

**ÉTUDE COMPARATIVE DES ISOENZYMES DE LA LACCASE ISSUES DU
CHAMPIGNON À POURRITURE BLANCHE *TRAMETES HIRSUTA*.
CARACTÉRISATION POUR UNE APPLICATION À LA BIOREMÉDIATION D'UN
EFFLUENT DE STATION D'ÉPURATION**

par

Younès El Yagoubi

Mémoire présenté au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 2023

Le 14 juillet 2023

*Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Younès El Yagoubi
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Pedro Segura
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeur Hubert Cabana
Codirecteur de recherche
Département de génie civil

Professeur Philippe Dauphin Ducharme
Évaluateur interne
Département de chimie

Professeur Jean-Philippe Bellenger
Président-rapporteur
Département de chimie

SOMMAIRE

La bioremédiation des composés pharmaceutiques contenus dans les eaux usées des traitements de stations d'épuration (STEP) par des processus écologiques et soutenables pour l'environnement est possible par l'utilisation d'enzymes possédant des propriétés d'oxydoréduction sécrétées par des champignons à pourriture blanche, nommés laccase. Ces champignons sont dotés de plusieurs gènes différents codant pour la sécrétion de la laccase possédant une séquence peptidique légèrement différentes lui conférant ainsi des caractéristiques physico-chimiques propres, appelés isoenzymes. Néanmoins, hormis pour la laccase constitutive, qui est produite systématiquement, il est quasiment impossible de prévoir quels gènes seront activés et donc quelles autres laccases seront produites, appelés laccases inductibles, produites dépendamment de nombreux facteurs encore mal connus. Aujourd'hui, la découverte de nouvelles isoenzymes possédant des caractéristiques physico-chimiques uniques pousse les chercheurs à identifier la plus appropriée pour une application donnée. Par exemple, pour la bioremédiation des composés pharmaceutiques contenus dans un effluent de STEP, les paramètres visés seraient la stabilité dans un milieu complexe et de bonnes performances catalytiques. Parmi les candidates possibles, plusieurs publications scientifiques indiquent le fort potentiel de la souche *Trametes hirsuta* pour cette application. L'objectif de cette étude est d'identifier et de caractériser les laccases sécrétées par la souche *Trametes hirsuta* IBB450 pour la bioremédiation de composés pharmaceutiques.

Cette étude de caractérisation d'isoenzymes se distingue par son exhaustivité, en prenant en considération l'ensemble des difficultés majeures rencontrées à travers la littérature telles que : la bonne purification des isoenzymes, la détermination de constantes enzymatiques, ou en utilisant différents paramètres pertinents comme un effluent de station d'épuration (STEP) et des composés d'intérêt environnemental comme le diclofénac (DCL) ou le 17 α -éthynylestradiol (EE2). De plus, les études des effets de synergies et également de l'influence de la température sur la bonne transformation du substrat ont été réalisées alors qu'elles restent rares voire inexistantes. Enfin, cette étude reprend le concept de classification des laccases et développe des outils afin d'améliorer et de faciliter cette classification pour proposer une nouvelle méthodologie de travail basée sur l'identification du groupe le plus pertinent pour une application donnée plutôt que l'identification d'une laccase précise.

La présence de deux enzymes majoritaires a été observée par différentes techniques d'analyses électrophorétique sur gel. Leur purification chromatographique a été un succès, permettant ainsi d'obtenir deux échantillons purifiés distincts. Les analyses d'empreintes peptidiques a permis de confirmer la présence de deux laccases principales, nommées Y_g et Y_n . Ces laccases ont subi différents tests de robustesses (tolérance et stabilité), indiquant un impact relativement similaire après avoir été exposés à différents ions, solvant organiques, divers composés organiques et métaux. Parallèlement, aucun impact significatif n'a été mesuré d'un effluent de STEP sur l'activité enzymatique, ne permettant que difficilement la détermination de l'isoenzyme la plus robuste. Des études cinétiques ont été effectuées en prenant le DCL et l'EE2 comme substrats. La détermination de la constante de Michaelis-Menten (K_M) et de la constante catalytique (k_{cat}) indique des valeurs plus faible pour la laccase Y_n . Toutefois l'efficacité catalytique K ($K=k_{cat}/K_M$) reste relativement similaire, ne permettant pas d'identifier clairement la plus performante. Parallèlement, l'utilisation des deux groupes de laccases dans un mélange 50:50 a permis d'observer des effets synergiques pour la transformation du DCL, contrairement à l'EE2. Ces observations pourraient être en contradiction sur la stratégie de vouloir identifier et utiliser une seule isoenzyme. L'influence de la température a été déterminée afin d'évaluer l'impact d'une bioremédiation dans des conditions froides. Les résultats indiquent une baisse d'environ 80% contre 25% pour l'EE2 et le DCL respectivement à 4 °C *versus* 20 °C de la cinétique de transformation, montrant ainsi un fort potentiel pour leurs utilisations, même dans des pays froids.

