

## Rôle des extractibles de bois face à la dégradation fongique

NOËL Delphine<sup>1</sup>, NGUYEN Duy Vuong<sup>1</sup>, AMUSANT Nadine<sup>2</sup>, GELHAYE Eric<sup>1</sup>,  
MOREL-ROUHIER Mélanie<sup>1</sup>, SORMANI Rodney<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Université de Lorraine, INRAE, IAM UMR1136, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup>UA, AgroParisTech, UMR Ecofog, CIRAD, CNRS, INRAE, BF701, Kourou, France

<sup>3</sup>[rodney.sormani@univ-lorraine.fr](mailto:rodney.sormani@univ-lorraine.fr)

**Mots clefs :** extractibles ; *Phanerochaete chrysosporium* ; dégradation fongique ; génétique.

### Contexte et objectifs

Les champignons lignolytiques sont caractérisés par leur capacité à dégrader et à utiliser les trois composants majeurs du bois que sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Cependant, les processus oxydatifs utilisés par ces champignons pour décomposer le bois génèrent une myriade de molécules potentiellement toxiques, incluant des composés appelés extractibles de bois.

Les extractibles sont des composants non structuraux du bois qui peuvent être extraits par l'action de différents solvants. Ce sont des métabolites secondaires produits par la plante lors de la formation du bois. Ils donnent aux différentes essences de bois leurs couleurs, odeurs et sont en partie responsables de leur durabilité naturelle (Perrot et al. 2020). Cependant, la composition d'un bois en extractibles varie en fonction de l'espèce, selon le tissu, l'origine géographique et est dépendante de l'espèce de bois (Kebbi-Benkeder et al. 2015). Ces composés constituent généralement 2 à 8% de la biomasse du bois et certaines fois davantage dans le cas d'espèces tropicales.

Précédemment, des activités antifongiques ont été démontrées à partir d'extractibles de bois et ont été attribuées à plusieurs mécanismes (Valette et al., 2017). Conséquemment, pour faire face à l'activité antifongique des extractibles de bois et s'adapter à cet environnement toxique, les champignons lignolytiques ont développé différentes stratégies de détoxification (Morel et al. 2013).

Chez le champignon *Phanerochaete chrysosporium*, modèle d'étude pour la dégradation du bois, certains acteurs moléculaires ont été identifiés comme étant impliqués dans les processus de détoxification des extractibles (Thuillier et al. 2014, Perrot et al. 2018). Cependant, afin d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans ce processus une stratégie de génétique directe a ainsi été élaborée chez le champignon *P. chrysosporium* RP78. Cette stratégie consiste en trois étapes : (i) identifier une molécule toxique, (ii) générer et cribler des mutants de *P. chrysosporium* résistants à la molécule toxique, (iii) enfin, identifier les mutations présentes chez ces mutants (Nguyen 2020). *In fine*, l'objectif est de déterminer quel est le gène muté responsable du phénotype de résistance, et ainsi d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans le système de détoxification de *P. chrysosporium*.

### Matériels et Méthodes

#### *Souches fongiques*

La souche *P. chrysosporium* RP78 notée WT et des mutants de *P. chrysosporium* RP78 résistants à des extractibles de bois de *Bagassa guianensis* (*bag1*, *bag4* and *bag31*) (Nguyen, 2020) ont été utilisés.

### Bois et extractibles de bois

Des copeaux de bois de duramen de *B. guianensis* ont été obtenus auprès de la scierie *Dégrad Saramaca* (Kourou, French Guiana). Les copeaux de bois de *B. guianensis* ont été broyés en particules de 0.2 à 0.4mm et extraits à l'acétone par Soxhlet sur une période de 24 heures (Perrot et al. 2018). Les extractibles de bois sont ensuite conservés à -20°C.

### Résultats

#### *Inhibition de la croissance de P. chrysosporium RP78 en présence d'extractibles de bois de B. guianensis (BWE pour Bagassa Wood Extractives)*

Le phénotype de croissance de *P. chrysosporium RP78* a été évalué sur une période de 3 jours en réponse à différentes concentrations de BWE et en comparaison à un milieu contrôle sans extractible de bois. Les résultats ont montré une inhibition de la croissance de *P. chrysosporium* en présence de BWE en comparaison au milieu contrôle (Fig. 1A). Ces résultats confirment ainsi les propriétés antifongiques des BWE et permettent de définir les concentrations d'extractibles appropriées pour réaliser un criblage de mutants de *P. chrysosporium* résistants aux BWE (100µg.mL<sup>-1</sup>) (Nguyen, 2020).

