J. Yim, Identification and characteristics of the structural gene for the *Drosophila* eye colour mutant *sepia*, encoding PDA synthase, a member of the Omega class glutathione S-transferases, *Biochem. J.* 398 (2006) 451–460.

- [13] S. McGoldrick, S.M. O'Sullivan, D. Sheehan, Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily, *FEMS Microbiol. Lett.* 242 (2005) 1–12.
- [14] E. Masai, Y. Katayama, M. Fukuda, Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 1–15.
- [15] A. Garcera, L. Barreto, L. Piedrafitá, J. Tamarit, E. Herrero, Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases, *Biochem. J.* 398 (2006) 187–196.
- [16] R.A. Zakharyan, A. Sampayo-Reyes, S.M. Healy, G. Tsapralis, P.G. Board, D.C. Liebler, H.V. Aposhian, Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1051–1057.
- [17] C. Burmeister, K. Luersen, A. Heinick, A. Hussein, M. Domagalski, R.D. Walter, E. Liebau, Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of the Omega class glutathione transferase (GSTO-1), *FASEB J.* 22 (2008) 343–354.
- [18] Y. Huang, R. Xun, G. Chen, L. Xun, Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 7595–7600.
- [19] A. Hiratsuka, K. Tobita, H. Saito, Y. Sakamoto, H. Nakano, K. Ogura, T. Nishiyama, T. Watabe, (S)-preferential detoxification of 4-hydroxy-2(E)-nonenal enantiomers by hepatic glutathione S-transferase isoforms in guinea-pigs and rats, *Biochem. J.* 355 (2001) 237–244.
- [20] G.V. Reddy, M.H. Gold, Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved, *Microbiology* 146 (Pt 2) (2000) 405–413.
- [21] M. Morel, A.A. Ngadin, M. Droux, J.P. Jacquot, E. Gelhaye, The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 3711–3725.
- [22] T. Ishikawa, A.F. Casini, M. Nishikimi, Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 28708–28712.
- [23] R.H. Kolm, U.H. Danielson, Y. Zhang, P. Talalay, B. Mannervik, Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies, *Biochem. J.* 311 (Pt 2) (1995) 453–459.
- [24] R. Njalsson, K. Carlsson, B. Olin, B. Carlsson, L. Whitbread, G. Polekhina, M.W. Parker, S. Norgren, B. Mannervik, P.G. Board, A. Larsson, Kinetic properties of missense mutations in patients with glutathione synthetase deficiency, *Biochem. J.* 349 (2000) 275–279.
- [25] R.A. Copeland, *Enzymes: a Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley, New York, 2000, xvi, 397 pp.
- [26] C.S. Koh, N. Navrot, C. Didierjean, N. Rouhier, M. Hirasawa, D.B. Knaff, G. Wingsle, R. Samian, J.P. Jacquot, C. Corbier, E. Gelhaye, An atypical catalytic mechanism involving three cysteines of thioredoxin, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 23062–23072.
- [27] A. Vanden Wymelenberg, J. Gaskell, M. Mozuch, S.S. BonDurant, G. Sabat, J. Ralph, O. Skyba, S.D. Mansfield, R.A. Blanchette, I.V. Grigoriev, P.J. Kersten, D. Cullen, Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 4499–4507.
- [28] D.A. Bachovchin, S.J. Brown, H. Rosen, B.F. Cravatt, Identification of selective inhibitors of uncharacterized enzymes by high-throughput screening with fluorescent activity-based probes, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 387–394.
- [29] J. Son, J.J. Lee, J.S. Lee, A. Schuller, Y.T. Chang, Isozyme-specific fluorescent inhibitor of glutathione s-transferase omega 1, *ACS Chem. Biol.* 5 (2010) 449–453.
- [30] B. Mannervik, A. Runarsdottir, S. Kurtovic, Multi-substrate-activity space and quasi-species in enzyme evolution: Ohno's dilemma, promiscuity and functional orthogonality, *Biochem. Soc. Trans.* 37 (2009) 740–744.
- [31] L.W. Wang, B.G. Xu, J.Y. Wang, Z.Z. Su, F.C. Lin, C.L. Zhang, C.P. Kubicek, Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1231–1239.
- [32] S. Yan, S. Li, W. Wu, F. Zhao, L. Bao, R. Ding, H. Gao, H.A. Wen, F. Song, H.W. Liu, Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests, *Chem. Biodivers* 8 (2011) 1689–1700.
- [33] D.P. Dixon, P.G. Steel, R. Edwards, Roles for glutathione transferases in anti-oxidant recycling, *Plant Signal. Behav.* 6 (2011) 1223–1227.
- [34] N. Kobayashi, D. DellaPenna, Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in *Arabidopsis*, *Plant J.* 55 (2008) 607–618.
- [35] M. Firdaus, L. Montero de Espinosa, M.A.R. Meier, Terpene-based renewable monomers and polymers via Thiol–Ene additions, *Macromolecules* 44 (2011) 7253–7262.
- [36] S. Moukhtar, B. Bessagnet, L. Rouil, V. Simon, Monoterpene emissions from Beech (*Fagus sylvatica*) in a French forest and impact on secondary pollutants formation at regional scale, *Atmos. Environ.* 39 (2005) 3535–3547.
- [37] M. Simpraga, H. Verbeeck, M. Demarcke, É. Joó, O. Pokorska, C. Amelynck, N. Schoon, J. Dewulf, H. Van Langenhove, B. Heinesch, M. Aubinet, Q. Laffineur, J.F. Müller, K. Steppe, Clear link between drought stress, photosynthesis and biogenic volatile organic compounds in *Fagus sylvatica* L, *Atmos. Environ.* 45 (2011) 5254–5259.
- [38] J. Gershenzon, N. Dudareva, The function of terpene natural products in the natural world, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 408–414.
- [39] D.C. Eastwood, D. Floudas, M. Binder, A. Majcherczyk, P. Schneider, A. Aerts, F.O. Asiegbu, S.E. Baker, K. Barry, M. Bendiksby, M. Blumentritt, P.M. Coutinho, D. Cullen, R.P. de Vries, A. Gathman, B. Goodell, B. Henrissat, K. Ihrmark, H. Kauserud, A. Kohler, K. LaButti, A. Lapidus, J.L. Lavin, Y.H. Lee, E. Lindquist, W. Lilly, S. Lucas, E. Morin, C. Murat, J.A. Oguiza, J. Park, A.G. Pisabarro, R. Riley, A. Rosling, A. Salamov, O. Schmidt, J. Schmutz, I. Skrede, J. Stenlid, A. Wiebenga, X. Xie, U. Kues, D.S. Hobbett, D. Hoffmeister, N. Hogberg, F. Martin, I.V. Grigoriev, S.C. Watkinson, The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi, *Science* 333 (2011) 762–765.
- [40] B. Cresnar, S. Petric, Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom, *Biochim. Biophys. Acta* 1814 (2011) 29–35.
- [41] A. El-Shazly, K. Masuyama, K. Nakano, M. Eura, Y. Samejima, T. Ishikawa, Human eotaxin induces eosinophil-derived neurotoxin release from normal human eosinophils, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117 (Suppl. 1) (1998) 55–58.
- [42] J. MacDonald, M. Doering, T. Canam, Y. Gong, D.S. Guttman, M.M. Campbell, E.R. Master, Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* during growth on coniferous and deciduous wood, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 3211–3218.
- [43] A. Thuillier, A.A. Ngadin, C. Thion, P. Billard, J.P. Jacquot, E. Gelhaye, M. Morel, Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class, *Int. J. Evol. Biol.* 2011 (2011) 938308.

Supplemental Table 1 : Primers used in this study.

The NcoI and BamHI cloning restriction sites are underlined in the primers.

Name	Sequence written 5' to 3'
GSTO4 for	<u>CCCATGG</u> CTTCTGTCCCTGACGTC
GSTO4 rev	CCCGAT <u>CC</u> TCAGGGAATTGCACGTCC
GSTO4_ C37S for	ACTCGGGCTGGTTCTCCCCCTACGTCCAGAGG
GSTO4_ C37S rev	CTCTGGACGTAGGGGGAGAACCAGCCCGAGTA
GSTO7 for	<u>CCCATGG</u> CTCAGAAAGAACAGATC
GSTO7 rev	CCCGAT <u>CC</u> CTACTCGCGCTTGAACAT
GSTO7_ S15A for	TACACCCACTTCTATGCTCCCTACTGCGACAGG
GSTO7_ S15A rev	CCTGTCGCAGTAGGGAGCATAGAAGTGGGTGTA
GSTO7_ S15C for	TACACCCACTTCTATTGTCCCTACTGCGACAGG
GSTO7_ S15C rev	CCTGTCGCAGTAGGGACAATAGAAGTGGGTGTA
GSTO7_ C91S for	CCTCGCCAGAGTCCTCCAAGCTCCGCGAGTCG
GSTO7_ C91S rev	GA ^{CTCGCGGAGCTTGGAGG} ACTCTGGCGAGGG
GSTO7_ C18S for	TCTATTCTCCCTACTCCGACAGGGTCCACCTG
GSTO7_ C18S rev	AGGTGGACCCTGTCGGAGTAGGGAGAATAGAA

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ces trois années de thèse s'inscrivent dans un cadre de recherche visant à caractériser les relations structure-fonction de protéines fongiques appartenant à la superfamille des glutathion transférases, ainsi qu'à comprendre leurs rôles au sein du métabolisme général des organismes. À ce titre, ce projet questionne le processus fondamental de l'évolution adaptative et combine de façon complémentaire des approches évolutives et fonctionnelles. Une étude, menée préalablement à mon arrivée, avait identifié et recensé l'ensemble des GST présentes chez *P. chrysosporium*, modèle d'étude fongique capable de métaboliser le bois. Considérant la surreprésentation des GST au sein des organismes saprophytes et leur diversité de substrats, l'étude approfondie de ces enzymes a mis en évidence une variabilité tant d'un point de vue phylogénétique que fonctionnel. Leurs implications au sein du métabolisme général de protection cellulaire sont discutées dans cette partie.

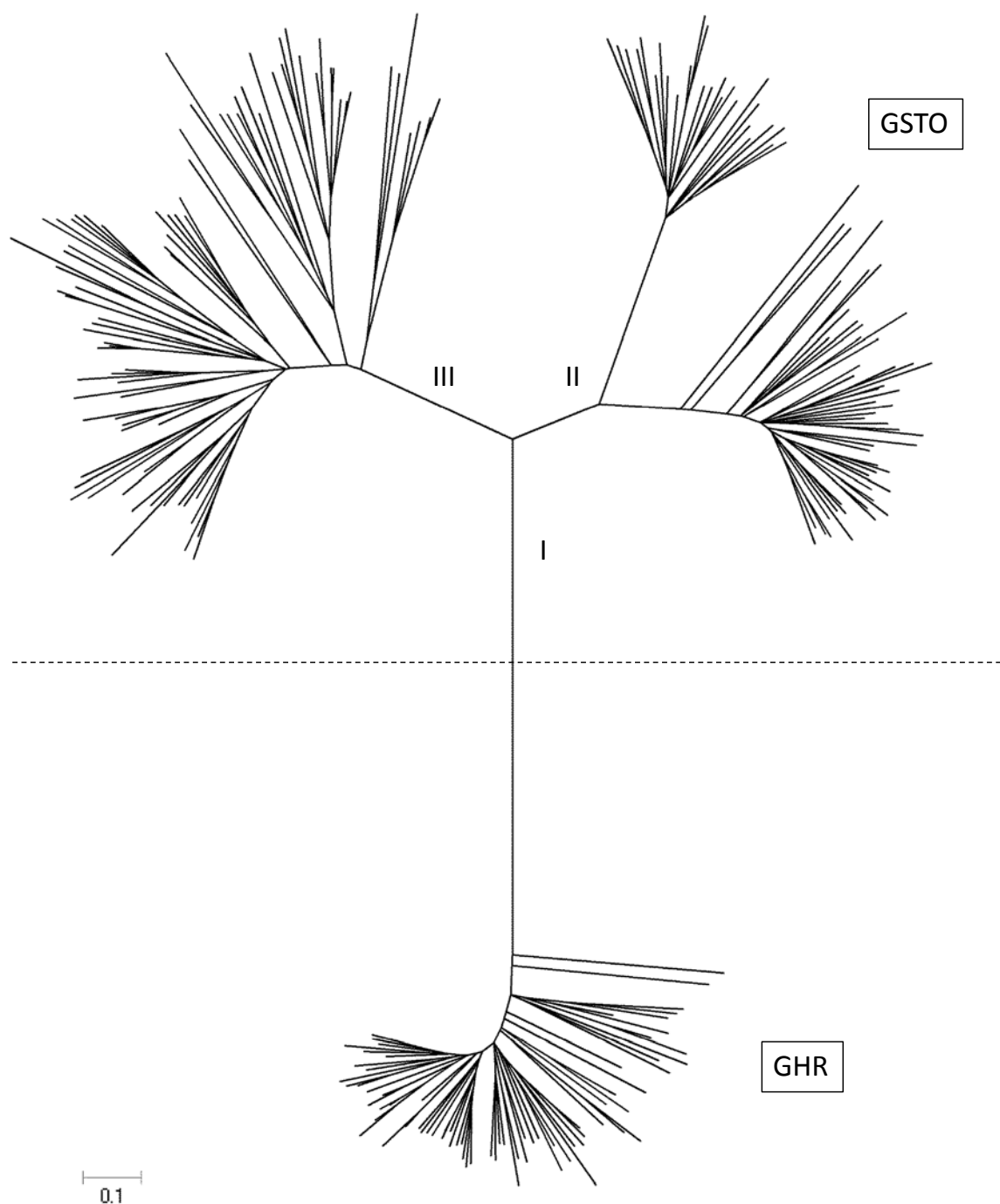


Figure 23. Arbre phylogénétique non enraciné des glutathion transférases à cystéine catalytique présentes chez les basidiomycètes

*L'analyse de 44 génomes de basidiomycètes a permis d'identifier et de recenser environ 250 isoformes de GST à cystéine catalytique. Sur la base de leur séquence primaire, ces GST se regroupent spontanément en deux classes appelées glutathionyl hydroquinone réductase (GHR) et Oméga (GSTO), elle-même divisée en deux groupes. Les GHR sont des orthologues des GST à cystéine catalytique présentes chez les bactéries (*EcYqjg*, *SpPcpF*) ou la levure (*ScGSTO*) alors que les GSTO correspondent aux enzymes présentes et décrites chez les mammifères ou encore les insectes. Les séquences ont été identifiées puis collectées à partir des génomes disponibles (www.jgi.doe.gov/), alignées par ClustalW et l'arbre a été réalisé d'après la méthode neighbor-joining.*

1. Caractéristiques phylogéniques, mécanistiques et structurales des GST à cystéine catalytique de *Phanerochaete chrysosporium*

1.1 Prévalence des GST à cystéine catalytique chez les basidiomycètes et mise en évidence d'une nouvelle classe fongique

Conservant l'acide aminé catalytique de l'ancêtre thiorédoxine, ces enzymes représentent les classes de GST ayant divergé le plus tôt. Les GST à cystéine catalytique sont répandues dans plusieurs règnes et embranchements (Oméga (O) chez les mammifères, les champignons et les insectes; glutathionyl hydroquinone réductase (GHR) chez les champignons, les bactéries et les plantes; Lamda (L) et DHAR chez les plantes). La présence d'une cystéine catalytique modifie radicalement les profils de réactivité de ces enzymes par rapport aux autres classes de GST. En effet, elles ne catalysent pas de réactions de conjugaison classiques, mais utilisent le glutathion comme cofacteur lors de réactions de déglutathionylation. Ce groupe de GST spécifiques est représenté au sein des différents types trophiques (symbiotique, saprophyte ou pathogène) présents au sein du règne fongique. Toutefois la surreprésentation de ces enzymes chez les champignons capables de dégrader les principaux composants du bois suggèrent une évolution influencée par l'adaptation du champignon à la dégradation du matériel végétal (Vanden Wymelenberg et al. 2009; Vanden Wymelenberg et al. 2010; MacDonald et al. 2011; Vanden Wymelenberg et al. 2011).