Certains laboratoires de recherche travaillent activement sur la classification des laccases. Parmi celles-ci, en se basant sur des propriétés physico-chimiques communes, les laccases pourraient se trier dans huit groupes (groupe A, groupe B... groupe H). Il se pourrait que les études de classification des laccases soient l'une des solutions possibles aux trois limitations : i) le partage des résultats à travers la littérature reste difficile à la vue du nombres importants de laccases existants, ii) l'absence de normalisation des résultats et iii) la difficulté à identifier les isoenzymes caractérisées. C'est pourquoi nous proposons une nouvelle méthodologie de caractérisation des laccases basées sur la comparaison des groupes entre eux et non des laccases. Pour ce faire, la première étape serait de caractériser les isoenzymes de l'extrait puis de les affilier à un groupe afin de conclure sur le potentiel de ce groupe à une application donnée. Néanmoins, les outils permettant une classification simple étant peu développés, nous en proposons une à partir de quatre paramètres physico-chimiques facilement déterminable, qui sont le point isoélectrique,

la masse moléculaire, le temps de demi-vie à 60 °C et le K_M . Il nous a été permis d'affilier la laccase Y_g parmi les laccases issues du groupe A (laccase constitutive) et Y_n parmi les laccases issues du groupe B (laccase inductible), indiquant ainsi qu'une seule laccase inductible majoritaire semble avoir été sécrétée. Les explications de cette observation restent méconnues.

Elle a permis de confirmer l'intérêt de l'utilisation des laccases fongiques pour la bioremédiation d'un effluent de STEP par une robustesse suffisante et une capacité à pouvoir transformer différents composés d'intérêt environnemental, même à faible température. Même si la laccase Y_g semble légèrement plus robuste et possède un k_{cat} plus élevé que la laccase Y_n , les résultats globaux ne permettent pas de clairement la définir comme étant la plus intéressante. Finalement, parmi les huit groupes possibles (groupe A-H), cette étude permet d'obtenir des résultats sur deux de ces groupes (A et B), par l'intermédiaire de la laccase Y_g et Y_n , sans pouvoir conclure, à la vue des proches résultats obtenus, sur le groupe le plus adéquat pour une application à la bioremédiation d'un effluent de STEP. Des études supplémentaires sont requises pour caractériser les six autres groupes afin de conclure sur le plus adéquat pour la bioremédiation d'un effluent de STEP.

Mots clés : bioremédiation, température, constantes enzymatiques, composés pharmaceutiques, désorption thermique par diode laser, laccase A, laccase B

*« Ceci n'est pas la fin, ni même le commencement de la fin,
Mais c'est peut-être la fin du commencement »
- Winston Churchill (1874-1965) –*

REMERCIEMENTS

On ne le présente plus, il possède de façon certaine l'unanimité des étudiants ayant eu la chance de la côtoyé, et je ne fais pas exception à la règle. La béatitude, la *coolatitude* et la gentillesse infusent de sa personne à l'ensemble de son laboratoire, expliquant ainsi pourquoi ces trois ans de partage m'ont paru si brèves. Mais cet homme est avant tout la personnification de la rigueur scientifique. Tel un artiste avec sa toile, il scrute les moindres détails, les moindres défauts, les moindres manquements d'une œuvre avec une volonté de fer. Je veux bien-sûr parler du Professeur Pedro Segura. Parallèlement, par un heureux hasard, mon cosuperviseur a été le Professeur Hubert Cabana. Il s'agit là d'un des plus puissant effet de synergie possible ; parfaitement complémentaire professionnellement, ce duo explique en grande partie la réussite de cette étude. Tout au long de ces années, il a su contenir mes pulsions scientifiques par un exceptionnel sang-froid, s'illustrant par d'innombrables remarques telle que : « tout ceci reste spéculatif ». L'air impénétrable et mystérieux cache un personnage fortement sympathique, arrivant à créer une « atmosphère empreinte d'humanité » lors de chacune de nos rencontres. Finalement, la très belle surprise de cette étude : la rencontre d'un homme brillant dans son domaine, un professionnel de recherche dévoué et passionné, surnommant ce projet de « bonbon ». Il a fortement contribué à la réussite de cette étude, de façon totalement volontaire et désintéressé. Enfin, il m'a pris sous son aile en répondant à toutes mes questions, même les plus aberrantes, sans jamais s'essouffler. Merci Bruno Lemieux.

J'aimerais remercier les membre du jury, les professeurs Philippe Dauphin Ducharme et Jean-Philippe Bellenger de m'avoir assisté durant toutes ces années, et ont pris le temps de lire et d'évaluer ce mémoire. Une pensée à l'incroyable pragmatisme du Professeur Bellenger, qui m'a inspiré et m'a fait progresser. Également une pensée au Professeur Philippe Dauphin Ducharme pour sa joie de vivre et sa bonne humeur.

Un remerciement aux supports financiers, qui sans eux rien n'aurait été possible : le Gouvernement du Canada, le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles en en Génie du Canada (CRSNG), et le Programme de Formation Orientée vers la Nouveauté, la Collaboration et l'Expérience en Recherche et le Programme en Technologies Environnementales de Décontamination et Gestion Intégrée des Eaux et Effluents Résiduaire (FONCER-TEDGIEER) de m'avoir accordé une bourse et de m'avoir offert différents cours pertinents.