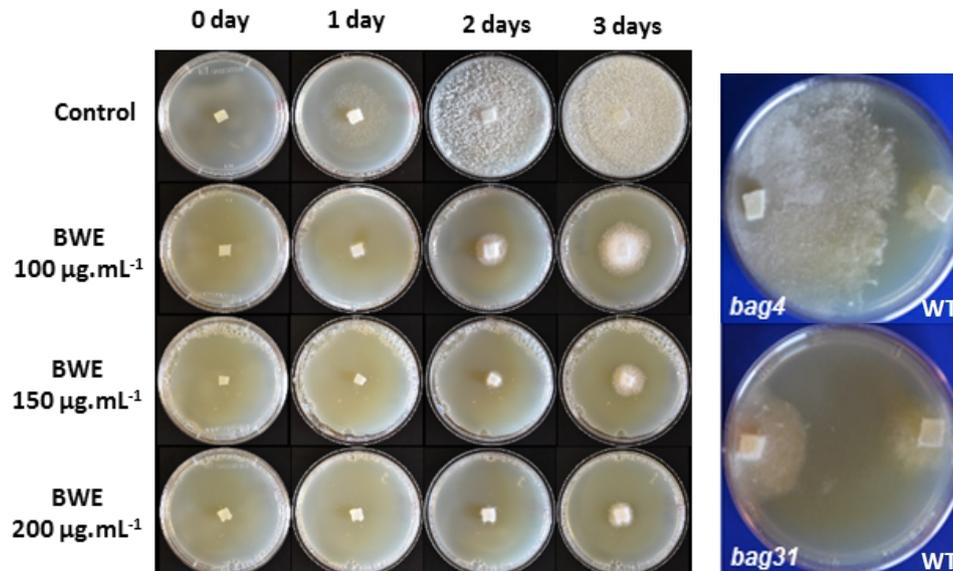


Fig.1 : Effet des BWE sur la croissance de *P. chrysosporium* WT et de mutants *bag*.

A. Inhibition de la croissance de *P. chrysosporium* WT en réponse à différentes concentrations de BWE. Un plug de mycélium de *P. chrysosporium RP78* a été inoculé sur un milieu 2% Malt-Agar (Contrôle) ou sur un milieu 2% Malt-Agar supplémenté en BWE à différentes concentrations (100 µg.mL<sup>-1</sup>, 150 µg.mL<sup>-1</sup>, 200 µg.mL<sup>-1</sup>).

B. Phénotype de croissance des mutants *bag4* et *bag31* en comparaison au WT en réponse aux BWE (100 µg. mL<sup>-1</sup>).

#### *Isolation et caractérisation de mutants de P. chrysosporium RP78 résistants aux BWE*

Une collection de 35 mutants résistants aux BWE a été générée *via* mutagenèse aléatoire aux UV suivi par un criblage sur milieu sélectif (100 µg.mL<sup>-1</sup> de BWE). Cette collection de mutants a été nommée '*bag*' en référence aux BWE. La croissance des mutants *bag* a été suivie avec *P. chrysosporium* WT sur milieu sélectif (100 µg.mL<sup>-1</sup> de BWE) et a montré une croissance accrue des mutants en comparaison au WT. Au sein de la collection *bag*, deux mutants, *bag4* et *bag31*, ont montré un intérêt particulier en raison de leur important phénotype de résistance en comparaison au WT (Fig. 1B) (Nguyen 2020).

*La résistance aux BWE conduit à une augmentation du taux de dégradation de B. guianensis par P. chrysosporium*

Les phénotypes de croissance de *P. chrysosporium* WT et du mutant *bag4* ont été observés en présence de copeaux de bois de *B. guianensis*. Après 25 jours de croissance à 37°C, une expansion de mycélium a été observée pour le mutant *bag4* contrairement au WT (Fig. 2A).

Après 2 mois de croissance à 37°C, les pertes de masse ont été déterminées pour les mutants *bag1*, *bag4* et *bag31* et ont été comparées au WT. Les résultats ont montré une perte de masse significative pour les mutants *bag4* et *bag31* en comparaison au WT (p-value de 0,041 et 0,0019 respectivement). Le mutant *bag1* a exposé également une perte de masse plus importante mais non significative en comparaison au WT (p-value de 0,157) (Fig. 2B). Ces résultats démontrent une augmentation du taux de dégradation de *B. guianensis* par des mutants résistants aux extractibles trouvés dans cette essence de bois en comparaison au WT. Ainsi, pour la première fois *in situ*, une relation entre le taux de dégradation de bois et le rôle des extractibles face à des attaques fongiques a été établie à un niveau physiologique. Cette expérience sera renouvelée avec des éprouvettes de bois suivant la norme EN 350-1 incluant de légères modifications.