D'après les études phylogénétiques réalisées au cours de ces travaux, l'ensemble des GST à cystéine catalytique présentes chez les basidiomycètes forment trois grandes classes (Figure 23). Deux sont en relation avec les enzymes composant la classe Oméga, présente chez les mammifères et les insectes (II et III), tandis que la troisième est étroitement liée aux enzymes bactériennes EcYqjg et ScPcpF composant la famille nouvellement identifiée des GHR (I). Les GHR fongiques étaient à la base décrites comme appartenant à la classe Oméga lorsque nous avons commencé cette étude. D'une manière générale, le nombre d'isoformes de GHR varie très peu selon les espèces de champignon étudiées (de 1 à 4), et ces enzymes sont présentes dans la grande majorité des organismes, à l'exception de deux champignons pathogènes (*Puccinia graminis* et *Malassezia globosa*). A l'inverse la classe Oméga, également très peu représentée au sein des espèces pathogènes peut atteindre jusqu'à 11 isoformes chez certains organismes

capables de dégrader la lignine (Figure 24). Le nombre limité d'isoformes appartenant aux GHR, et leur conservation au sein des différents types trophiques suggèrent que cette famille d'enzymes est probablement essentielle à la vie du champignon. A l'inverse, selon les différents modes de vie ou conditions environnementales, une spécialisation avec un gain ou une perte de fonction a été observée dans le groupe des Oméga.

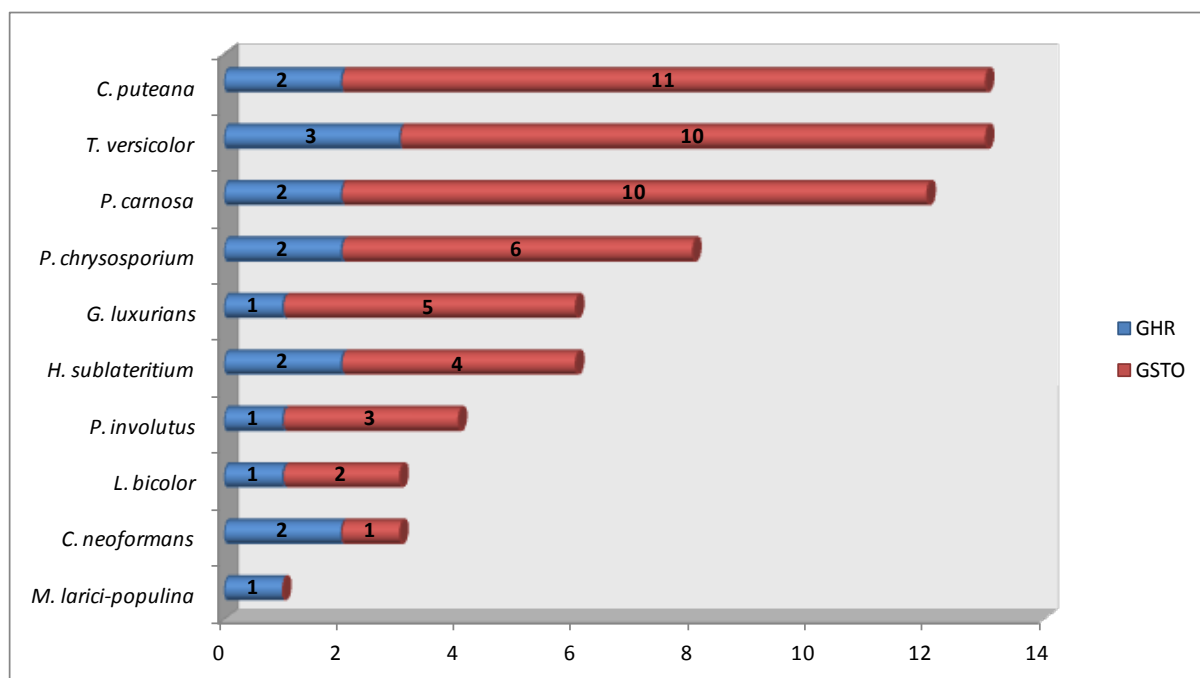


Figure 24. Représentation du nombre d'isoformes de chaque classe de GST à cystéine catalytique présentes au sein de certains basidiomycètes

La répartition au sein des différentes classes a été réalisée par l'identification des séquences au sein des génomes de basidiomycètes (*Coniophora puteana*, *Cryptococcus neoformans*, *Gymnopus luxurians*, *Hypholoma sublateralitium*, *Laccaria bicolor*, *Melampsora larici-populina*, *Phanerochate carnosa*, *Phanerochate chrysosporium*, *Paxillus involutus*, *Trametes versicolor*), couplée à des analyses phylogénétiques.

Ces travaux de génomique comparative ont constitué une première étape essentielle dans la caractérisation des GST à cystéine catalytique fongiques. L'identification et la comparaison des séquences a en effet permis dans un premier temps de mettre en évidence les différents groupes présents chez les basidiomycètes, puis dans un second temps de sélectionner les isoformes chez *P. chrysosporium* pouvant présenter un intérêt particulier du fait de leur conservation dans l'ensemble des basidiomycètes étudiés. De plus, ces travaux permettront à

l'avenir de sélectionner d'autres enzymes présentant des caractéristiques ou des distributions atypiques, pouvant révéler ainsi les spécificités de ces protéines dans les différents modes de vie.

1.2 Propriétés mécanistiques et structurales des GST à cystéine catalytique de *Phanerochaete chrysosporium*

Une des principales caractéristiques commune aux enzymes composant ces classes est la présence d'une cystéine exposée au sein d'un motif conservé CPWA[T/H/Q]R pour les GHR, et CP[Y/F][V/A][Q/H]R pour les Oméga, qui conditionne le type d'activité catalysée par ces enzymes. A la différence des GST dites classiques qui exhibent un acide aminé hydroxylé (sérine, tyrosine) en cette même position, les GST à cystéine catalysent des réactions de déglutathionylation au cours desquelles l'anion thiolate réalise une attaque nucléophile sur un atome de soufre engagé dans une liaison carbone-soufre. Un travail de mutagenèse dirigée comparant la réactivité des protéines sauvages (Cys) et mutantes (Ala/Ser) a permis de prouver que la présence d'une alanine induit une perte totale d'activité. En revanche la présence d'une sérine en lieu et place de la cystéine catalytique chez les GSTO induit un changement du profil réactionnel de ces enzymes. Inactives vis-à-vis de leurs substrats 'naturels' ces protéines mutées catalysent en revanche le transfert de glutathion sur des substrats classiques tels que le CDNB ou encore l'ITC à l'instar des classes de GST ayant divergé plus tard. Ces résultats prouvent que cette position au sein des séquences primaires des GST détermine le profil réactionnel de ces enzymes. Avec une valeur de pK_a légèrement inférieure à 7, la cystéine réactive est majoritairement sous forme déprotonée à pH physiologique (83 %), et peut ainsi réaliser une attaque nucléophile sur le substrat glutathionylé, ce qui constitue la première étape de la réaction. Cette étape aboutit à la libération du substrat et de la protéine en liaison covalente avec une molécule de glutathion, qui sera libérée sous forme de glutathion disulfure après l'attaque d'une deuxième molécule de glutathion. Au cours de ce mécanisme commun aux GHR et aux Oméga, le glutathion sert donc de cofacteur, et il est nécessaire au recyclage de la cystéine catalytique. Les différentes études concernant le mécanisme réactionnel de ces enzymes a révélé que d'autres composés chimiques ont la capacité de régénérer la cystéine au cours de cette deuxième étape (dithiothréitol, borohydrure de sodium). L'exposition au solvant du site actif permet en effet l'accès à différents types de réducteurs chimiques et protéiques (résultats non publiés).

L'abaissement du pK_a de la cystéine réactive est un phénomène courant au sein des enzymes à motif thiorédoxine. Il permet entre autre l'ionisation du groupement sulfhydryle chez les glutarédoxines, les thiorédoxines, les thiol-peroxydases ou encore les disulfure isomérases. Cependant, cette valeur déterminante dans la capacité des cystéines à effectuer des attaques nucléophiles varie en fonction des familles de protéines considérées. Dans le cas des GST, le pK_a est légèrement supérieur à celui des thiol-peroxydases ou encore des thiorédoxines (entre 5.2 et 6.3), mais bien supérieur à celui des glutarédoxines pouvant atteindre des valeurs inférieures à 3 (Srinivasan et al. 1997). Une étude récente portant sur les thiol-peroxydases démontre que l'acidité apparente de la cystéine réactive n'est pas le seul facteur influençant l'efficacité catalytique de ces enzymes. Le pK_a est bien sûr déterminant pour la réactivité des enzymes, mais l'environnement protéique influe également sur la catalyse, notamment via l'établissement d'interactions de charges, de liaisons hydrogène, ou encore via également l'exclusion du solvant ou la formation d'un état de transition (Ferrer-Sueta et al. 2011).

1.2.1 Adaptation du modèle de Frova

Dans le cadre des études structure-fonction réalisées sur ces deux classes d'enzymes, des divergences entre GSTO et GHR ont été mises en évidence tant d'un point de vue structural que du point de vue de la spécificité de substrats qu'elles déglutathionylent. Les comparaisons entre la structure de PcGHR1 et les structures des GST Oméga disponibles dans la littérature, révèlent des différences fondamentales concernant les modes de repliement de ces deux classes d'enzymes (Figure 25). Notamment la présence d'une extension N-terminale qui recouvre le site actif des GHR et qui est certainement impliquée dans la reconnaissance du glutathion. Cependant le point le plus remarquable concerne la présence d'une boucle en aval de la neuvième hélice alpha induisant un mode de dimérisation atypique.

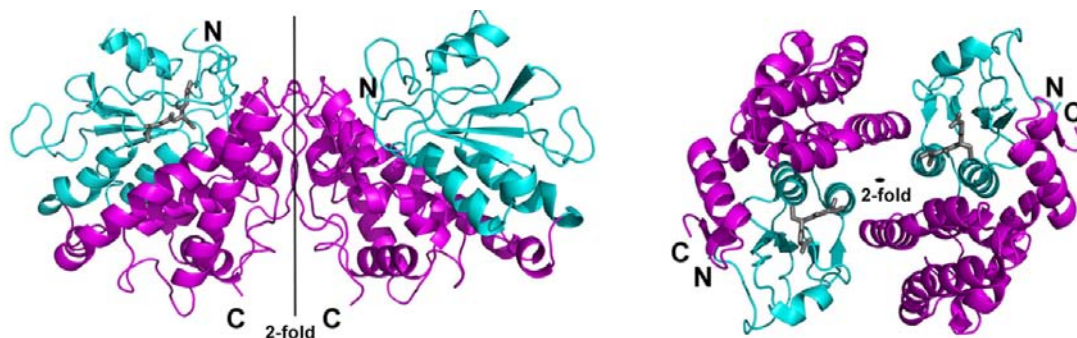


Figure 25. Représentations schématiques de différentes structures de GST à cystéine catalytique appartenant aux classes GHR à gauche (PcGHR1), et Oméga à droite (HsGSTO1) (Meux et al. 2010)

Ces signatures structurales spécifiques des GHR, qui ont depuis été confirmées avec l'obtention de structures de GHR bactériennes (Green et al. 2012), nous invitent à reconsidérer l'évolution des GST cytosoliques. En effet, les GHR présentes aujourd'hui chez les bactéries, les champignons ou encore les plantes (résultats non publiés) auraient divergé de la voie classique d'évolution des GST avant l'étape de dimérisation ayant conduit à l'émergence des classes Oméga, Bêta, Thêta, Zêta, Phi, Tau, Delta, Sigma, Mu ou encore Pi. L'hypothèse la plus probable implique une succession de réarrangements chromosomiques (duplication, translocation, mutation) au cours de l'évolution conduisant à l'émergence des ancêtres des GHR, suivis par une étape de dimérisation aboutissant à la forme actuelle des GHR (Figure 26). Etant donné qu'aucune forme monomérique de GHR n'a encore été caractérisée, il est pour le moment impossible de prédire si l'étape de dimérisation a eu lieu au cours de l'évolution des GHR ou si elle est antérieure à l'émergence de cette famille. Néanmoins, la localisation chromosomique en tandem des gènes codant les GHR chez les basidiomycètes, et considérant l'homologie élevée entre les différentes isoformes fongiques, la présence en multicopies des GHR chez certains organismes serait alors le résultat d'événements de duplication récents. L'émergence d'une voie évolutive parallèle à celle des GST cytosoliques pourrait donc conduire à l'apparition des GHR sous leur forme actuelle.

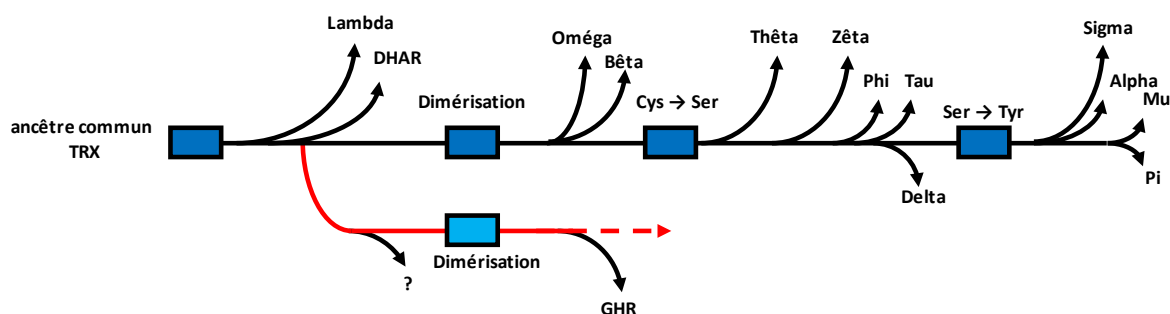


Figure 26. Evolution des GST cytosoliques (adaptation du modèle de Frova)

1.2.2 Relation structure-fonction et émergence d'une nouvelle fonction

Les propriétés structurales particulières des GHR en comparaison des autres GST à cystéine catalytique semblent être à l'origine de caractéristiques fonctionnelles tout à fait atypiques. En effet, l'une des informations principales apportées par ce travail concerne l'activité

des GHR et notamment le type de substrat qu'elles déglutathionylent. Contrairement aux autres GST à cystéine catalytique, ces enzymes ont la capacité de déglutathionyler des dérivés d'hydroquinones comportant différentes substitutions chlorées, méthyliques ou encore aromatiques. Ces propriétés fonctionnelles vis-à-vis des quinones sont à l'heure actuelle exclusives aux GHR, laissant supposer qu'elles sont la conséquence des caractéristiques structurales tout à fait originales de ces enzymes. Les comparaisons réalisées avec les sites H d'autres GST montrent en effet que ce dernier, plus profond chez les GHR, est compatible avec la géométrie plane des quinones. Ces résultats confirmeraient que le mode de dimérisation particulier des GHR, régissant la géométrie du site H, permet la reconnaissance des quinones, et dans le même temps, est à l'origine de l'émergence d'une nouvelle fonction. Cependant, la description récente d'une GHR bactérienne co-cristallisée avec une molécule de S-(glutathionyl)-ménadione (GS-ménadione) n'a pas permis d'identifier des interactions spécifiques entre la partie 'quinone' du substrat et le site actif de l'enzyme. Il a par ailleurs été suggéré que la reconnaissance et la fixation des GS-hydroquinones au sein du site actif des GHR serait essentiellement due aux interactions avec la partie glutathion de la molécule. Ces interactions se manifestent notamment par des liaisons hydrogène établies avec les chaînes principale et latérale du glutathion. La reconnaissance labile du groupement quinone serait alors uniquement le résultat de sa simple compatibilité stérique avec le site H des GHR. En d'autres termes la taille du site actif et l'absence d'interaction spécifique avec le squelette quinone permettent aux GHR d'accepter un large spectre de dérivés présentant différentes substitutions (Green et al. 2012).