Probablement la personnalité la plus appréciée du département, il est le *joker* de chaque étudiant, *joker* que j'ai utilisé et réutilisé durant toutes ces années sans aucune contrepartie. En n'espérant ne pas avoir abusé de sa gentillesse, je veux bien-sûr parler de René Gagnon. Une pensée à Michel Trottier, pour sa gentillesse, sa dévotion et sa bonté. En lui souhaitant tout le meilleur pour la suite. Toute ma gratitude à Olivier Savary, un homme fort agréable et de confiance. Incontournable, je remercie Philippe Venne, l'homme au mille et une connaissance sur la spectrométrie de masse, pour son accompagnement tout au long de mes études. Finalement, une autre belle surprise, je remercie grandement le Professeur Claude Legault pour les éclaircissements et de m'avoir permis de comprendre cette thématique de recherche sous l'angle de la chimie organique.

Une pensée à différents personnages ayant contribué de près ou de loin à la bonne réussite de cette étude : Jean-Michel Boisvert, Dominique Lévesque, Danny Letourneau, Philippe Richter et Vincent Saint Onge...

Enfin, je dédie ce paragraphe aux étudiants du laboratoire d'Hubert Cabana et de Pedro Segura. Plus précisément à Komla Alokpa une personne fiable à qui je souhaite une fin heureuse pour sa dernière ligne droite ; Hugo Alarie qui a été le premier Québécois à me recevoir, m'accueillir, et me faire découvrir les magnifiques contrées de son pays ; Nicolas Nayrac mon plus fidèle compagnon de galère, de jour comme de nuit, à chaque jour de la semaine ; Annick-Dion, Valérie Boucher, Cassandra Guerette et Mégane Morreau ces femmes méritantes qui ont rendu mon quotidien agréable.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
REMERCIEMENTS	VII
TABLE DES MATIERES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	14
1.1 Les champignons à pourriture blanche	15
1.2. Les enzymes extracellulaires	16
1.3. La laccase.....	17
1.4. Les constantes catalytiques.....	21
1.5. Informations complémentaires sur les expériences	22
1.6. Limites et solutions envisagées.....	24
1.7. Objectifs.....	26
1.8. Référence	27
CHAPITRE 2. ÉTUDE COMPARATIVE DES ISOENZYMES DE LA LACCASE ISSUES DU CHAMPIGNON À POURRITURE BLANCHE <i>TRAMETES HIRSUTA</i> . CARACTÉRISATION POUR UNE APPLICATION AU TRAITEMENT DES EAUX USÉES	35
2.1. Introduction.....	38
2.2. Materials and Methods.....	40
2.2.1. Reagents and chemicals.....	40
2.2.2. Medium, fungal strain and culture conditions.....	41
2.2.3. Measurement of the enzymatic activity.....	41
2.2.4. Purification and separation of isoenzymes	42
2.2.5. Electrophoresis on polyacrylamide gel	43
2.2.6. Identification of laccase isoenzymes by peptide mass fingerprinting	43
2.2.7. Identification and properties of the laccase isoenzymes	44
2.2.8. Characterization and comparison of the laccase isoenzymes for application to bioremediation.....	45

2.2.8.1. <i>Quantification of trace organic contaminants by laser diode thermal desorption-triple quadrupole mass spectrometry</i>	45
2.2.8.2. <i>Tolerance tests</i>	46
2.2.8.3. <i>Stability tests</i>	46
2.2.8.4. <i>Transformation of pharmaceuticals</i>	47
2.2.8.5. <i>Statistical analysis</i>	48
2.3. Results.....	48
2.3.1. Purification of isoenzymes	48
2.3.2. Tentative identification of laccase isoenzymes	50
2.3.3. Characterization of the laccase isoenzymes for application to bioremediation	52
2.3.3.1. <i>Tolerance tests</i>	52
2.3.3.2. <i>Stability tests</i>	53
2.3.3.3. <i>Removal kinetics of EE2 and DCL by laccase Y_g and Y_n</i>	54
2.3.3.4. <i>Removal of DCL and EE2 at different temperatures by laccase Y_g</i>	54
2.4. Discussion.....	55
2.4.1. Purification of isoenzymes	55
2.4.2. Tentative identification of laccase isoenzymes	56
2.4.3. Characterization and comparison of the laccase isoenzymes for application to bioremediation.....	57
2.4.3.1. <i>Tolerance tests</i>	57
2.4.3.2. <i>Stability tests</i>	57
2.4.3.3. <i>Removal kinetics of EE2 and DCL by laccase Y_g and Y_n</i>	58
2.4.3.4. <i>Removal of DCL and EE2 at different temperatures by laccase Y_g</i>	59
2.4.3.5. <i>Classification of laccases</i>	60
2.5. Conclusion	62
2.6. Credit authorship contribution statement.....	63
2.7. Declaration of competing interest.....	63
2.8. Acknowledgements.....	63
2.9. References.....	64
CONCLUSION GENERALE	73
ANNEXE	77

LISTE DES ABREVIATIONS

STEP	Stations d'épuration des eaux usées municipales
WRF	Champignons à pourriture blanche
EEc	Enzyme extracellulaires
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
K_M	Constante de Michaelis-Menten
NaCl	Chlorure de sodium
ACN	Acétonitrile
EtOH	Éthanol
SDS	Dodécylsulfate de sodium
k_{cat}	Constante catalytique
K	Constante de vitesse apparente
LDTD	Désorption thermique par diode laser
MS	Spectromètre de masse
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
QqQ	Triple quadripôle
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
DCL	Diclofénac
EE2	17 α -éthynylestradiol
FPLC	en anglais, Fast Protein Liquid Chromatography
O ₃	Ozone
H ₂ O ₂	Peroxyde de dihydrogène
LC	Chromatographie liquide
TIMS	Spectrométrie de mobilité ionique
QTOF	Quadripôle – temps de vol