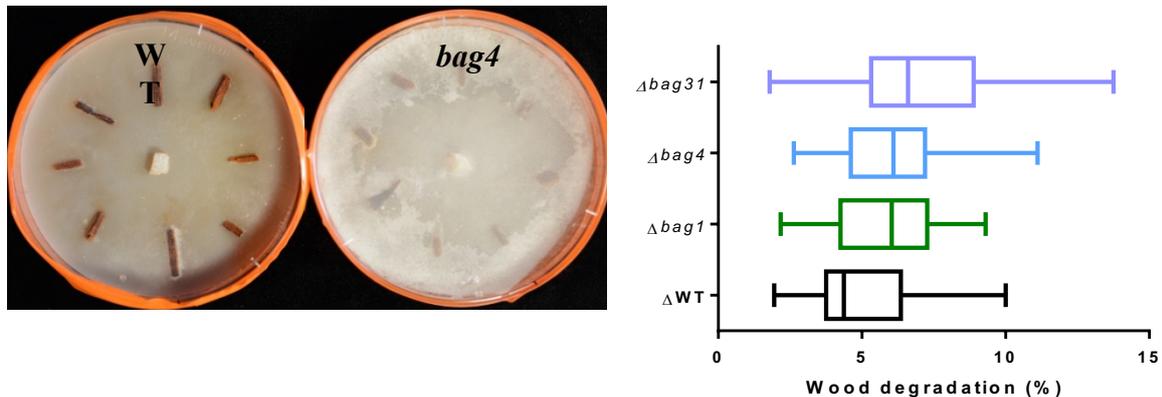


Fig.2 : Tests de dégradation de copeaux de bois de *B. guianensis* par *P. chrysosporium* WT et des mutants *bag*.

A. Phénotype de croissance de *P. chrysosporium* WT et du mutant *bag4* en présence de copeaux de bois de *B. guianensis* après 25 jours de croissance à 37°C.

B. Boîte à moustache représentant les taux de dégradation des copeaux de bois par *P. chrysosporium* WT et les mutants *bag1*, *bag4* et *bag31* après deux mois de croissance à 37°C. L'axe des abscisses représente le pourcentage de dégradation des copeaux de bois et l'axe des ordonnées représente les génotypes des individus expérimentés. Pour chaque individu, les boîtes à moustache indiquent le 1<sup>er</sup> quartile, le 3<sup>ème</sup> quartile, la médiane et la déviation standard à partir des pertes de masse enregistrées. Les pertes de masse ont été calculées à partir de 32 réplicats techniques provenant de 4 réplicats biologiques. Un astérisque fait référence à une p-value < 5% et deux astérisques à une p-value < 1%.

## Conclusion et perspectives

Parmi les champignons dégradateurs de bois, *P. chrysosporium* est considéré comme un modèle pour les études portant sur la dégradation du bois. Toutefois le manque d'outils génétiques a limité son étude durant les dernières années. Afin de mieux comprendre comment et pourquoi les extractibles ont un rôle protecteur face à la dégradation fongique, la production de mutants

résistants aux extractibles de bois de Bagasse a été entreprise. Il a été observé que ces mutants dégradent mieux ce bois que des champignons sauvages. La caractérisation de ces mutants devrait ainsi nous permettre de comprendre comment et pourquoi les BWE confèrent au bois dont ils sont issus sa durabilité.

## Références

Kebbi-Benkeder Z., Colin F., Dumarça S., Gérardin P. (2015) Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Annals of Forest Science*, 72(2), 277-284. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0428-7>

Morel M., Meux E., Mathieu Y., Thuillier A., Chibani K., Harvengt L., Jacquot J.-P., Gelhaye, E. (2013) Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microbial Biotechnology*, 6(3), 248-263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12015>

Nguyen D.V. (2020) Isolation and characterization of *Phanerochaete chrysosporium* mutants resistant to antifungal compounds. *Mycology*. Université de Lorraine, English. (NNT : 2020LORR0045). (tel-02940144)

Perrot T., Salzet G., Amusant N., Beauchêne J., Gérardin P., Dumarçay S., Sormani R., Morel-Journel T., Gelhaye E. (2020) A reverse chemical ecology approach to explore wood natural durability. *Microbial Biotechnology*.

Perrot T., Schwartz M., Saiag F., Salzet G., Dumarçay S., Favier F., Gérardin, P., Girardet J.-M., Sormani R., Morel-Rouhier M., Amusant N., Didierjean C., Gelhaye, E. (2018) Fungal Glutathione Transferases as Tools to Explore the Chemical Diversity of Amazonian Wood Extractives. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(10), 13078-13085. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02636>

Thuillier A., Chibani K., Belli G., Herrero E., Dumarçay S., Gérardin P., Kohler A., Deroy A., Dhalleine T., Bchini R., Jacquot J.-P., Gelhaye E., Morel-Rouhier M. (2014) Transcriptomic responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak acetic extracts: Focus on a new glutathione transferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(20), 6316-6327. <https://doi.org/10.1128/AEM.02103-14>

Valette N., Perrot T., Sormani R., Gelhaye E., Morel-Rouhier M. (2017) Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 113-123. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.01.002>