Une hypothèse de travail stipulant que la spécificité des GHR vis-à-vis des quinones est en réalité basée sur la géométrie et la réactivité liées à la présence d'un cycle aromatique est en accord avec le concept de reconnaissance labile ou stérique. En effet, les liaisons carbone-soufre des substrats GS-quinone des GHR sont en configuration *sp*², à la différence des substrats identifiés pour les autres classes de GST à cystéine catalytique (tetralone, acétophénone, hydroxypropiovanillone) dont les liaisons avec le glutathion sont *sp*³. De plus, de récentes études portant sur les GST Lambda d'*A. thaliana* qui sont les plus proches orthologues des Oméga de champignons chez les plantes, ont mis en évidence un nouveau substrat (quercétine) en configuration *sp*³ avec le glutathion. Néanmoins, la description récente d'une GHR bactérienne capable de réagir avec les molécules GS-acétophénone (*sp*³) et GS-hydroquinone (*sp*²) vient nuancer cette théorie. Bien que ces données prouvent que la présence d'un cycle aromatique ne soit pas l'élément déterminant pour la catalyse enzymatique des GHR, ils

n'apportent néanmoins aucune explication supplémentaire quant aux interactions potentielles avec les noyaux quinone pouvant expliquer la spécificité des GHR vis-à-vis de ces composés.

Cependant d'autres résultats obtenus mettent en avant quelques points de désaccord avec le concept de reconnaissance labile des quinones :

(i) Tout d'abord l'obtention de paramètres catalytiques différents entre les formes oxydée et réduite du substrat suggère la mise en place d'interactions spécifiques entre le site actif et le noyau quinone (Article 3). En effet, de part leur réactivité, les quinones peuvent s'oxyder spontanément en présence d'oxygène passant ainsi de la forme hydroquinone (réduite) à la forme benzoquinone (oxydée). Cette réaction étant réversible, il est alors possible de comparer les paramètres catalytiques des GHR recombinantes vis-à-vis de ces deux formes de quinones glutathionylées. Bien qu'il n'y ait aucune différence significative entre les turnovers obtenus avec les formes réduite et oxydée de la S-(glutathionyl)-ménadione, l'affinité des GHR pour la forme réduite semble 1000 fois supérieure. Des résultats similaires ont été générés avec une enzyme fongique (PcGHR1) et une enzyme bactérienne (EcYqjg). Cette différence ne peut s'expliquer que par la présence d'interactions mises en place entre le site actif de ces enzymes et les motifs hydroxylés du noyau hydroquinone qui favoriseraient ainsi la fixation du substrat et la catalyse enzymatique.

(ii) L'absence d'activité des GHR vis-à-vis de la S-(glutathionyl)-tetralone constitue un autre argument allant à l'encontre de l'absence d'interaction des GHR avec le motif quinone (Article 5). En effet le criblage de molécules interagissant avec le site des GST à cystéine catalytique a permis de mettre en évidence un nouveau substrat déglutathionylable par les GSTO. D'un point de vue chimique, l'absence d'une double liaison engagée avec un atome d'oxygène en para de la GS-tetralone constitue la principale différence avec la GS-ménadione. En dépit d'une activité des GSTO vis-à-vis de ce substrat, les GHR semblent incapables de catalyser cette même réaction. Ces résultats démontrent que la présence d'un motif quinone est indispensable à l'activité des GHR, laissant penser que des interactions spécifiques sont mises en jeu au niveau des deux atomes d'oxygène du motif quinone.

Bien que tous les intervenants impliqués dans la reconnaissance et la déglutathionylation des quinones ne soient à l'heure actuelle pas définis, la fonction exclusive des GHR semble être due à leurs caractéristiques structurales. Par exemple, la présence d'une triade de tyrosines au

sein du site actif est d'un intérêt particulier. Tout d'abord, à l'inverse des autres classes de GST, ces acides aminés sont conservés chez une très large majorité de GHR, et ce quel que soit le règne dont elles sont issues. De plus, leurs chaînes latérales pointent en direction du site actif des GHR et forment un réseau d'interactions hydrogène à une distance compatible avec le substrat (Green et al. 2012). Considérant donc que cette triade joue un rôle au sein du mécanisme réactionnel, leur lien structural avec l'interface dimérique confirme que le repliement particulier des GHR est à l'origine de l'émergence de leur fonction atypique. Parallèlement, la modélisation de substrat (GS-hydroquinone) au sein du site actif de PcGHR1 a permis de mettre en évidence la présence de deux résidus histidine dont l'orientation des chaînes latérales rend possible l'établissement d'interactions électrochimiques avec les atomes d'oxygène du noyau quinone. Conservées uniquement au sein des séquences primaires des GHR, ces histidines pourraient jouer un rôle dans la catalyse enzymatique, notamment en jouant le rôle d'acide/base impliqués au sein d'une étape de tautomérisation facilitant l'attaque nucléophile de la cystéine catalytique (Reddy and Gold 2001; Kiefer and Copley 2002; Kiefer et al. 2002).

Afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, il convient d'envisager un travail de mutagenèse dirigée sur les différents acides aminés conservés dans le but de :

(i) Substituer sélectivement chaque tyrosine en phénylalanine afin de déterminer l'importance du groupement hydroxyle sur l'efficacité catalytique des enzymes recombinantes.

(ii) Substituer les histidines conservées par un acide aminé biochimiquement différent (aliphatique) et incapable de jouer le rôle d'acide/base au cours du mécanisme réactionnel.

(iii) Substituer la cystéine réactive de PcGHR1, puis faire diffuser différentes GS-hydroquinones au sein des cristaux afin de 'piéger' le substrat au sein du site actif et ainsi identifier le plus d'interactants protéiques possibles.

2. Fonctions associées aux GST à cystéine catalytique dans la protection cellulaire

2.1 Glutathionylation et toxicité

Les organismes doivent faire face à un grand nombre de composés chimiques électrophiles toxiques d'origine endogène ou exogène, qui sont transformés *in vivo* en intermédiaires réactifs en vue de leur élimination/dégradation. La réactivité de ces molécules est souvent à l'origine de perturbations au sein de la cellule. Par ailleurs, l'accumulation des intermédiaires de dégradation, tels que, les radicaux, les réactifs électrophiles, ou encore les espèces réactives de l'oxygène est néfaste pour la cellule, notamment en interagissant avec les macromolécules biologiques. Au sein des cellules, le glutathion fait partie d'un mécanisme naturel de défense visant à éliminer ces métabolites électrophiles. Présent en grande quantité au sein des organismes, il est impliqué directement ou indirectement dans de nombreux processus biologiques et notamment dans la détoxification des espèces réactives, des métaux, et d'autres composés toxiques. Au cours d'un de ces mécanismes de détoxification, le glutathion est lié aux composés électrophiles de manière covalente, et cette étape de glutathionylation permet (i) de réguler la réactivité de ces composés vis-à-vis notamment des macromolécules biologiques, (ii) d'augmenter leur solubilité facilitant ainsi leur transport et leur excrétion, et (iii) dans certains cas de réguler les voies métaboliques. Il est à présent établi que la formation spontanée et/ou enzymatique de composés glutathionylés joue un rôle central dans la détoxification cellulaire. Le glutathion est le thiol libre le plus répandu au sein des organismes (Dickinson and Forman, 2002), et la présence de molécules réactives au sein des cellules lors d'un stress peut conduire à la formation d'un grand nombre de composés glutathionylés. De part la réactivité du glutathion, la formation de ces conjugués peut se faire spontanément, ou enzymatiquement grâce aux glutathion transférases. Cependant, ce processus clé dans la détoxification peut également se révéler néfaste pour l'organisme. Il est en effet admis que le métabolisme/catabolisme de certains composés halogénés aboutit à la formation de conjugués glutathionylés toxiques (Monks and Lau 1997; Monks and Lau 1998; Dekant 2001; Cooper et al. 2002; Sakurai et al. 2002; Dekant 2003; Sakurai et al. 2004). Les agents halogénés sont des xénobiotiques, c'est-à-dire des substances étrangères aux organismes. À ce titre, tout composé halogéné peut potentiellement être à l'origine d'une réaction toxique. L'accumulation de ces conjugués peut être à l'origine de perturbations et divers dérèglements cellulaires. Une

régulation fine au niveau de ces conjugués glutathionylés est donc nécessaire afin de limiter leur solubilité, leur transport, leur toxicité, et permettre leur retour dans les voies métaboliques/cataboliques. En adéquation avec de récentes études (Reddy and Gold 2001; Board and Anders 2007; Huang et al. 2008; Belchik and Xun 2011; Green et al. 2012; Lam et al. 2012), les travaux réalisés au cours de cette thèse permettent d'envisager de nouvelles perspectives quant à la fonction intracellulaire des GST à cystéine catalytique, en relation avec la protection cellulaire vis-à-vis de molécules réactives toxiques, notamment via la réduction de composés glutathionylés.

2.2 Promiscuité des GST à cystéine catalytique, déglutathionylation et protection cellulaire

Les caractérisations biochimiques et structurales des différentes isoformes réalisées au cours de cette thèse mettent en évidence des phénomènes de promiscuité entre différentes classes de GST. En effet, malgré les spécificités de substrat propres à chaque classe, la grande majorité des GST à cystéine catalytique catalysent des réactions de déglutathionylation sur une grande variété de substrats chimiquement différents, et ce malgré la forte variabilité de ces familles d'enzymes tant d'un point de vue génomique que d'un point de vue structural (Figure 27). La variabilité catalytique des GST mène ainsi au concept de promiscuité, important dans l'évolution des familles de protéines (Khersonsky et al. 2006; Whitham et al. 2006; Babbitt et al. 2010). La promiscuité de substrat est définie pour des enzymes présentant une même fonction sur une large spécificité de substrat. Ainsi via leur capacité à déglutathionyler divers types de composés chimiquement différents (HED, hydroquinones, acétophénone, quercétine, etc.), la superfamille des GST à cystéine catalytique illustre le phénomène de promiscuité de substrat. Une autre famille de GST (Ure2p) possède des substrats communs avec certaines classes de GST à cystéine catalytique. Cependant le mécanisme réactionnel atypique des Ure2p ne fait pas intervenir de résidu cystéinyle, on parle alors de promiscuité catalytique ou fonctionnelle. En effet, certaines Ure2p de classe B ont la capacité de déglutathionyler aussi bien des molécules de faible poids moléculaire (GS-acétophénone) que des protéines entières (résultats non publiés). De plus, elles peuvent agir sur des substrats structuralement distincts (CDNB) et catalyser deux réactions chimiques différentes (Thuillier et al. 2011).

Bien que présentes au sein des bactéries, des champignons et des plantes (résultats non publiés), et en dépit de récentes caractérisations biochimiques et structurales, le rôle physiologique des GHR n'est pas encore élucidé. Cependant, il est plausible que via leur capacité à déglutathionyler une grande variété d'hydroquinones, ces enzymes jouent un rôle central au sein du cycle redox cellulaire. En effet, issus du métabolisme du benzène et des dérivés phénoliques, les hydroquinones représentent un groupe de molécules chimiques très réactives vis-à-vis des macromolécules biologiques, et toxiques pour les organismes (Gonzalez 1945; Ross 1996; Joseph and Jaiswal 1998; Joseph et al. 1998; Lan et al. 2004). L'hydroquinone peut passer au travers des membranes cellulaires et cytoplasmiques en raison de sa structure aromatique et de sa solubilité dans les solvants polaires et non polaires (Vollhardt 1999).

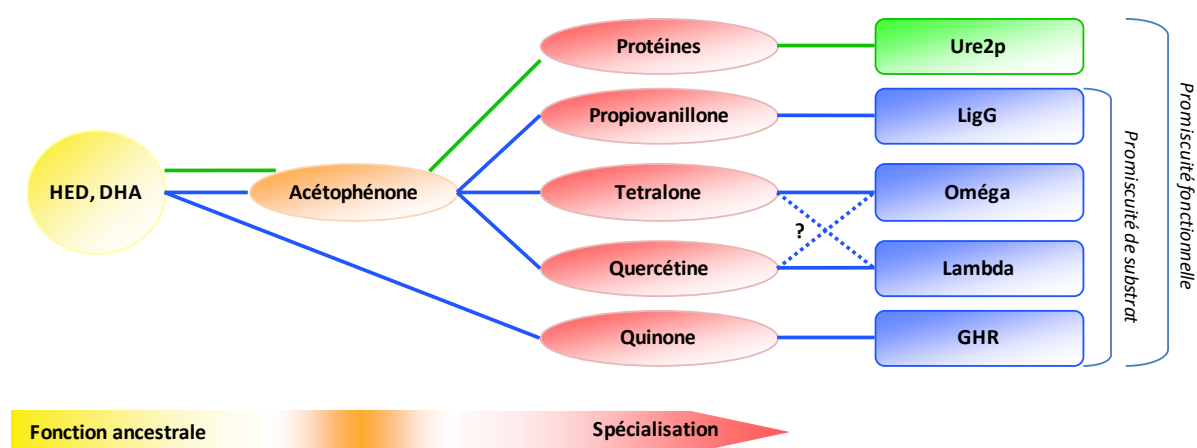


Figure 27. Spécialisation de la fonction de déglutathionylation et promiscuité des GST

Provoquant notamment des mutations chez *Drosophila melanogaster* (Munoz and Barnett 2000) ou perturbant la croissance d'*Euphorbia esula* (Barkosky et al. 1999), l'hydroquinone est également utilisée comme agent de défense chimique par le scarabée *Brachinus fumans* (Dean et al. 1990). Ces molécules présentes dans l'environnement sont notamment issues de la dégradation de composés aromatiques tels que la lignine, le benzène ou encore le naphtalène, qui représente l'hydrocarbure aromatique polycyclique le plus abondant dans l'atmosphère (Zheng et al. 1997; Preuss et al. 2003; Lu and Zhu 2007; Ortiz-Bermudez et al. 2007; Kautzman et al. 2010). Ces composés sont très réactifs et les échanges d'électrons entre les formes benzoquinone et hydroquinone au sein de leur cycle redox sont à l'origine de la génération d'espèces oxygénées réactives (Buffinton et al. 1989; O'Brien 1991;

Monks et al. 1992; Jarabak and Jarabak 1995). Il a également été prouvé que l'hydroquinone pouvait interférer avec l'ubiquinone mitochondriale et provoquer une incidence sur le transport des électrons et la respiration cellulaire (Magiri et al. 1995). Les quinones sont de bons accepteurs et peuvent former spontanément des adduits covalents avec des molécules nucléophiles comme le glutathion (Coles et al. 1988; Hill et al. 1993; Bolton et al. 2000). Ainsi, au cours du métabolisme de différents dérivés benzéniques et phénoliques, l'accumulation de GS-hydroquinones peut se produire (Wefers and Sies 1983), et ainsi entraîner un appauvrissement en glutathion intracellulaire (Bolton et al. 2000). Par ailleurs, l'accumulation de GS-hydroquinones, plus facilement oxydables que les formes non glutathionylées, entraîne une augmentation du taux d'espèces oxygénées réactives préjudiciable pour la cellule (Monks et al. 1985; Brunmark and Cadenas 1988). D'une manière générale, la formation spontanée ou enzymatique de conjugués glutathionylés induit une augmentation de la cytotoxicité des quinones (Dekant 2001).