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Main results from peptide mass fingerprinting analysis of Y_n and Y_g using trypsin for digestion.	48
Tableau 2. Main results from peptide mass fingerprinting analysis from the digestion of Y_n and Y_g by chymotrypsin.	49
Tableau 3. Kinetic constants (K_M , k_{cat} , K) obtained by the two isoenzymes individually and mixed (1:1, w/w) taking ABTS, DCL and EE2 as substrate at pH 7. Error indicates the 95% confidence interval.	51
Tableau 4. Reference isoenzymes from <i>T. hirsuta 072</i> according to four key parameters [16,21,73]. ...	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1. À gauche : structure de l'urishiol. À droite : Réaction d'oxydation du benzènediol en benzosemiquinone catalysée par la laccase.....	17
Figure 2. Schéma simplifié du cycle catalytique de la laccase.	18
Figure 6. Schéma de fonctionnement de l'oligomérisation d'un composé récalcitrant.	18
Figure 7. Oligomérisation de la carbamazépine catalysée par la laccase par l'intermédiaire de l'acétaminophène.	19
Figure 8. Similarité des gènes de la laccase pour la souche <i>T. hirsuta</i> selon Savinosa et al. [16].	25
Figure 9. a) Chromatogram obtained by FPLC-SEC showing the proteins contained in the crude extract. b) Native-PAGE of the collected fractions. Orange line: Conductivity; Blue line: 280 nm; red line: 260 nm.....	49
Figure 10. a) Chromatogram obtained by FPLC-anion exchange chromatography showing the proteins contained in the previously purified extract by FPLC-SEC (Figure 9). b & c) Native-PAGE of the collected FPLC fractions. Orange line: Conductivity; Blue line: 280 nm; red line: 260 nm.....	50
Figure 11. Mean residual relative activity (%) of laccase Y_n and Y_g in the presence of diverse interferences. Error bars indicate standard deviations (n=3). Asterisks (*) indicate that the observed difference is statistically significant ($p < 0.05$).	53
Figure 12. Mean residual relative activity (%) of laccase Y_g and Y_n after 48 h of exposure to various denaturants (72 h at pH 4). Error bars indicate the standard deviations (n=3). Asterisks (*) indicate that the observed difference is statistically significant ($p < 0.05$).	53
Figure 13. Relative elimination of DCL and EE2 at 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%) as a function of time (h) at 4 and 21 °C and pH 7, by laccase Y_g	55

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

La croissance de la population humaine vivant dans les centres urbains et l'augmentation de la consommation des produits pharmaceutiques ont entraîné un volume plus important d'eaux usées contenant des composés pharmaceutiques devant être traitées par les stations d'épuration des eaux usées municipales (STEP) [1–3]. Comme exemple, les pays membres de l'organisation de coopération et de développement économiques, tels que la France, le Canada ou les États-Unis, ont vu la consommation d'hypocholestérolémiants presque quadruplée, et une consommation d'antihypertenseurs, d'antidiabétiques et d'antidépresseurs quasiment doublé entre 2000 et 2015 [4]. Bien que leurs concentrations dans l'environnement ne soient que de quelques microgrammes par litre, voire nanogramme par litre, elles peuvent impacter l'environnement. C'est le cas notamment du diclofénac (DCL), où, d'après l'étude d'Acuna et al (2015) faisant la synthèse de 107 publications sur la contamination du diclofénac dans « occurrence in freshwater ecosystems », sur 1264 échantillons analysés, la concentration moyenne mesurée a dépassé le 5^e centile de la plus petite concentration induisant un effet observé à hauteur de 42 % [5]. Mais également le 17 α -éthynylestradiol (EE2), ou sa concentration a été mesurée à plusieurs dizaines de ng L⁻¹ dans l'eau de surface, or une concentration de moins de 1 ng L⁻¹ peut avoir un impact observable, par exemple sur le cri des grenouilles mâles adultes durant 4 semaines [6–8].

Actuellement, les STEP ne sont pas conçues pour éliminer les composés pharmaceutiques et nécessitent un traitement tertiaire comme l'ozonation ou l'oxydation photocatalytique [9–12]. Cependant, ces traitements sont gourmands en énergie et ne réduisent pas forcément la toxicité des effluents [12–14]. En effet, les résultats de l'étude de Alharbi et al (2019) indiquent qu'après la transformation du diclofénac ou de la carbamazépine par ozonation ou par UV-photolyse, la solution restait toxique, contrairement à un traitement par la laccase fongique (section 1.2 et 1.3). Afin de développer des solutions plus durables pour le traitement des eaux usées, des approches plus écologiques de bioingénierie sont présentement étudiées pour la bioremédiation de contaminants émergents. Parmi les solutions proposées, l'utilisation des champignons à pourriture blanche (WRF) semble être prometteuse grâce à la facilité de production et son efficacité pour la bioremédiation de composés chimiques, comme les colorants industriels ou les composés pharmaceutiques [14,15] (section 1.1.).

1.1 Les champignons à pourriture blanche

L'ancêtre commun des WRF de la classe *Polyporaceae* aurait environ 80 millions d'années [16]. Il y eut une explosion du nombre de WRF de différentes souches, et ils se développèrent à travers la terre, même dans des endroits extrêmes comme en Himalaya (*Trametes hirsuta* MTCC 11397) [17]. Cela peut s'expliquer par l'émergence d'une méga-niche : un bois plus dur, plus complexe à dégrader favorisant le développement des WRF [16]. Parmi les multiples développements, la rapide multiplication des gènes codants pour la laccase, une des enzymes possédant des propriétés d'oxydoréduction en partie responsable de la dégradation du bois par dépolymérisation de la lignine (section 1.3.), a permis aux WRF d'avoir une meilleure adaptabilité et une meilleure chance de survie, expliquant sa longévité et son ubiquité [16]. Aujourd'hui, pour le genre *Trametes*, de nombreuses espèces ont été référencées : *T. hirsuta*, *T. versicolore*, *T. ochracea*, *T. gibbosa*, *T. villosa*, etc.

Parmi les espèces étudiées, des publications indiquent que *T. hirsuta* est l'une des espèces les plus prometteuses pour la transformation de composés phénoliques. De plus, sa capacité à pouvoir croître dans des biosolides permettant une production moins onéreuse la rendent appropriée à la bioremédiation des eaux de STEP [18,19]. Cela peut s'expliquer, entre autres, par la production de laccases (E.C.1.10.3.2), des enzymes dotées d'un pouvoir d'oxydoréduction parmi les plus élevés (plus d'informations à la section 1.3.) [20]. C'est pourquoi, elle bénéficie d'un traitement particulier, et de plus en plus d'études se portent sur la caractérisation de ses isoenzymes [21]. Les études concernant l'élimination de composés pharmaceutiques par les WRF du genre *Trametes* ont réellement explosées il y a une dizaine d'années avec des résultats très prometteurs : élimination complète en 48 h de l'acétaminophène, l'ibuprofène, l'indométacine, le kétoprofène, l'acide méfénamique et le naproxène [22–34]. Toutefois, leurs utilisations dans une STEP pose plusieurs difficultés techniques comme la gestion de la croissance de la biomasse du champignon, ainsi que sa survie dans un environnement non stérile [15]. En somme, l'utilisation directe de WRF à une échelle industrielle reste complexe.

À ce jour, les trois principaux procédés de bioremédiation basés sur les WRF sont : i) les enzymes intracellulaires du champignon (p. ex., cytochromes P450) ii) l'utilisation d'enzymes extracellulaires (EEc), ou iii) la bio-adsorption [34]. Il est donc possible d'obtenir un produit actif sans utiliser le WRF de façon directe : les EEc. L'activité des EEc reste suffisante pour transformer efficacement de nombreux

composés organiques, et son applicabilité à l'échelle industrielle semble prometteuse notamment grâce à leur immobilisation sur un support solide [35].

1.2. Les enzymes extracellulaires

Le WRF de l'espèce *T. hirsuta* produit un large panel d'EEc : des enzymes lignolytiques, des protéases, des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques ainsi qu'une quantité importante de cerato-platanines [36]. Les EEc d'intérêts possédant un potentiel d'oxydoréduction et responsables de la transformation des composés chimiques sont les oxydases et les peroxydases. Il existe deux enzymes principales chez les oxydases : la laccase (LAC ; EC 1.10.3.2) et la tyrosinase (TYR ; EC 1.14.18.1) [37,38]. Chez les peroxydases trois principales enzymes sont répertoriées : la manganèse peroxydase (MnP ; EC 1.11.1.13), la lignine peroxydase (LiP ; EC 1.11.1.14) et la versatile peroxydase (VP ; EC 1.11.1.16) [34]. L'une des différences entre les oxydases et les peroxydases est que l'accepteur final d'électron des oxydases est l' $O_{2(aq)}$, alors que l'accepteur final d'électron des peroxydases est l' $H_2O_{2(aq)}$. Toutes ces enzymes vont soutirer un électron au substrat, créant ainsi un radical instable et réactif (plus d'informations à la section 1.4.) [39]. Ce processus est thermodynamiquement possible si le potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme (oxydant) est supérieur au potentiel d'oxydoréduction du composé (plus d'informations à la section 1.4.). Les peroxydases possèdent un potentiel d'oxydoréduction supérieur à la laccase (1.2-1.5 V *versus* 0.4-0.8 V) [36,40-44]. La principale limitation des peroxydases est l'ajout systématique de $H_2O_{2(aq)}$ dans le milieu, ce qui limite leur utilisation à l'échelle industrielle. De plus, de petits composés organiques présents en solution peuvent inhiber l'activité enzymatique des peroxydase en rentrant en compétition avec le site destiné à l' $H_2O_{2(aq)}$ [45]. Or, l'accepteur final d'électron des oxydases est l' $O_{2(aq)}$, présent naturellement dans l'eau, ce qui les rend plus facilement utilisables. La tyrosinase peut également être utilisée pour la bioremédiation [37,38], toutefois, son utilisation à l'échelle industrielle peut être compromise car elle reste essentiellement une enzyme intracellulaire, qui est produite en faible quantité [40,46].