La comparaison des paramètres catalytiques obtenus avec différents substrats, met en évidence une spécificité des GSTO vis-à-vis des dérivés GS-acétophénone. En effet, la déglutathionylation de ces composés par les GSTO fongiques est environ 50 fois plus efficace que la réduction du DHA ou du HED. Il est par ailleurs possible d'étendre ce constat chez les isoformes présentes chez les mammifères (Board et al. 2008), laissant supposer un rôle physiologique des GSTO au sein du métabolisme des acétophénones. Présents au sein de l'environnement, les dérivés cétoniques halogénés sont des molécules toxiques, notamment utilisées comme insecticides (Crawford et al. 1976; Ballantyne and Swanston 1978). Chimiquement actives au niveau des cellules, ces molécules peuvent réagir spontanément avec les molécules soufrées, entraînant la formation des intermédiaires S-(glutathionyl)-phénylacétophénone (Hutson et al. 1976; Akhtar 1979; Brundin et al. 1982). Il a d'ailleurs été prouvé que suite à une forte exposition en acétophénones halogénées, la présence en grande quantité au sein des cellules de ces dérivés induit une déplétion de la concentration intracellulaire en glutathion (Summer et al. 1996). Ainsi, via leur activité spécifique, les GSTO vont permettre de libérer le glutathion et de réincorporer le dérivé acétophénone au sein des voies métaboliques. Par ailleurs, les GST Oméga étant présentes dans de nombreux règnes, et notamment chez les mammifères, différents rôles physiologiques leur ont été alloués. Leur capacité à réduire l'arseniate monométhyle, bien que moins efficace par rapport à la réduction des GS-phénylacétophénones, suggérerait que ces enzymes jouent un rôle dans la biotransformation de l'arsenic par la voie de méthylation (Zakharyan et al. 2001; Marnell et al.

2003; Schmuck et al. 2005; Paiva et al. 2010). La biotransformation de l'arsenic est d'un intérêt considérable en santé humaine puisqu'il est à l'origine de nombreuses pathologies et de la contamination de l'eau potable dans plusieurs régions du monde (Zakharyan and Aposhian 1999; Berenson and Yeh 2006; Tallman et al. 2007). Cependant, d'autres travaux chez des mammifères soumis à des niveaux élevés d'exposition à l'arsenic (Paiva et al. 2008; Schmuck et al. 2008), et des expériences sur des souris GSTO1 knock-out (Chowdhury et al. 2006), amènent à nuancer un potentiel rôle de premier plan pour les GSTO dans la biotransformation de l'arsenic.

2.3 Pertinence biologique

Le groupement sulfhydryle du glutathion est très réactif vis-à-vis d'un grand nombre de molécules présentes au sein de la cellule et il peut former des conjugués avec de multiples composés tels que les électrophiles, les métaux, les peroxydes, ou encore les produits de dégradation des lipides peroxydés. Il est également impliqué dans la régénération de molécules antioxydantes comme l'ascorbate. Beaucoup de conjugués générés sont toxiques pour la cellule et entraînent une cascade de réactions secondaires aboutissant à des dommages irrémediables pour la cellule (Wang and Ballatori 1998; Dekant 2001). La conjugaison de glutathion sur des dérivés d'alcanes et d'alcènes halogénés est à l'origine de molécules capables d'endommager les macromolécules biologiques, via notamment des réactions d'acylation. Par exemple la formation d'un composé glutathionylé à partir du dibromométhane, notamment présent dans les carburants, aboutit à la formation d'un composé très réactif et cancérigène. D'autres réactions spontanées entre le glutathion et des dérivés d'aminophénol ou d'isothiocyanate sont également à l'origine d'intermédiaires toxiques pour les cellules (Dekant 2001). Dans le cadre d'une étude portant sur la sensibilité de *S. chlorophenolicum* vis-à-vis d'une molécule toxique (le pentachlorophénol), les auteurs ont mis en évidence le rôle d'une GHR au sein du métabolisme de ce composé toxique (Huang et al. 2008). Au cours de la dégradation du pentachlorophénol chez cette bactérie, certains intermédiaires hydroquinones peuvent être spontanément et/ou enzymatiquement glutathionylés. Au cœur de la voie de détoxification du pentachlorophénol, PcpF est une GHR capable de déglutathionyler ces intermédiaires GS-hydroquinone. Or, l'interruption du gène codant pour PcpF induit une perte de résistance de la bactérie vis-à-vis du pentachlorophénol (Huang et al. 2008). Par conséquent, l'accumulation de GS-hydroquinones est préjudiciable à cet organisme. Les résultats obtenus chez *S. chlorophenolicum* sont

probablement transposables à d'autres organismes. Par exemple, l'orthologue de PcpF chez *E. coli* (Yqjg) est présent au sein d'un opéron de 3 kb composé de huit gènes. Bien que les fonctions de ces gènes n'aient pas été étudiées, certains ont été identifiés en tant que quinone hydrolases (Keseler et al. 2005; Riley et al. 2006). Biochimiquement, Yqjg catalyse *in vitro* la déglutathionylation de GS-hydroquinones (Xun et al. 2010; Lam et al. 2012). Par ailleurs, bien que la fonction physiologique de Yqjg soit à l'heure actuelle inconnue (Baba et al. 2006; Zaslaver et al. 2006), son promoteur est régulé positivement en présence de tetrachloro-1,4-benzoquinone au sein du milieu de culture (résultats non publiés). L'ensemble de ces données suggèrent fortement que les GHR sont impliquées dans les mécanismes de dégradation des quinones halogénées. La capacité à dégrader des molécules aromatiques halogénées telles que le pentachlorophénol a également été décrite chez les basidiomycètes (Bumpus and Aust 1987; Mileski et al. 1988; Valli and Gold 1991; Joshi and Gold 1993; Reddy and Gold 2000; Ryu et al. 2000), cependant les mécanismes mis en jeu ainsi que l'importance des GHR fongiques au sein de ces voies cataboliques restent à ce jour incertains.

Considérant l'introduction récente du pentachlorophénol dans l'environnement (Crosby 1981) et la conservation des GHR au sein des champignons, des bactéries et des plantes (résultats non publiés), la réduction des GS-hydroquinones par ce type d'enzymes doit être replacée dans le contexte plus large des polymères aromatiques chlorés. Ces composés naturellement présents dans les sols ou les sédiments, sont issus de la dégradation de la biomasse, notamment détectés en tant que produits de dégradation de la lignine par les organismes décomposeurs de bois (Krauss et al. 1994; Ortiz-Bermudez et al. 2003; Ortiz-Bermudez et al. 2007). Leur élimination au sein des différents organismes implique la formation d'hydroquinones en tant qu'intermédiaires métaboliques (Reineke et al. 2001; Louie et al. 2002; Jechorek et al. 2003; Field and Sierra-Alvarez 2008). Considérant la diversité de structure des polymères de lignine dégradés par les peroxydases extracellulaires des champignons lignivores, ces enzymes sont également capables d'oxyder une large gamme de polluants organiques de structure proche comme les polychlorobiphényles ou les HAP (Hammel et al. 1991; Chroma et al. 2002; Novotný et al. 2004). L'oxydation de ces composés conduit le plus souvent à la formation des quinones correspondantes qui sont alors prises en charge par le champignon (Cerniglia 1997; Peng et al. 2008). La formation d'intermédiaires de dégradation de type quinone a également été décrite dans d'autres voies métaboliques, comme par exemple lors de la dégradation de la phénylalanine, du nitrophénol, ou encore du salicylate (Schenzle et al. 1999; Perez-Pantoja et al. 2008). Les plantes, les bactéries et les champignons sont connus pour produire une variété

d'hydroquinones dans leurs métabolismes (Romanova et al. 1977; Rieble et al. 1994; Perez-Pantoja et al. 2008). La prévalence de ces composés au sein des organismes vivants laisse donc supposer que les GHR présentes au sein des différents règnes jouent un rôle primordial dans de nombreuses voies métaboliques/cataboliques.

L'absence à ce jour de GHR chez les mammifères pose un problème du point de vue de leur fonction putative dans la protection cellulaire vis-à-vis des dommages liés aux hydroquinones. En effet, au même titre que les plantes, bactéries et champignons, les mammifères sont également exposés à ces composés, soit d'origine endogène via notamment le métabolisme des catécholamines et des œstrogènes, soit d'origine environnementale comme décrit ci-dessus. Cependant en termes de détoxification, il a été récemment prouvé que la voie dépendante du glutathion ne jouait pas un rôle primordial dans la résistance face aux quinones chez les mammifères. En effet, une déplétion en glutathion ne modifie pas la tolérance des mammifères vis-à-vis de la naphthoquinone ou encore de la phénanthroquinone (Miura et al. 2011). En revanche, d'autres voies métaboliques, indépendante du glutathion, présentes chez les mammifères sont impliquées dans la détoxification des hydroquinones, notamment via la synthèse de conjugués glucuronidés ou sulfatés (Shangari et al. 2005; Nishiyama et al. 2008; Taguchi et al. 2008). Ce type de molécules conjuguées a en effet été détecté dans le foie, la bile ou encore les urines de mammifères (Richert 1951; Losito et al. 1967; Thompson et al. 1972; Shangari et al. 2005). Ces travaux suggèrent fortement que la voie de détoxification des quinones chez les mammifères est essentiellement dépendante de la glucuronidation (Nishiyama et al. 2010; Miura et al. 2011), à l'inverse des bactéries qui utilisent le pouvoir réducteur du glutathion pour dégrader les quinones halogénées (Saber and Crawford 1985; Huang et al. 2008). Ces résultats posent donc la question de la spécificité des voies de détoxification en fonction des organismes considérés.

3. Evolution adaptative et familles multigéniques

Comprendre l'évolution et l'adaptation des organismes aux contraintes environnementales demeure un défi majeur pour les biologistes. Le développement récent des technologies de séquençage a conduit à l'émergence de la génomique comparative, cependant la corrélation entre les variations génétiques présentes entre différents organismes, et leurs conséquences phénotypiques est difficile à établir. Concernant les GST à cystéine catalytique, les informations nécessaires à la reconstitution de leur histoire évolutive sont complexes et restent à l'heure actuelle encore mal définies, tant la diversité génétique et fonctionnelle de cette famille est grande. Les caractérisations biochimiques et structurales réalisées au cours de ces travaux de thèse représentent une première étape dans la compréhension générale des fonctions physiologiques de cette famille de gènes. En dépit de caractéristiques propres à chaque classe, ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme et la tolérance des organismes vis-à-vis de composés d'origine exogène. Cependant, de nombreux points concernant la caractérisation des GST à cystéine catalytique et leurs rôles au sein des champignons restent encore à déterminer, et en particulier concernant la classe des GST Oméga qui est surreprésentée chez les organismes saprophytes capables de décomposer le bois. Quels rôles jouent-elles dans l'adaptation de ces organismes à leur environnement et quelle importance ont-elles vis-à-vis de leur mode de vie ?

3.1 Perspectives à court terme

A court terme, certaines études restées en suspens à l'issue de mon travail de thèse devront permettre de confirmer les hypothèses fonctionnelles formulées au cours de ces trois dernières années.

3.1.1 Définir les particularités structurales et fonctionnelles des différentes classes de GSTO

Les basidiomycètes saprophytes possèdent un grand nombre d'isoformes de GSTO qui se répartissent en différentes classes distinctes, dont certaines n'ont pas été identifiées chez les mammifères. De récentes études d'expression chez *P. chrysosporium* et *P. carnosa* montrent que les niveaux de transcription des gènes codant pour les GSTO varient en fonction des essences de bois utilisées comme unique source de carbone (MacDonald et al. 2011). La caractérisation de

quelques candidats présentant des profils d'expression spécifiques et appartenant aux différentes classes constitue un axe de travail à développer afin de déterminer leurs spécificités de substrat. Par exemple, l'analyse des séquences des GSTO fongiques a révélé la présence d'un groupe d'enzymes présentant deux résidus cystéinyle au sein d'un site conservé [CFC₂PFVQR]. La caractérisation biochimique d'une isoforme chez *P. carnosus* (e_gw1.4.504.1) permettra d'évaluer le rôle jouée par cette cystéine additionnelle dans la reconnaissance de son substrat et au cours de la catalyse enzymatique.

3.1.2 Identifier les substrats physiologiques des GST Oméga

Par ailleurs, les caractérisations biochimiques et structurales ayant abouti aux fonctions *in vitro* des protéines recombinantes, les cibles physiologiques de ces enzymes restent inconnues. La recherche de substrat physiologique est donc un axe de travail à développer. La première étape consisterait à sélectionner certaines essences végétales en fonction de leurs caractéristiques chimiques, puis à extraire et à séparer leurs différents métabolites dans le but d'identifier les substrats potentiels par compétition. A la différence d'expériences de ligand fishing à partir d'extraits bruts, cette méthode permet d'accumuler une grande quantité d'extractibles purifiés ce qui facilite dans un deuxième temps l'identification par spectrométrie de masse.

Dans ce contexte, les tests préliminaires réalisés à partir d'extraits acétoniques de hêtre et de champignons ont permis de valider la méthodologie. En effet, l'incubation des enzymes recombinantes PcGSTO3 et PcGSTO4 avec différentes fractions contenant sélectivement des composés chimiques extraits puis séparés par HPLC a permis de mettre en évidence la présence de potentiels interactants. Différentes fractions induisent une perte d'activité significative de PcGSTO4, impliquant soit une perturbation tridimensionnelle de l'enzyme à l'origine d'une perte de fonction, soit une interaction entre une molécule de la fraction considérée et le site actif de l'enzyme empêchant ainsi l'accès au substrat. Cependant l'hétérogénéité présente au sein des différentes fractions ainsi que la faible quantité en composés n'a pas permis l'identification de ces substrats potentiels. Par ailleurs, la plupart des inhibitions détectées concernent les fractions contenant les composés élués aux plus faibles et aux plus fortes concentrations en acétonitrile, utilisée lors de la séparation. Une mise au point de la technique est donc nécessaire pour palier à ce problème et augmenter le pouvoir résolutif de la séparation.