Finalement, la laccase représente une solution prometteuse pour la bioremédiation de demain. Son fonctionnement nécessite seulement de l' $O_{2(aq)}$ et son seul déchet est l'eau [47]. Par rapport aux procédés d'oxydation chimiques utilisant H_2O_2 , O_3 ou les rayons UV, les procédés à base de laccase sont moins énergivores, plus écologiques et les produits de transformation semblent moins toxiques que les composés

parents [12–14,48]. Une étude a comparé la transformation de quatre composés pharmaceutiques (diclofénac, carbamazépine, sulfaméthoxazole et triméthoprime) par les trois procédés d'oxydation cités précédemment et la laccase de *T. versicolor*. Le traitement enzymatique a été le seul qui réduisait la toxicité de tous les composés après traitement [14].

1.3. La laccase

Certains arbres d'Asie peuvent sécréter une substance laiteuse, appelée « lacquer » ou « jus d'urushi », permettant la formation du vernis japonais après son durcissement par des « lacquermen » [49]. Ce vernis est utilisé depuis des milliers d'années, par exemple il serait en partie responsable de la bonne préservation de l'armée en terre cuite datée de 200 avant JC [50]. En 1883, au Japon, Hikorokuro Yoshida est le premier à caractériser le jus d'urushi, et son durcissement se ferait par la polymérisation d'une molécule, appelée urishiol (Figure 1.gauche) et par l'action d'une enzyme doté d'un pouvoir d'oxydoréduction [49]. Communément, le nom des oxydases est formé à partir du nom du substrat à laquelle le suffixe *-ase* est ajouté (urée – uréase). Le substrat de cette enzyme semblait être la laque, d'où son nom laccase (laque-ase), ou urishiol-oxydase (Expasy : 1.10.3.2) (Figure 1.a). Aujourd'hui, elle est officiellement définie comme toute enzyme capable de catalyser la réaction du benzènediol en benzosemiquinone (Expasy : 1.10.3.2), avec l'O₂ comme accepteur final d'électron et l'eau comme sous-produit de transformation (Figure 1.b).

Le point commun entre l'urishiol et le benzènediol est la présence d'un cycle aromatique doté d'un groupement électrodonneur, qui augmenterait sa bonne transformation, à l'inverse d'un groupement électroattracteur qui la diminuerait [48,51].

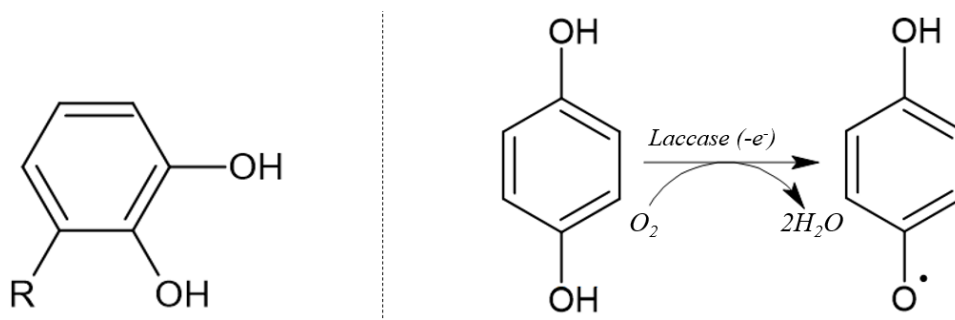


Figure 1. À gauche : structure de l'urishiol. À droite : Réaction d'oxydation du benzènediol en benzosemiquinone catalysée par la laccase.

Nous pouvons voir la réaction laccase – substrat comme une réaction d’oxydoréduction entre un oxydant et un réducteur. Initialement, la laccase est l’oxydant va réduire le substrat en lui soustrayant un électron. Il est possible de régénérer la laccase à l’état d’oxydant en présence de dioxygène dissous. Le dioxygène se réduit, la laccase s’oxyde et une molécule d’eau est formée (Figure 2) [52].

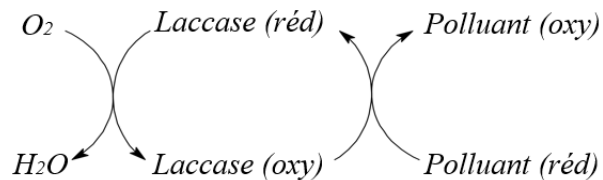


Figure 2. Schéma simplifié du cycle catalytique de la laccase.

Généralement, chaque enzyme a une double spécificité : spécificité de reconnaissance des molécules (substrats) et spécificité du type de réaction qu’elle catalyse. Ce n’est pas son cas grâce à : *i*) sa faible spécificité vis-à-vis des molécules qu’elle oxyde, car il suffirait qu’un cycle aromatique contenant un groupement électrodonneur soit existant dans la structure du composé pour qu’il devienne un bon substrat ; *ii*) sa spécificité liée à la réaction d’oxydation, avec la formation d’un radical cationique instable, pouvant engendrer une multitude de réactions comme l’oligomérisation, la dépolymérisation, la méthylation, la déméthylation, l’hydroxylation, etc. [53,54]. Par exemple, la réaction d’oligomérisation permet la formation d’oligomère, généralement de quelques unités [55–57]. Elle semble être la voie de transformation la plus intéressante de toutes car elle produirait des composés moins toxiques ayant une activité biologique moins importante que les composés parents [58]. L’un des intérêts majeurs de cette voie est qu’elle n’est pas spécifique, et peut se faire entre un composé radicalaire (formé par la laccase) et n’importe quels autres composés, même ceux considérés comme récalcitrants (Figure 6).