La synthèse de terpènes glutathionylés doit également être entreprise afin de confirmer ou d'infirmer dans un deuxième temps si, chez les basidiomycètes, les GSTO jouent un rôle au sein d'éventuelles voies métaboliques ou cataboliques de ces composés présents en grande quantité chez les végétaux. Certains terpènes ont en effet la capacité d'inhiber l'activité des PcGSTO, suggérant une interaction avec leur site actif qui empêche l'accès au substrat (Article 5). Cependant, le carène entraîne une augmentation de la masse des enzymes recombinantes de 33 Da, ce qui correspond à la fixation d'un peroxyde d'hydrogène (résultats non publiés), formé suite à l'oxydation spontanée des terpènes (Widmark and Blohm 1957; Karlberg et al. 1992). Néanmoins d'autres terpènes présentent de bonnes affinités pour ces enzymes sans entraîner la peroxydation de la cystéine réactive. La synthèse de GS-terpènes (lioniène, caryophyllène) permettrait alors de déterminer si les GSTO sont capables de déglutathioniler d'éventuels dérivés terpéniques intracellulaires, pouvant ainsi participer à leur métabolisme. Dans leur habitat naturel, les micro-organismes tels que *P. chrysosporium* poussent sur des matières végétales contenant des terpènes, comme le bois, ou dans le sol qui contient des feuilles et du bois en décomposition. Par conséquent, l'adaptation à ces substances toxiques (Onken and Berger 1999; Friedman et al. 2002; Hammer et al. 2003; Lee et al. 2003; Gershenzon and Dudareva 2007) est probable.

3.1.3 Identifier les fonctions physiologiques des GST à cystéine catalytique

Enfin, indispensables à l'établissement de la fonction physiologique des GST, des expériences *in vivo* font l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Pr Gary FOSTER (Bristol, UK). La transformation du champignon ouvre en effet de nouvelles perspectives d'études via différents outils moléculaires visant à inactiver ou à surexprimer spécifiquement certains gènes. Différents plasmides spécifiques de certaines isoformes de GST Oméga ont été créés dans ce but. L'étude de mutants de champignons en culture sur bois devrait permettre la mise en évidence de phénotypes au sein des souches transformées. Bien que plusieurs études décrivent différentes manipulations génétiques de basidiomycètes (Randall and Reddy 1991; Gold and Alic 1993; Matityahu et al. 2008), la transformation routinière de ces organismes et en particulier de *P. chrysosporium* requiert encore quelques mises au point. Néanmoins les premières expériences concernant la transformation de protoplastes de *Coprinopsis cinerea* sont concluantes, et il est envisageable de conduire les investigations fonctionnelles portant sur les GST au sein de cet organisme (Collins et al. 2010). Par ailleurs, la localisation cellulaire de ces protéines ainsi que l'induction de leur expression au sein des organismes pourraient également

être étudiés via l'étude de fusions GFP. Seule la combinaison des approches biochimique et fonctionnelle permettra d'avoir une vision d'ensemble des rôles des GST que ceux-ci soient restreints à la détoxification cellulaire ou étendus au métabolisme et aux modes de vie des champignons.

Parallèlement, des études fonctionnelles ont été entreprises chez *E. coli* profitant des outils de biologie moléculaire (banque de mutant KO, fusion de promoteur à la GFP) développés chez cet organisme. Biochimiquement, les premières expériences réalisées sur Yqjg démontrent que cette enzyme appartient à la classe des GHR. De plus, son expression est induite lorsque la bactérie est cultivée en présence de tetrachloro-1,4-benzoquinone (résultats non publiés). Il convient donc à présent d'étudier les caractéristiques phénotypiques des souches mutées pour ce gène afin de confirmer le rôle joué par les GHR dans la dégradation des hydroquinones halogénées (Huang et al. 2008; Xun et al. 2010; Belchik and Xun 2011; Lam et al. 2012).

3.1 Perspectives à long terme

L'UMR IAM de Nancy s'intéresse de longue date à l'adaptation locale des champignons à leur environnement moléculaire, et notamment via l'extension de familles de gènes spécifiques. L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en évidence l'existence d'une grande variabilité, tant d'un point de vue génomique que fonctionnel, au sein des familles multigéniques d'enzymes impliquées dans les mécanismes de détoxification fongique (Xénome). En soi, cette étude fait avancer la compréhension des mécanismes moléculaires ayant conduit aux changements de la fonction des gènes codant pour les GST au cours de l'évolution, cependant les conséquences phénotypiques de ces variations génomiques restent mal comprises. Dans ce cadre, mes travaux de thèse ont constitué une étape charnière entre les approches descriptives et les approches fonctionnelles pour comprendre la variabilité présente au sein des familles d'enzymes. A plus ou moins long terme, l'optimisation des critères phylogénétiques et des techniques d'investigation fonctionnelle (activités des protéines recombinantes, recherche de substrats physiologiques) permettraient de comprendre les bases moléculaires à l'origine de l'adaptation des communautés fongiques à leur environnement, et en particulier à la composition chimique du bois. La dégradation du bois implique également une machinerie de détoxification efficace et malléable face à la diversité de composés toxiques générés en relation avec la variabilité chimique existante au sein des arbres. Ces travaux

s'inscrivent dans une thématique générale visant à comprendre comment la composition chimique du bois influe sur sa sensibilité face aux attaques biologiques. Outre leur intérêt fondamental, ces travaux pourront potentiellement être exploités afin d'améliorer la conception des stratégies de bioremédiation et de dépollution des sols par les communautés fongiques via leur capacité extraordinaire à dégrader et à minéraliser une grande variété de composés récalcitrants.

REFERENCES

- Adamis, P. D., D. S. Gomes, et al. (2004). "The role of glutathione transferases in cadmium stress." *Toxicol Lett* **154**(1-2): 81-88.
- Akhtar, M. H. (1979). "Sequential participation of glutathione and sulph-hydryl(s) in reductive dechlorination of 2,4-di-, and 2,4,5-trichloro phenacyl chlorides by soluble fraction (105,000 x g) of chicken liver homogenate." *J Environ Sci Health B* **14**(1): 53-71.
- Amores, A., A. Force, et al. (1998). "Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution." *Science* **282**(5394): 1711-1714.
- Aposhian, H. V., R. A. Zakharyan, et al. (2004). "A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species." *Toxicol Appl Pharmacol* **198**(3): 327-335.
- Arabidopsis-Genome (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* **408**(6814): 796-815.
- Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases." *Chem Res Toxicol* **10**(1): 2-18.
- Asenjo, A. B., J. Rim, et al. (1994). "Molecular determinants of human red/green color discrimination." *Neuron* **12**(5): 1131-1138.
- Atkinson, H. J. and P. C. Babbitt (2009). "Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold." *Biochemistry* **48**(46): 11108-11116.
- Aury, J. M., O. Jaillon, et al. (2006). "Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*." *Nature* **444**(7116): 171-178.
- Awano, H., R. G. Malueka, et al. (2010). "Contemporary retrotransposition of a novel non-coding gene induces exon-skipping in dystrophin mRNA." *J Hum Genet* **55**(12): 785-790.
- Axarli, I. A., D. J. Rigden, et al. (2004). "Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I." *Biochem J* **382**(Pt 3): 885-893.
- Baba, T., T. Ara, et al. (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0008.
- Babtie, A., N. Tokuriki, et al. (2010). "What makes an enzyme promiscuous?" *Curr Opin Chem Biol* **14**(2): 200-207.
- Bai, M., J. M. Zhou, et al. (2004). "The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms." *J Biol Chem* **279**(48): 50025-50030.
- Bailey, J. A. and E. E. Eichler (2006). "Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease." *Nat Rev Genet* **7**(7): 552-564.
- Bailey, J. A., Z. Gu, et al. (2002). "Recent segmental duplications in the human genome." *Science* **297**(5583): 1003-1007.
- Ballantyne, B. and D. W. Swanston (1978). "The comparative acute mammalian toxicity of 1-chloroacetophenone (CN) and 2-chlorobenzylidene malononitrile (CS)." *Arch Toxicol* **40**(2): 75-95.

- Balogh, L. M. and W. M. Atkins (2011). "Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal." Drug Metab Rev **43**(2): 165-178.
- Bardwell, J. C., K. McGovern, et al. (1991). "Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo." Cell **67**(3): 581-589.
- Barkosky, R. R., J. L. Butler, et al. (1999). "Mechanisms of Hydroquinone-Induced Growth Reduction in Leafy Spurge." Journal of Chemical Ecology **25**(7): 1611-1621.
- Barnett, J. A., R. W. Payne, et al. (2000). Yeasts : characteristics and identification. Cambridge, U.K. ; New York, NY, USA, Cambridge University Press.
- Barreto, L., A. Garcera, et al. (2006). "A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism." Eukaryot Cell **5**(10): 1748-1759.
- Beisswanger, S. and W. Stephan (2008). "Evidence that strong positive selection drives neofunctionalization in the tandemly duplicated polyhomeotic genes in *Drosophila*." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(14): 5447-5452.
- Belchik, S. M. and L. Xun (2011). "S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases." Drug Metab Rev **43**(2): 307-316.
- Berenson, J. R. and H. S. Yeh (2006). "Arsenic compounds in the treatment of multiple myeloma: a new role for a historical remedy." Clin Lymphoma Myeloma **7**(3): 192-198.
- Bikard, D., D. Patel, et al. (2009). "Divergent evolution of duplicate genes leads to genetic incompatibilities within *A. thaliana*." Science **323**(5914): 623-626.
- Blanchette, B., X. Feng, et al. (2007). "Marine glutathione S-transferases." Mar Biotechnol (NY) **9**(5): 513-542.
- Blandin, G., P. Durrens, et al. (2000). "Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 4. The genome of *Saccharomyces cerevisiae* revisited." FEBS Lett **487**(1): 31-36.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, et al. (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-1462.
- Board, P. G. and M. W. Anders (2007). "Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones." Chem Res Toxicol **20**(1): 149-154.
- Board, P. G., M. Coggan, et al. (2008). "S-(4-Nitrophenacyl)glutathione is a specific substrate for glutathione transferase omega 1-1." Anal Biochem **374**(1): 25-30.
- Bogen, K. T., J. M. Benson, et al. (2008). "Naphthalene metabolism in relation to target tissue anatomy, physiology, cytotoxicity and tumorigenic mechanism of action." Regul Toxicol Pharmacol **51**(2 Suppl): S27-36.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, et al. (2000). "Role of quinones in toxicology." Chem Res Toxicol **13**(3): 135-160.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, et al. (2000). "Role of Quinones in Toxicology†." Chemical Research in Toxicology **13**(3): 135-160.

- Booth, J., E. Boyland, et al. (1961). "An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione." Biochem J **79**(3): 516-524.
- Brundin, A., J. H. Ratnayake, et al. (1982). "Glutathione-dependent reductive dehalogenation of 2,2',4'-trichloroacetophenone to 2',4'-dichloroacetophenone." Biochem Pharmacol **31**(23): 3885-3890.
- Brunmark, A. and E. Cadenas (1988). "Reductive addition of glutathione to p-benzoquinone, 2-hydroxy-p-benzoquinone, and p-benzoquinone epoxides. Effect of the hydroxy- and glutathionyl substituents on p-benzohydroquinone autoxidation." Chem Biol Interact **68**(3-4): 273-298.
- Bruns, C. M., I. Hubatsch, et al. (1999). "Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products." J Mol Biol **288**(3): 427-439.
- Buffinton, G. D., K. Ollinger, et al. (1989). "DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates. Effect of substituents on autoxidation rates." Biochem J **257**(2): 561-571.
- Bumpus, J. A. and S. D. Aust (1987). "Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*." Appl Environ Microbiol **53**(9): 2001-2008.
- Caccuri, A. M., G. Antonini, et al. (2002). "GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme." J Biol Chem **277**(21): 18777-18784.
- Cerniglia, C. E. (1997). "Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation." J Ind Microbiol Biotechnol **19**(5-6): 324-333.
- Chapman, B. A., J. E. Bowers, et al. (2006). "Buffering of crucial functions by paleologous duplicated genes may contribute cyclicity to angiosperm genome duplication." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2730-2735.
- Chen, H. and M. R. Juchau (1998). "Recombinant human glutathione S-transferases catalyze enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro." Biochem J **336 (Pt 1)**: 223-226.
- Chi, Y., Y. Cheng, et al. (2011). "Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione s-transferase family in sorghum and other higher plants." DNA Res **18**(1): 1-16.
- Choi, J. H., W. Lou, et al. (1998). "A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **273**(45): 29915-29922.
- Chowdhury, U. K., R. A. Zakharyan, et al. (2006). "Glutathione-S-transferase-omega [MMA(V) reductase] knockout mice: enzyme and arsenic species concentrations in tissues after arsenate administration." Toxicol Appl Pharmacol **216**(3): 446-457.
- Chroma, L., T. Macek, et al. (2002). "Decolorization of RBBR by plant cells and correlation with the transformation of PCBs." Chemosphere **49**(7): 739-748.

- Clark, A. G., et al. (1986). Insecticide metabolism by multiple glutathione s-transferases in two strains of the house fly, *Musca domestica* (L). Amsterdam, PAYS-BAS, Elsevier.
- Clark, A. G. (1994). "Invasion and maintenance of a gene duplication." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 2950-2954.
- Coleman, J., M. Blake-Kalff, et al. (1997). "Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation." Trends in Plant Science **2**(4): 144-151.
- Coles, B., I. Wilson, et al. (1988). "The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study." Arch Biochem Biophys **264**(1): 253-260.
- Collins, C. M., M. N. Heneghan, et al. (2010). "Improvement of the *Coprinopsis cinerea* molecular toolkit using new construct design and additional marker genes." J Microbiol Methods **82**(2): 156-162.
- Conant, G. C. and K. H. Wolfe (2007). "Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast." Mol Syst Biol **3**: 129.
- Conant, G. C. and K. H. Wolfe (2008). "Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions." Nat Rev Genet **9**(12): 938-950.
- Cooper, A. J., S. A. Bruschi, et al. (2002). "Toxic, halogenated cysteine S-conjugates and targeting of mitochondrial enzymes of energy metabolism." Biochem Pharmacol **64**(4): 553-564.
- Coschigano, P. W. and B. Magasanik (1991). "The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases." Mol Cell Biol **11**(2): 822-832.
- Crawford, M. J., D. H. Hutson, et al. (1976). "Metabolic demethylation of the insecticide dimethylvinphos in rats, in dogs, and in vitro." Xenobiotica **6**(12): 745-762.
- Cresnar, B. and S. Petric (2011). "Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom." Biochim Biophys Acta **1814**(1): 29-35.
- Crosby, D. G. (1981). "IUPAC Reports on pesticides : 14. Environmental chemistry of pentachlorophenol." Pure and Applied Chemistry **53**(5): 1051-1080.
- Czech, B., C. D. Malone, et al. (2008). "An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*." Nature **453**(7196): 798-802.
- Davis, C. A., D. P. Holmyard, et al. (1991). "Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum." Development **111**(2): 287-298.
- Dayhoff, M. O. (1974). "Computer analysis of protein sequences." Fed Proc **33**(12): 2314-2316.
- Dean, J., D. J. Aneshansley, et al. (1990). "Defensive spray of the bombardier beetle: a biological pulse jet." Science **248**(4960): 1219-1221.
- Dehal, P. and J. L. Boore (2005). "Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate." PLoS Biol **3**(10): e314.

- Dekant, W. (2001). "Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation." *Toxicol Lett* **124**(1-3): 21-36.
- Dekant, W. (2003). "Biosynthesis of toxic glutathione conjugates from halogenated alkenes." *Toxicol Lett* **144**(1): 49-54.
- DeRidder, B. P., D. P. Dixon, et al. (2002). "Induction of glutathione S-transferases in Arabidopsis by herbicide safeners." *Plant Physiol* **130**(3): 1497-1505.
- Dirr, H., P. Reinemer, et al. (1994). "X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function." *Eur J Biochem* **220**(3): 645-661.
- Dixon, D. P., B. G. Davis, et al. (2002). "Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in Arabidopsis thaliana." *J Biol Chem* **277**(34): 30859-30869.
- Dixon, D. P. and R. Edwards (2010). "Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing." *J Biol Chem* **285**(47): 36322-36329.
- Dixon, D. P., A. Lapthorn, et al. (2002). "Plant glutathione transferases." *Genome Biol* **3**(3): REVIEWS3004.
- Dixon, D. P., A. Lapthorn, et al. (2008). "Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases." *J Biol Chem* **283**(29): 20268-20276.
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the origin of species*. New York,, Columbia Univ. Press.
- Doddapaneni, H., R. Chakraborty, et al. (2005). "Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium: evidence for gene duplications and extensive gene clustering." *BMC Genomics* **6**: 92.
- Drillien, R. and F. Lacroute (1972). "Ureidosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation." *J Bacteriol* **109**(1): 203-208.
- Dujon, B., D. Sherman, et al. (2004). "Genome evolution in yeasts." *Nature* **430**(6995): 35-44.
- Dulai, K. S., M. von Dornum, et al. (1999). "The evolution of trichromatic color vision by opsin gene duplication in New World and Old World primates." *Genome Res* **9**(7): 629-638.
- Ekker, M., J. Wegner, et al. (1992). "Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes." *Development* **116**(4): 1001-1010.
- Enayati, A. A., H. Ranson, et al. (2005). "Insect glutathione transferases and insecticide resistance." *Insect Mol Biol* **14**(1): 3-8.
- Fernandez-Canon, J. M., M. W. Baetscher, et al. (2002). "Maleylacetoacetate isomerase (MAAI/GSTZ)-deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism." *Mol Cell Biol* **22**(13): 4943-4951.
- Ferrer-Sueta, G., B. Manta, et al. (2011). "Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction." *Chem Res Toxicol* **24**(4): 434-450.

- Feuk, L., A. R. Carson, et al. (2006). "Structural variation in the human genome." Nat Rev Genet **7**(2): 85-97.
- Field, J. A. and R. Sierra-Alvarez (2008). "Microbial degradation of chlorinated dioxins." Chemosphere **71**(6): 1005-1018.
- Floudas, D., M. Binder, et al. (2012). "The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes." Science **336**(6089): 1715-1719.
- Force, A., M. Lynch, et al. (1999). "Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations." Genetics **151**(4): 1531-1545.
- Friedman, M., P. R. Henika, et al. (2002). "Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*." J Food Prot **65**(10): 1545-1560.
- Frova, C. (2006). "Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives." Biomol Eng **23**(4): 149-169.
- Fukai, F., et al. (1992). A possible role of glutathione S-transferase in rat ovary and testis. Tokyo, JAPON, Institute of Applied Biochemistry.
- Gardner, C. A. and K. F. Barald (1992). "Expression patterns of engrailed-like proteins in the chick embryo." Dev Dyn **193**(4): 370-388.
- Gershenzon, J. and N. Dudareva (2007). "The function of terpene natural products in the natural world." Nat Chem Biol **3**(7): 408-414.
- Ghildiyal, M., H. Seitz, et al. (2008). "Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells." Science **320**(5879): 1077-1081.
- Glenn, J. K., M. A. Morgan, et al. (1983). "An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." Biochem Biophys Res Commun **114**(3): 1077-1083.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, et al. (1996). "Life with 6000 genes." Science **274**(5287): 546, 563-547.
- Gold, M. H. and M. Alic (1993). "Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." Microbiological Reviews **57**(3): 605-622.
- Gonzalez, F. (1945). "The Inhibiting Effect of Quinones on the Growth of *Penicillium Notatum*." Science **101**(2628): 494.
- Graur, D., Y. Shuali, et al. (1989). "Deletions in processed pseudogenes accumulate faster in rodents than in humans." J Mol Evol **28**(4): 279-285.
- Green, A. R., R. P. Hayes, et al. (2012). "Structural Understanding of GSH-dependent Reduction Mechanism of Glutathionyl-Hydroquinone Reductases." J Biol Chem.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, et al. (1974). "The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(10): 3879-3882.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, et al. (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." J Biol Chem **249**(22): 7130-7139.

- Hammel, K. E. and D. Cullen (2008). "Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis." Curr Opin Plant Biol **11**(3): 349-355.
- Hammel, K. E., B. Green, et al. (1991). "Ring fission of anthracene by a eukaryote." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10605-10608.
- Hammer, K. A., C. F. Carson, et al. (2003). "Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil." J Appl Microbiol **95**(4): 853-860.
- Hanna, M. C., J. T. Platts, et al. (1997). "Identification of a gene within the tandem array of red and green color pigment genes." Genomics **43**(3): 384-386.
- Hansen, M. T. (1978). "Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*." J Bacteriol **134**(1): 71-75.
- Harms, H., D. Schlosser, et al. (2011). "Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals." Nat Rev Microbiol **9**(3): 177-192.
- Hayes, J. D., J. U. Flanagan, et al. (2005). "Glutathione transferases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 51-88.
- Hemingway, J. (2000). "The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance." Insect Biochem Mol Biol **30**(11): 1009-1015.
- Henderson, C. J., A. W. McLaren, et al. (1998). "Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function." Chem Biol Interact **111-112**: 69-82.
- Henderson, C. J., A. G. Smith, et al. (1998). "Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5275-5280.
- Herrero, E., J. Ros, et al. (2006). "Glutaredoxins in fungi." Photosynth Res **89**(2-3): 127-140.
- Hill, B. A., H. E. Kleiner, et al. (1993). "Identification of multi-S-substituted conjugates of hydroquinone by HPLC-coulometric electrode array analysis and mass spectroscopy." Chem Res Toxicol **6**(4): 459-469.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, et al. (1996). "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*." Nucleic Acids Res **24**(22): 4420-4449.
- Hittinger, C. T. (2012). "Evolution. Endless rots most beautiful." Science **336**(6089): 1649-1650.
- Holland, L. Z., M. Kene, et al. (1997). "Sequence and embryonic expression of the amphioxus engrailed gene (*AmphiEn*): the metameric pattern of transcription resembles that of its segment-polarity homolog in *Drosophila*." Development **124**(9): 1723-1732.
- Hu, X., P. J. Benson, et al. (1997). "Induction of glutathione S-transferase pi as a bioassay for the evaluation of potency of inhibitors of benzo(a)pyrene-induced cancer in a murine model." Int J Cancer **73**(6): 897-902.
- Hu, X. and S. V. Singh (1997). "Differential catalytic efficiency and enantioselectivity of murine glutathione S-transferase isoenzymes in the glutathione conjugation of carcinogenic anti-diol epoxides of chrysene and benzo(g)chrysene." Arch Biochem Biophys **345**(2): 318-324.

- Huang, Y., R. Xun, et al. (2008). "Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723." *J Bacteriol* **190**(23): 7595-7600.
- Hubatsch, I., M. Ridderstrom, et al. (1998). "Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation." *Biochem J* **330** (Pt 1): 175-179.
- Hughes, A. L. (1994). "The evolution of functionally novel proteins after gene duplication." *Proc Biol Sci* **256**(1346): 119-124.
- Hunt, D. M., K. S. Dulai, et al. (1998). "Molecular evolution of trichromacy in primates." *Vision Res* **38**(21): 3299-3306.
- Hurst, R., Y. Bao, et al. (1998). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases." *Biochem J* **332** (Pt 1): 97-100.
- Hutson, D. H., D. S. Holmes, et al. (1976). "The involvement of glutathione in the reductive dechlorination of a phenacyl halide." *Chemosphere* **5**(2): 79-84.
- Ishikawa, T., A. F. Casini, et al. (1998). "Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase." *J Biol Chem* **273**(44): 28708-28712.
- Jacob, F. (1996). *Bricolage-Dictionnaire du darwinisme et de l'évolution*, Presses universitaires de France.
- Jaillon, O., J. M. Aury, et al. (2007). "The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla." *Nature* **449**(7161): 463-467.
- Jakobsson, P. J., S. Thoren, et al. (1999). "Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7220-7225.
- Jarabak, R. and J. Jarabak (1995). "Effect of ascorbate on the DT-diaphorase-mediated redox cycling of 2-methyl-1,4-naphthoquinone." *Arch Biochem Biophys* **318**(2): 418-423.
- Jechorek, M., K. D. Wendlandt, et al. (2003). "Cometabolic degradation of chlorinated aromatic compounds." *Journal of Biotechnology* **102**(1): 93-98.
- Jensen, R. A. (1976). "Enzyme recruitment in evolution of new function." *Annu Rev Microbiol* **30**: 409-425.
- Ji, X., E. C. von Rosenvinge, et al. (1996). "Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8208-8213.
- Ji, X., E. C. von Rosenvinge, et al. (1995). "Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods." *Biochemistry* **34**(16): 5317-5328.
- Ji, X., P. Zhang, et al. (1992). "The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-A resolution." *Biochemistry* **31**(42): 10169-10184.

- Ji, Y., E. E. Eichler, et al. (2000). "Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders." *Genome Res* **10**(5): 597-610.
- Johansson, A. S. and B. Mannervik (2001). "Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones." *J Biol Chem* **276**(35): 33061-33065.
- Joseph, P. and A. K. Jaiswal (1998). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 reduces the mutagenicity of DNA caused by NADPH:P450 reductase-activated metabolites of benzo(a)pyrene quinones." *Br J Cancer* **77**(5): 709-719.
- Joseph, P., A. J. Klein-Szanto, et al. (1998). "Hydroquinones cause specific mutations and lead to cellular transformation and in vivo tumorigenesis." *Br J Cancer* **78**(3): 312-320.
- Joshi, D. K. and M. H. Gold (1993). "Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." *Appl Environ Microbiol* **59**(6): 1779-1785.
- Joyner, A. L. and G. R. Martin (1987). "En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene: expression during embryogenesis." *Genes Dev* **1**(1): 29-38.
- Kaessmann, H. (2010). "Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes." *Genome Res* **20**(10): 1313-1326.
- Kamisaka, K., W. H. Habig, et al. (1975). "Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin." *Eur J Biochem* **60**(1): 153-161.
- Kamitani, S., Y. Akiyama, et al. (1992). "Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme." *EMBO J* **11**(1): 57-62.
- Kanai, T., K. Takahashi, et al. (2006). "Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress." *J Biochem* **140**(5): 703-711.
- Karlberg, A. T., K. Magnusson, et al. (1992). "Air oxidation of d-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens." *Contact Dermatitis* **26**(5): 332-340.
- Kautzman, K. E., J. D. Surratt, et al. (2010). "Chemical composition of gas- and aerosol-phase products from the photooxidation of naphthalene." *J Phys Chem A* **114**(2): 913-934.
- Kawamura, Y., K. Saito, et al. (2008). "*Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells." *Nature* **453**(7196): 793-797.
- Kellis, M., B. W. Birren, et al. (2004). "Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* **428**(6983): 617-624.
- Kersten, P. and D. Cullen (2007). "Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." *Fungal Genet Biol* **44**(2): 77-87.
- Keseler, I. M., J. Collado-Vides, et al. (2005). "EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D334-337.

- Ketterer, B., B. Coles, et al. (1983). "The role of glutathione in detoxication." Environ Health Perspect **49**: 59-69.
- Khersonsky, O., C. Roodveldt, et al. (2006). "Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects." Curr Opin Chem Biol **10**(5): 498-508.
- Kiefer, P. M., Jr. and S. D. Copley (2002). "Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase." Biochemistry **41**(4): 1315-1322.
- Kiefer, P. M., Jr., D. L. McCarthy, et al. (2002). "The reaction catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase does not involve nucleophilic aromatic substitution." Biochemistry **41**(4): 1308-1314.
- Kirk, T. K. and R. L. Farrell (1987). "Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin." Annu Rev Microbiol **41**: 465-505.
- Klenk, H. P., R. A. Clayton, et al. (1997). "The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*." Nature **390**(6658): 364-370.
- Kochian, L. V., O. A. Hoekenga, et al. (2004). "How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency." Annu Rev Plant Biol **55**: 459-493.
- Kolm, R. H., G. E. Sroga, et al. (1992). "Participation of the phenolic hydroxyl group of Tyr-8 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1." Biochem J **285** (Pt 2): 537-540.
- Kong, K. H., K. Takasu, et al. (1992). "Tyrosine-7 in human class Pi glutathione S-transferase is important for lowering the pKa of the thiol group of glutathione in the enzyme-glutathione complex." Biochem Biophys Res Commun **184**(1): 194-197.
- Krauss, T., P. Krauss, et al. (1994). "FORMATION OF PCDD PCDF DURING COMPOSTING." Chemosphere **28**(1): 155-158.
- Kuwahara, M., J. K. Glenn, et al. (1984). "Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*." FEBS Letters **169**(2): 247-250.
- Labrou, N. E., L. V. Mello, et al. (2001). "Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I." Biochem J **358**(Pt 1): 101-110.
- Lacroute, F. (1971). "Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast." J Bacteriol **106**(2): 519-522.
- Lah, L., N. Krasevec, et al. (2008). "High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems." Fungal Genet Biol **45**(4): 446-458.
- Lah, L., B. Podobnik, et al. (2011). "The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification." Mol Microbiol **81**(5): 1374-1389.

- Lam, L. K., Z. Zhang, et al. (2012). "Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases." *Biochemistry* **51**(25): 5014-5021.
- Lamoureux, G. L., R. H. Shimabukuro, et al. (1970). "Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections." *J Agric Food Chem* **18**(1): 81-86.
- Lan, Q., L. Zhang, et al. (2004). "Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene." *Science* **306**(5702): 1774-1776.
- Lan, T., Z. L. Yang, et al. (2009). "Extensive functional diversification of the Populus glutathione S-transferase supergene family." *Plant Cell* **21**(12): 3749-3766.
- Larrondo, L., A. Gonzalez, et al. (2005). "The nop gene from Phanerochaete chrysosporium encodes a peroxidase with novel structural features." *Biophys Chem* **116**(2): 167-173.
- Lee, S., C. J. Peterson, et al. (2003). "Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects." *Journal of Stored Products Research* **39**(1): 77-85.
- Li, W. H., Z. Gu, et al. (2001). "Evolutionary analyses of the human genome." *Nature* **409**(6822): 847-849.
- Lin, X., S. Kaul, et al. (1999). "Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant Arabidopsis thaliana." *Nature* **402**(6763): 761-768.
- Lin, Z. and W. H. Li (2011). "Expansion of hexose transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts." *Mol Biol Evol* **28**(1): 131-142.
- Litwack, G., B. Ketterer, et al. (1971). "Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions." *Nature* **234**(5330): 466-467.
- Logan, C., H. F. Willard, et al. (1989). "Chromosomal localization of the human homeo box-containing genes, EN1 and EN2." *Genomics* **4**(2): 206-209.
- Losito, R., C. A. Owen, Jr., et al. (1967). "Metabolism of [14C]menadione." *Biochemistry* **6**(1): 62-68.
- Louie, T. M., C. M. Webster, et al. (2002). "Genetic and biochemical characterization of a 2,4,6-trichlorophenol degradation pathway in Ralstonia eutropha JMP134." *J Bacteriol* **184**(13): 3492-3500.
- Loyall, L., K. Uchida, et al. (2000). "Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures." *Plant Cell* **12**(10): 1939-1950.
- Lu, H. and L. Zhu (2007). "Pollution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke." *J Hazard Mater* **139**(2): 193-198.
- Lupski, J. R. (2007). "Genomic rearrangements and sporadic disease." *Nat Genet* **39**(7 Suppl): S43-47.
- Lynch, M. and J. S. Conery (2000). "The evolutionary fate and consequences of duplicate genes." *Science* **290**(5494): 1151-1155.