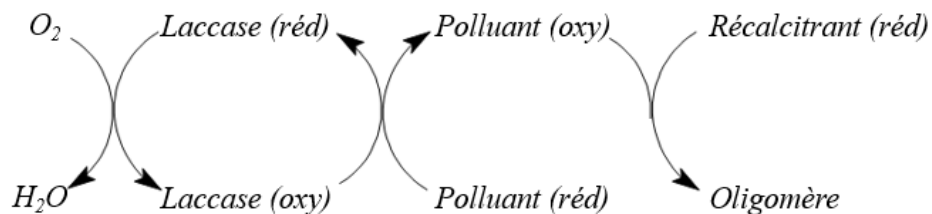


Figure 3. Schéma de fonctionnement de l’oligomérisation d’un composé récalcitrant.

Une eau usée serait donc intéressante car, étant une matrice chargée et complexe, elle pourrait contenir une multitude de substrats pouvant devenir radicalaire puis s’oligomériser par la suite avec les produits

d'intérêts. En prenant l'exemple de la carbamazépine, qui est un composé récalcitrant dans les eaux de STEP et non transformable par la laccase, une étude a démontré son élimination par l'ajout d'acétaminophène dans le milieu réactionnel (Figure 7) [58]. De plus, cette voie pourrait augmenter la cinétique d'élimination des composés moyennement récalcitrants. C'est le cas du diclofénac, après l'ajout de l'acide méfénamique, l'élimination est passée de 20 à 90% en 20 h [59].

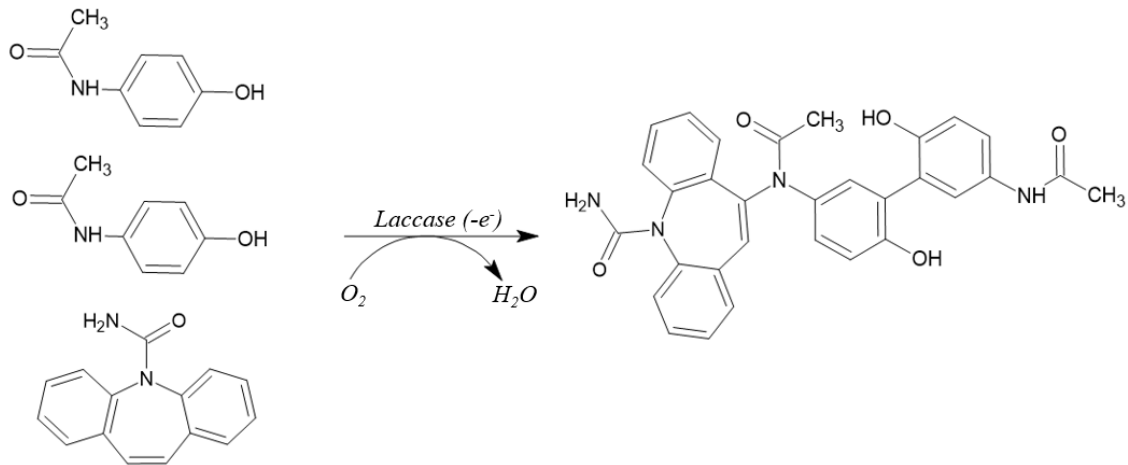


Figure 4. Oligomérisation de la carbamazépine catalysée par la laccase par l'intermédiaire de l'acétaminophène.

Les caractéristiques de la laccase et la découverte incessante de nouvelles aux propriétés physico-chimiques uniques fait qu'elle est l'une des enzymes les plus étudiées dans le monde. En effet, des milliers de laccases ont été référencées, issues de multiples organismes tels que les insectes, les champignons, les plantes, les archées ou les bactéries. Ceci peut s'illustrer par une augmentation significative des publications sur la « laccase » disponible sur Google Scholar depuis les 40 dernières années passant de 179 publications en 1982 à 13,800 en 2022. Afin d'expliquer ce constat, il est nécessaire d'identifier le point commun entre toutes ces laccases : quatre atomes de cuivre liés par dix histidines, une cystéine et un autre acide aminé variable [47]. Ce squelette ne constitue qu'une partie négligeable de la taille totale de la laccase et les acides aminés constituant le reste de l'enzyme peut être très variable, et quelque fois le pourcentage de similitude entre deux laccases est inférieur à 30%, si bien que de milliers d'enzymes sont définis comme étant de la laccase, comme par exemple la laccase issue de la souche *T. hirsuta* (WRF) Q02497 et la laccase O81081 de la plante *Arabidopsis thaliana* [21,60,61]. Les laccases peuvent être codées par des gènes différents, codant pour une séquence peptidique spécifique, rendant quasiment

unique chaque laccase. On les appelle isoenzymes. Pour la bioremédiation, les isoenzymes de plus grands intérêts sont celles sécrétées par les WRF (plus d'information à la section 1.1. et 1.6.).

L'un des grands enjeux de ces dernières années, est d'identifier et de caractériser l'isoenzyme dotée de propriétés pertinentes pour une application donnée. Dans le cadre de la bioremédiation par un bioréacteur enzymatique, cette stratégie s'explique par la nécessité d'immobiliser les laccases sur des billes de silice poreuses puis insérées dans un bioréacteur. Afin d'optimiser le rendement du bioréacteur, identifier, sélectionner et immobiliser préférentiellement une isoenzyme ayant des caractéristiques physico-chimiques pertinentes pour la bioremédiation est souhaitable. Le choix d'une laccase suffisamment robuste pour rester active dans un milieu complexe et possédant un bon rendement d'élimination des composés pharmaceutiques est recherchée.