- Lynch, M. and A. Force (2000). "The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization." Genetics **154**(1): 459-473.
- Lynch, M., M. O'Hely, et al. (2001). "The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate." Genetics **159**(4): 1789-1804.
- Ma, L. J., A. S. Ibrahim, et al. (2009). "Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication." PLoS Genet **5**(7): e1000549.
- MacDonald, J., M. Doering, et al. (2011). "Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood." Appl Environ Microbiol **77**(10): 3211-3218.
- Maere, S., S. De Bodt, et al. (2005). "Modeling gene and genome duplications in eukaryotes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(15): 5454-5459.
- Magiri, E. N., V. N. Konji, et al. (1995). "Effect of plant quinones on insect flight muscle mitochondria." International Journal of Tropical Insect Science **16**(02): 183-189.
- Makalowski, W. (2001). "Are we polyploids? A brief history of one hypothesis." Genome Res **11**(5): 667-670.
- Mannervik, B., A. Runarsdottir, et al. (2009). "Multi-substrate-activity space and quasi-species in enzyme evolution: Ohno's dilemma, promiscuity and functional orthogonality." Biochem Soc Trans **37**(Pt 4): 740-744.
- Marnell, L. L., G. G. Garcia-Vargas, et al. (2003). "Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles." Chem Res Toxicol **16**(12): 1507-1513.
- Marrs, K. A. (1996). "The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 127-158.
- Marsh, M., D. K. Shoemark, et al. (2008). "Structure of bacterial glutathione-S-transferase maleyl pyruvate isomerase and implications for mechanism of isomerisation." J Mol Biol **384**(1): 165-177.
- Martinez, D., L. F. Larrondo, et al. (2004). "Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78." Nat Biotechnol **22**(6): 695-700.
- Masai, E., A. Ichimura, et al. (2003). "Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether." J Bacteriol **185**(6): 1768-1775.
- Masai, E., Y. Katayama, et al. (1993). "A bacterial enzyme degrading the model lignin compound beta-etherase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily." FEBS Lett **323**(1-2): 135-140.
- Mathieu, Y., P. Prosper, et al. (2012). "Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties." J Biol Chem.
- Matityahu, A., Y. Hadar, et al. (2008). "Gene silencing by RNA Interference in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*." Appl Environ Microbiol **74**(17): 5359-5365.

- McGoldrick, S., S. M. O'Sullivan, et al. (2005). "Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily." *FEMS Microbiol Lett* **242**(1): 1-12.
- McLysaght, A., K. Hokamp, et al. (2002). "Extensive genomic duplication during early chordate evolution." *Nat Genet* **31**(2): 200-204.
- McTigue, M. A., D. R. Williams, et al. (1995). "Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel." *J Mol Biol* **246**(1): 21-27.
- Merico, A., P. Sulo, et al. (2007). "Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex." *FEBS J* **274**(4): 976-989.
- Mileski, G. J., J. A. Bumpus, et al. (1988). "Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*." *Appl Environ Microbiol* **54**(12): 2885-2889.
- Minami, M., O. Kureha, et al. (2007). "Long serial analysis of gene expression for transcriptome profiling during the initiation of ligninolytic enzymes production in *Phanerochaete chrysosporium*." *Appl Microbiol Biotechnol* **75**(3): 609-618.
- Minami, M., K. Suzuki, et al. (2009). "Changes in the gene expression of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* due to the addition of atropine." *Biosci Biotechnol Biochem* **73**(8): 1722-1731.
- Mitchell, A. E., J. Lakritz, et al. (2000). "Quantification of individual glutathione S-transferase isozymes in hepatic and pulmonary tissues of naphthalene-tolerant mice." *Arch Toxicol* **74**(4-5): 215-221.
- Miura, T., Y. Shinkai, et al. (2011). "Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone." *Chem Res Toxicol* **24**(4): 559-567.
- Monks, T. J., R. P. Hanzlik, et al. (1992). "Quinone chemistry and toxicity." *Toxicol Appl Pharmacol* **112**(1): 2-16.
- Monks, T. J. and S. S. Lau (1997). "Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates." *Chem Res Toxicol* **10**(12): 1296-1313.
- Monks, T. J. and S. S. Lau (1998). "The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 229-255.
- Monks, T. J., S. S. Lau, et al. (1985). "Glutathione conjugates of 2-bromohydroquinone are nephrotoxic." *Drug Metab Dispos* **13**(5): 553-559.
- Morel, F., C. Rauch, et al. (2002). "The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter." *Pharmacogenetics* **12**(4): 277-286.
- Morel, M., A. A. Ngadin, et al. (2009). "The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." *Cell Mol Life Sci* **66**(23): 3711-3725.

- Morin, E., A. Kohler, et al. (2012). "Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Munoz, E. R. and B. M. Barnett (2000). "Effect of hydroquinone on meiotic segregation in *Drosophila melanogaster* females." Mutat Res **469**(2): 215-221.
- Muralla, R., C. Sweeney, et al. (2007). "Genetic dissection of histidine biosynthesis in *Arabidopsis*." Plant Physiol **144**(2): 890-903.
- Nei, M. (1969). "Gene duplication and nucleotide substitution in evolution." Nature **221**(5175): 40-42.
- Nishiyama, T., T. Izawa, et al. (2010). "Cooperation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and UDP-glucuronosyltransferases reduces menadione cytotoxicity in HEK293 cells." Biochem Biophys Res Commun **394**(3): 459-463.
- Nishiyama, T., T. Ohnuma, et al. (2008). "UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation." Biochem Biophys Res Commun **371**(2): 247-250.
- Norton, G. J., D. E. Lou-Hing, et al. (2008). "Rice–arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis." Journal of Experimental Botany **59**(8): 2267-2276.
- Novotný, Č., K. Svobodová, et al. (2004). "Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate." Soil Biology and Biochemistry **36**(10): 1545-1551.
- O'Brien, P. J. (1991). "Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity." Chem Biol Interact **80**(1): 1-41.
- Ohno, S. (1970). Evolution by gene duplication. Berlin, New York,, Springer-Verlag.
- Okamura, K., W. J. Chung, et al. (2008). "The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs." Nature **453**(7196): 803-806.
- Onken, J. and R. G. Berger (1999). "Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*." J Biotechnol **69**(2-3): 163-168.
- Ortiz-Bermudez, P., K. C. Hirth, et al. (2007). "Chlorination of lignin by ubiquitous fungi has a likely role in global organochlorine production." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3895-3900.
- Ortiz-Bermudez, P., E. Srebotnik, et al. (2003). "Chlorination and cleavage of lignin structures by fungal chloroperoxidases." Appl Environ Microbiol **69**(8): 5015-5018.
- Otto, S. P. and J. Whitton (2000). "Polyploid incidence and evolution." Annu Rev Genet **34**: 401-437.
- Ozcelik, T., M. H. Porteus, et al. (1992). "DLX2 (TES1), a homeobox gene of the Distal-less family, assigned to conserved regions on human and mouse chromosomes 2." Genomics **13**(4): 1157-1161.
- Paiva, L., A. Hernandez, et al. (2010). "Association between GSTO2 polymorphism and the urinary arsenic profile in copper industry workers." Environ Res **110**(5): 463-468.

- Paiva, L., R. Marcos, et al. (2008). "Polymorphism of glutathione transferase Omega 1 in a population exposed to a high environmental arsenic burden." Pharmacogenet Genomics **18**(1): 1-10.
- Pemble, S. E. and J. B. Taylor (1992). "An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences." Biochem J **287**: 957-963.
- Pemble, S. E., A. F. Wardle, et al. (1996). "Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue." Biochem J **319** (Pt 3): 749-754.
- Peng, R. H., A. S. Xiong, et al. (2008). "Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons." FEMS Microbiol Rev **32**(6): 927-955.
- Pentao, L., C. A. Wise, et al. (1992). "Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit." Nat Genet **2**(4): 292-300.
- Perez-Pantoja, D., R. De la Iglesia, et al. (2008). "Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134." FEMS Microbiol Rev **32**(5): 736-794.
- Petras, T., W. G. Siems, et al. (1995). "4-hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney." Free Radic Biol Med **19**(5): 685-688.
- Pfeiffer, P., W. Goedecke, et al. (2000). "Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations." Mutagenesis **15**(4): 289-302.
- Postlethwait, J. H., Y. L. Yan, et al. (1998). "Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map." Nat Genet **18**(4): 345-349.
- Preuss, R., J. Angerer, et al. (2003). "Naphthalene--an environmental and occupational toxicant." Int Arch Occup Environ Health **76**(8): 556-576.
- Price, R. N., A. C. Uhlemann, et al. (2004). "Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number." Lancet **364**(9432): 438-447.
- Rai, R., J. J. Tate, et al. (2003). "Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity." J Biol Chem **278**(15): 12826-12833.
- Ramsey, J. and D. W. Schemske (1998). "Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants." Annual Review of Ecology and Systematics **29**(1): 467-501.
- Randall, T. and C. A. Reddy (1991). "An improved transformation vector for the lignin-degrading white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." Gene **103**(1): 125-130.
- Ranson, H., F. Collins, et al. (1998). "The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14284-14289.

- Reddy, G. V. and M. H. Gold (2000). "Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved." Microbiology **146** (Pt 2): 405-413.
- Reddy, G. V. and M. H. Gold (2001). "Purification and characterization of glutathione conjugate reductase: a component of the tetrachlorohydroquinone reductive dehalogenase system from *Phanerochaete chrysosporium*." Arch Biochem Biophys **391**(2): 271-277.
- Reineke, W., C. Mandt, et al. (2001). Chlorinated Hydrocarbon Metabolism. Encyclopedia of Life Sciences John Wiley & Sons, Ltd.
- Reinemer, P., H. W. Dirr, et al. (1991). "The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution." EMBO J **10**(8): 1997-2005.
- Richert, D. A. (1951). "Studies on the detoxification of 2-methyl-1,4-naphthoquinone in rabbits." J Biol Chem **189**(2): 763-768.
- Rieble, S., D. K. Joshi, et al. (1994). "Purification and characterization of a 1,2,4-trihydroxybenzene 1,2-dioxygenase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*." J Bacteriol **176**(16): 4838-4844.
- Riley, M., T. Abe, et al. (2006). "Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005." Nucleic Acids Res **34**(1): 1-9.
- Rogers, J. H. (1985). "The origin and evolution of retroposons." Int Rev Cytol **93**: 187-279.
- Romanova, A. S., A. V. Patudin, et al. (1977). "Quinones of higher plants as possible therapeutic agents." Pharmaceutical Chemistry Journal **11**(7): 927-937.
- Rosenberg, H. F. (1995). "Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity." J Biol Chem **270**(14): 7876-7881.
- Ross, D. (1996). "Metabolic basis of benzene toxicity." Eur J Haematol Suppl **60**: 111-118.
- Roxas, V. P., R. K. Smith, Jr., et al. (1997). "Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress." Nat Biotechnol **15**(10): 988-991.
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, et al. (2000). "Comparative genomics of the eukaryotes." Science **287**(5461): 2204-2215.
- Ryu, W., S. Shim, et al. (2000). "Biodegradation of pentachlorophenol by white rot fungi under ligninolytic and nonligninolytic conditions." Biotechnology and Bioprocess Engineering **5**(3): 211-214.
- Saber, D. L. and R. L. Crawford (1985). "Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol." Appl Environ Microbiol **50**(6): 1512-1518.
- Sakurai, T., C. Kojima, et al. (2004). "Cellular glutathione prevents cytolethality of monomethylarsonic acid." Toxicol Appl Pharmacol **195**(2): 129-141.
- Sakurai, T., W. Qu, et al. (2002). "A major human arsenic metabolite, dimethylarsinic acid, requires reduced glutathione to induce apoptosis." Chem Res Toxicol **15**(5): 629-637.

- Salinas, A. E. and M. G. Wong (1999). "Glutathione S-transferases--a review." Curr Med Chem **6**(4): 279-309.
- Sasidharan, R. and M. Gerstein (2008). "Genomics: protein fossils live on as RNA." Nature **453**(7196): 729-731.
- Sato, S., F. A. Feltus, et al. (2009). "The first genome-level transcriptome of the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on red oak." Curr Genet **55**(3): 273-286.
- Sato, Y., H. Moriuchi, et al. (2009). "Identification of three alcohol dehydrogenase genes involved in the stereospecific catabolism of arylglycerol-beta-aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6." Appl Environ Microbiol **75**(16): 5195-5201.
- Schenzle, A., H. Lenke, et al. (1999). "3-Hydroxylaminophenol mutase from *Ralstonia eutropha* JMP134 catalyzes a Bamberger rearrangement." J Bacteriol **181**(5): 1444-1450.
- Schmuck, E., J. Cappello, et al. (2008). "Deletion of Glu155 causes a deficiency of glutathione transferase Omega 1-1 but does not alter sensitivity to arsenic trioxide and other cytotoxic drugs." Int J Biochem Cell Biol **40**(11): 2553-2559.
- Schmuck, E. M., P. G. Board, et al. (2005). "Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases." Pharmacogenet Genomics **15**(7): 493-501.
- Senjo, M., T. Ishibashi, et al. (1985). "Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome b5 from mitochondria. Evidence for identifying the heme transfer protein as belonging to a group of glutathione S-transferases." J Biol Chem **260**(16): 9191-9196.
- Shaffer, L. G. and J. R. Lupski (2000). "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans." Annu Rev Genet **34**: 297-329.
- Shangari, N., T. S. Chan, et al. (2005). "Sulfation and glucuronidation of phenols: implications in coenzyme Q metabolism." Methods Enzymol **400**: 342-359.
- Sheehan, D., G. Meade, et al. (2001). "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily." Biochem J **360**(Pt 1): 1-16.
- Simon, M., O. Loudet, et al. (2008). "Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana* genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers." Genetics **178**(4): 2253-2264.
- Singh, S. P., J. A. Coronella, et al. (2001). "Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products." European Journal of Biochemistry **268**(10): 2912-2923.
- Sinning, I., G. J. Kleywegt, et al. (1993). "Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes." J Mol Biol **232**(1): 192-212.

- Slifman, N. R., D. A. Loegering, et al. (1986). "Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein." *J Immunol* **137**(9): 2913-2917.
- Small, K., J. Iber, et al. (1997). "Emerin deletion reveals a common X-chromosome inversion mediated by inverted repeats." *Nat Genet* **16**(1): 96-99.
- Smith, A. P., S. D. Nourizadeh, et al. (2003). "Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids." *Plant J* **36**(4): 433-442.
- Souciet, J. L., B. Dujon, et al. (2009). "Comparative genomics of protoploid Saccharomycetaceae." *Genome Res* **19**(10): 1696-1709.
- Srinivasan, U., P. A. Mieyal, et al. (1997). "pH profiles indicative of rate-limiting nucleophilic displacement in thioltransferase catalysis." *Biochemistry* **36**(11): 3199-3206.
- Stajich, J. E., S. K. Wilke, et al. (2010). "Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(26): 11889-11894.
- Stankiewicz, P. and J. R. Lupski (2002). "Genome architecture, rearrangements and genomic disorders." *Trends Genet* **18**(2): 74-82.
- Stebbins, G. L. (1950). *Variation and evolution in plants*. New York,, Columbia University Press.
- Stephens, S. G. (1951). "Possible significances of duplication in evolution." *Adv Genet* **4**: 247-265.
- Stock, D. W., D. L. Ellies, et al. (1996). "The evolution of the vertebrate Dlx gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10858-10863.
- Stourman, N. V., M. C. Branch, et al. (2011). "Structure and function of YghU, a nu-class glutathione transferase related to YfcG from *Escherichia coli*." *Biochemistry* **50**(7): 1274-1281.
- Summer, K. H., D. Klein, et al. (1996). "2-Chloroacetophenone is an effective glutathione depletor in isolated rat hepatocytes." *Arch Toxicol* **71**(1-2): 127-129.
- Suzuki, H., J. MacDonald, et al. (2012). "Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosa* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize." *BMC Genomics* **13**(1): 444.
- Syed, K. and J. S. Yadav (2012). "P450 monooxygenases (P450_{ome}) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*." *Crit Rev Microbiol* **38**(4): 339-363.
- Taguchi, K., M. Shimada, et al. (2008). "Redox cycling of 9,10-phenanthraquinone to cause oxidative stress is terminated through its monoglucuronide conjugation in human pulmonary epithelial A549 cells." *Free Radic Biol Med* **44**(8): 1645-1655.
- Tallman, M. S., S. A. Abutalib, et al. (2007). "The double hazard of thrombophilia and bleeding in acute promyelocytic leukemia." *Semin Thromb Hemost* **33**(4): 330-338.
- Tang, A. H. and C. P. Tu (1994). "Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21." *J Biol Chem* **269**(45): 27876-27884.

- Thom, R., D. P. Dixon, et al. (2001). "The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism." *J Mol Biol* **308**(5): 949-962.
- Thompson, R. M., N. Gerber, et al. (1972). "Identification of 2-methyl-1,4-naphthohydroquinone monoglucuronide as a metabolite of 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) in rat bile." *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **4**(3): 543-552.
- Thuillier, A., A. A. Ngadin, et al. (2011). "Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class." *Int J Evol Biol* **2011**: 938308.
- Tien, M. and T. K. Kirk (1983). "Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds." *Science* **221**(4611): 661-663.
- Tien, M. and C. P. Tu (1987). "Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*." *Nature* **326**(6112): 520-523.
- Tipping, E. and B. Ketterer (1981). "The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes." *Biochem J* **195**(2): 441-452.
- Tipping, E., B. Ketterer, et al. (1978). "The binding of porphyrins by ligandin." *Biochem J* **169**(3): 509-516.
- Tobiason, D. M. and H. S. Seifert (2006). "The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid." *PLoS Biol* **4**(6): e185.
- Tomb, J. F., O. White, et al. (1997). "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Nature* **388**(6642): 539-547.
- Toung, Y. P., T. S. Hsieh, et al. (1993). "The glutathione S-transferase D genes. A divergently organized, intronless gene family in *Drosophila melanogaster*." *J Biol Chem* **268**(13): 9737-9746.
- Tucker, S. L., J. Reece, et al. (2010). "Evolutionary history of plant multisubunit RNA polymerases IV and V: subunit origins via genome-wide and segmental gene duplications, retrotransposition, and lineage-specific subfunctionalization." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **75**: 285-297.
- Valli, K. and M. H. Gold (1991). "Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*." *J Bacteriol* **173**(1): 345-352.
- Vanden Wymelenberg, A., J. Gaskell, et al. (2011). "Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species." *Appl Environ Microbiol* **77**(13): 4499-4507.
- Vanden Wymelenberg, A., J. Gaskell, et al. (2009). "Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression." *Appl Environ Microbiol* **75**(12): 4058-4068.
- Vanden Wymelenberg, A., J. Gaskell, et al. (2010). "Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*." *Appl Environ Microbiol* **76**(11): 3599-3610.

- Vanin, E. F. (1985). "Processed pseudogenes: characteristics and evolution." Annu Rev Genet **19**: 253-272.
- Vollhardt, K. P. C. S., N. E. (1999). Organic Chemistry-Structure and Function, 3rd ed.
- Vuilleumier, S. (1997). "Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for?" J Bacteriol **179**(5): 1431-1441.
- Vuilleumier, S. and M. Pagni (2002). "The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes." Appl Microbiol Biotechnol **58**(2): 138-146.
- Wadington, M. C., J. E. Ladner, et al. (2009). "Analysis of the structure and function of YfcG from *Escherichia coli* reveals an efficient and unique disulfide bond reductase." Biochemistry **48**(28): 6559-6561.
- Waldman, A. S. and R. M. Liskay (1988). "Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology." Mol Cell Biol **8**(12): 5350-5357.
- Walsh, B. (2003). "Population-genetic models of the fates of duplicate genes." Genetica **118**(2-3): 279-294.
- Walsh, J. B. (1995). "How often do duplicated genes evolve new functions?" Genetics **139**(1): 421-428.
- Wang, R. W., D. J. Newton, et al. (1992). "Site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase YaYa. Important roles of tyrosine 9 and aspartic acid 101 in catalysis." J Biol Chem **267**(28): 19866-19871.
- Wang, W. and N. Ballatori (1998). "Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions." Pharmacol Rev **50**(3): 335-356.
- Wapinski, I., A. Pfeffer, et al. (2007). "Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi." Nature **449**(7158): 54-61.
- Wefers, H. and H. Sies (1983). "Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate: relation to glutathione and NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase) activity." Arch Biochem Biophys **224**(2): 568-578.
- Wei, S. H., A. G. Clark, et al. (2001). "Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*." Insect Biochem Mol Biol **31**(12): 1145-1153.
- Whitbread, A. K., A. Masoumi, et al. (2005). "Characterization of the omega class of glutathione transferases." Methods Enzymol **401**: 78-99.
- Whitham, T. G., J. K. Bailey, et al. (2006). "A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems." Nat Rev Genet **7**(7): 510-523.
- Wickner, R. B. (1994). "[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **264**(5158): 566-569.

- Widmark, G. and S. G. Blohm (1957). "A comparative study of the autoxidation of Delta-3-carene, Alpha-pinene, Beta-pinene and (+)-limonene." Acta Chemica Scandinavica **11**(2): 392-394.
- Wilce, M. C., S. C. Feil, et al. (1994). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a glutathione S-transferase from the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*." J Mol Biol **236**(5): 1407-1409.
- Wilce, M. C. and M. W. Parker (1994). "Structure and function of glutathione S-transferases." Biochim Biophys Acta **1205**(1): 1-18.
- Winter, C. K., H. J. Segall, et al. (1987). "Distribution of trans-4-hydroxy-2-hexenal and tandem mass spectrometric detection of its urinary mercapturic acid in the rat." Drug Metab Dispos **15**(5): 608-612.
- Wolfe, K. H. and D. C. Shields (1997). "Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome." Nature **387**(6634): 708-713.
- Xun, L., S. M. Belchik, et al. (2010). "S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases." Biochem J **428**(3): 419-427.
- Yokoyama, S. and R. Yokoyama (1989). "Molecular evolution of human visual pigment genes." Mol Biol Evol **6**(2): 186-197.
- Young, J. D., C. G. Peterson, et al. (1986). "Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein." Nature **321**(6070): 613-616.
- Zakharyan, R. A. and H. V. Aposhian (1999). "Arsenite methylation by methylvitamin B12 and glutathione does not require an enzyme." Toxicol Appl Pharmacol **154**(3): 287-291.
- Zakharyan, R. A., A. Sampayo-Reyes, et al. (2001). "Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily." Chem Res Toxicol **14**(8): 1051-1057.
- Zardoya, R., E. Abouheif, et al. (1996). "Evolutionary analyses of hedgehog and Hoxd-10 genes in fish species closely related to the zebrafish." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13036-13041.
- Zaslaver, A., A. Bren, et al. (2006). "A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*." Nat Methods **3**(8): 623-628.
- Zhang, J., H. F. Rosenberg, et al. (1998). "Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3708-3713.
- Zhang, Z. R., M. Bai, et al. (2008). "'Restoration' of glutathione transferase activity by single-site mutation of the yeast prion protein Ure2." J Mol Biol **384**(3): 641-651.
- Zhang, Z. R. and S. Perrett (2009). "Novel glutaredoxin activity of the yeast prion protein Ure2 reveals a native-like dimer within fibrils." J Biol Chem **284**(21): 14058-14067.
- Zheng, J., M. Cho, et al. (1997). "Evidence of quinone metabolites of naphthalene covalently bound to sulfur nucleophiles of proteins of murine Clara cells after exposure to naphthalene." Chem Res Toxicol **10**(9): 1008-1014.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications:

Meux E., Prosper P., Masai E., Mulliert G., Dumarçay S., Morel M., Didierjean C., Gelhaye E., Favier F. (2012)

Sphingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathionetransferase Omega class. **FEBS Lett.**, **586 (22)** 3944-50

Meux E., Morel M., Lamant T., Gérardin P., Jacquot J.P., Dumarçay S., Gelhaye E. (2013)

New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega Glutathione transferases. **Biochimie**, **95 (2)** 336-46

Morel M., **Meux E.**, Mathieu Y., Thuillier A., Chibani K., Harvengt L., Gelhaye E. (2012).

Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. **Microbial Biotechnology**, *sous presse*

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., 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)** 39001-11

Jacquot J.P., Dietz K.J., Rouhier N., **Meux E.**, Lallement P.A., Selles B., Hecker A. (2013).

Redox regulation in plants: Glutathione and "Redoxin" related families. **Oxidative Stress and Redox Regulation**, *Springer Science, sous presse*

Meux E., Prosper P., Ngadin A., Didierjean C., Morel M., Dumarçay S., Lamant T., Jacquot J.P., Favier F., Gelhaye E. (2010).

Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: a S-glutathionyl-p-hydroquinone reductases belongs to a new structural class. **The journal of Biological Chemistry**, **286 (11)** 9162-9173

Meux E., Lallement P.A., Morel M., Hecker A., Dumarcay S., Gelhaye E.

Reduction of S-(glutathionyl)-benzoquinone by Glutathione hydroquinone reductases. **Biochemistry (en préparation)**

Meux E., Gelhaye E., Morel M. (2011).

Caractérisation fonctionnelle de glutathion transférases de *Phanerochaete chrysosporium*. Séminaire 2011 de l'Ecole Doctorale RP2E « Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement ». ISBN 2-9518564-9-0

Posters:

Meux E., Morel M., Ngadin A., Favier F., Prosper P., Jacquot JP, Didierjean C, Gelhaye E

The Omega Glutathione S-transferases of *Phanerochaete chrysosporium* : Structural and biochemical characterization. **IMC9: The Biology of Fungi Edinburgh, UK 1-6 August 2010**

Meux E., Ngadin A, Didierjean C,, Jacquot JP, Favier F, Gelhaye E. Morel M

The glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium* : focus on the Omega class. **Asilomar meeting Monterrey CA USA. Mars 2011.**

Résumé : *Phanerochaete chrysosporium* est un champignon modèle étudié en particulier pour ses capacités ligninolytiques et son aptitude à dégrader un grand nombre de polymères aromatiques toxiques dérivés notamment des hydrocarbures polycycliques. Durant ces processus de dégradation, une multitude de composés hautement réactifs et toxiques pour les cellules vont dans un premier temps être générés puis dégradés ou excrétés hors de la cellule. Le séquençage complet du génome de *P. chrysosporium* a permis d'identifier plusieurs superfamilles d'enzymes impliquées dans les mécanismes de tolérance à ces composés toxiques. Parmi elles, les glutathion transférases sont présentes au sein de tous les règnes du vivant et constituent une superfamille multigénique jouant un rôle dans la protection cellulaire et la détoxification. Cependant, en dépit de nombreuses études réalisées en particulier chez les vertébrés, le rôle joué par ces enzymes dans la détoxification des dérivés aromatiques toxiques est encore inconnu chez les basidiomycètes. L'analyse comparative des séquences de GST présentes au sein des différents règnes du vivant révèle que les GST fongiques ont évolué différemment de leurs orthologues, notamment via l'extension de sous-classes très peu représentées chez les vertébrés. Parmi elles, les GST à cystéine catalytique représentent 30 % de cette superfamille d'enzymes chez *P. chrysosporium*. Trois isoformes fongiques ainsi qu'une protéine orthologue exprimée chez une bactérie lignivore ont été caractérisées *in vitro* tant au niveau biochimique que structural. Ces enzymes sont impliquées dans la déglutathionylation d'une grande variété de molécules électrophiles potentiellement toxiques et issues notamment de la dégradation de polymères aromatiques halogénés. La recherche de substrats a permis d'identifier plusieurs classes fonctionnelles. Cependant, l'activité des différentes isoformes s'effectue dans tous les cas via l'attaque directe du conjugué glutathionylé par la cystéine catalytique, qui est dans un deuxième temps régénérée par un réducteur. L'analyse comparée prouve également l'existence d'une nouvelle classe structurale et fonctionnelle appelée glutathionyl hydroquinone réductase absente chez les vertébrés. Ces protéines présentent un mode de dimérisation original ainsi que la capacité tout à fait particulière de déglutathionyliser les quinones. Ces résultats suggèrent que les champignons ont développé des mécanismes de résistance en réponse à des contraintes environnementales, notamment via l'évolution de familles multigéniques telles que les GST à cystéine catalytique qui sont impliquées dans le métabolisme et la tolérance vis-à-vis d'une grande variété de composés d'origine exogène ou endogène.

Mots clés : *Phanerochaete chrysosporium*, famille multigénique, évolution, Glutathion transférases, cystéine, hydroquinone, détoxification

Abstract: *Phanerochaete chrysosporium* is a model fungus well studied for its lignolytic properties towards wood compounds and various toxic aromatic derivatives such as polycyclic aromatic hydrocarbons. These degradation processes lead first to the formation of highly reactive and toxic compounds, which are then catabolized or excreted outside the cell. Genomic data allowed the identification of genes coding for superfamilies of enzymes putatively involved in these tolerance mechanisms. Among them, glutathione transferases are present in all kingdoms and constitute a multigenic superfamily of enzymes involved in cell protection and detoxification. However, although numerous studies have been performed on vertebrate enzymes, the role of these enzymes in the detoxification of toxic aromatic compounds is still unknown in basidiomycetes. The comparative analysis of GST sequences from various kingdoms of life reveals that fungal GSTs have evolved differently from their orthologs, in particular through the expansion of sub-classes poorly represented in vertebrates. Among them, GSTs with a catalytic cysteine represent 30% of this superfamily of enzymes in *P. chrysosporium*. Three Cys containing fungal isoforms have been characterized at the biochemical and structural levels, including an orthologue from lignolytic bacteria. All these enzymes are involved in deglutathionylation processes using a wide range of aromatic halogenated electrophilic compounds, including potentially toxic derivatives arising from the degradation of halogenated aromatic polymers. This GSTs family can be organized in various functional groups based on their substrate specificities, but still the catalytic process remains the same with the direct attack of the glutathionylated compound by the catalytic cysteine which is then reduced and regenerated. The comparative analysis of three isoforms revealed a new structural and functional class called glutathionyl hydroquinone reductase absent in vertebrates. These proteins exhibit a new mode of dimerization as well as the ability to deglutathionylate quinones. These results suggest that fungi have developed resistance mechanisms in response to environmental stresses, notably through the evolution of multigenic families such as catalytic cysteine bearing GSTs which are likely involved in the metabolism and tolerance towards a wide range of exogenous or endogenous compounds.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*, multigenic family, Glutathione transferases, evolution, cysteine, hydroquinone, detoxification