De manière plus générale, les études caractérisant les laccases fongiques ont souvent été effectuées en utilisant directement l'ensemble des EEC, sans purification préalable des isoenzymes ou en utilisant de la laccase commerciale [14,34]. Bien que leurs purifications soient relativement complexes, elles restent nécessaires afin de pouvoir comparer les différentes isoenzymes. Parallèlement, les études cinétiques ne sont pas assez approfondies et se réduisent généralement au suivi de la disparition du substrat en fonction du temps [62]. La mesure de l'efficacité catalytique ($K=k_{cat}/K_M$) permet d'obtenir d'avantage d'informations et donc de conclure de façon plus rigoureuse sur la laccase la plus performante (explications détaillées à la section 1.4.). La non-mesure de ces constantes peut s'expliquer par le fait que les expériences peuvent être longues, coûteuses et fastidieuses (section 1.4.).

Toutefois, la possibilité d'utiliser une technique ultra-rapide et sensible d'analyse, la désorption thermique par diode laser couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle (LDTD-QqQ-MS) permet de déterminer les constantes enzymatiques plus facilement, plus rapidement et de façon moins onéreuse qu'à l'accoutumé. Cette étude est la première à utiliser cette technologie dans ce but (explications détaillées à la section 1.5.). Parallèlement, les techniques modernes de séparation de protéines telles que la chromatographie liquide rapide de protéines (FPLC) utilisant des colonnes d'exclusion stérique ou d'échange ionique permettent d'obtenir une purification acceptable des isoenzymes d'un extrait brut provenant d'une culture de champignons [53,63–65].

1.4. Les constantes catalytiques

Les enzymes fonctionnant selon le mécanisme dit « Michaelis-Menten » se comporte de la sorte : un substrat nommé S se lie avec l'enzyme nommé E pour donner un intermédiaire nommé ES, selon la constante de vitesse k_1 . Il y a deux possibilités pour l'avenir de ce complexe : il se dissocie avec un retour en arrière pour redonner E + S selon la constante de vitesse k_{-1} ou il réagit pour former le produit P avec la régénération de l'enzyme E selon la constante de vitesse k_2 .

K_M est le ratio de la somme de k_{-1} et k_2 par k_1 . En d'autres termes, elle est le ratio de la vitesse de disparition de ES par sa vitesse d'apparition. Cette constante est un bon moyen d'estimer l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Ainsi, plus le K_M sera faible, et plus un substrat pourrait être transformé efficacement même à faible concentration. K_M est donc un paramètre essentiel dans la thématique de la bioremédiation car les composés sont généralement à l'état de trace.

Néanmoins, l'affinité enzyme-substrat ne peut totalement représenter la vitesse apparente de la formation de P à partir de S. En effet, il est possible que S ait une forte affinité avec le site actif de l'enzyme mais que P ne se forme pas. La constante de vitesse k_2 ou k_{cat} décrit la vitesse de formation de S par l'intermédiaire ES. La constante catalytique k_{cat} est en quelques sortes du goulot d'étranglement déterminant le flux de transformation de ES en P+S. Cette constante est nommée « turnover number » d'une enzyme car elle est égale au nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par un seul site actif de l'enzyme à saturation. On peut en déduire une constante de vitesse apparente K, fonction à la fois de la capacité à produire le complexe ES (faible K_M), mais aussi à sa capacité à transformer ES en P (k_{cat} élevé). K est donc égale à k_{cat}/K_M . Cette constante reflète la performance d'une enzyme à transformer un substrat.

Il est possible de déterminer la constante K_M par la méthode de linéarisation de Lineweaver et Burk en déterminant la vitesse d'élimination du substrat à différentes concentrations. La linéarisation implique un minimum de cinq-six points (donc cinq-six concentrations différentes) pour obtenir une droite acceptable. L'utilisation d'un spectrophotomètre permet d'obtenir la concentration de P en fonction du temps à tout instant, et donc, déterminer la vitesse d'élimination reste relativement simple. Toutefois, à cause de la faible concentration des analytes, souvent inférieure à la limite de détection des spectrophotomètres ($\mu\text{g/L}$), et également aux potentiels interférents à la longueur d'onde de l'analyse, il est souvent nécessaire d'utiliser la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) qui ne peut déterminer la concentration de l'analyte en continue. De plus, il est nécessaire de retirer les enzymes contenus dans l'échantillon avant de l'injecter à travers la colonne chromatographique et enfin les analyses demeurent

relativement longues (dizaines de minute). Le développement de la méthode de préparation de l'échantillon est donc plus complexe et plus délicat. Ceci peut expliquer les très rares études cinétiques sur ce sujet. L'une des solutions est l'utilisation de la technologie Désorption Thermique par Diode Laser (LDTD) couplée à une source d'ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI) liée à un spectromètre de masse (MS) doté d'un analyseur de masse de type triple quadripôle (QqQ) rendant les analyses pour la détermination de constantes michaelienne de composés pharmaceutiques idéales. Brièvement, cette technologie permet d'analyser un échantillon contenant une matrice complexe comme une eau usée, dans un délai très court (ce qui est essentiel à la vue du nombre important d'analyse nécessaire), en réduisant la complexité du développement de la préparation de l'échantillon et en plus se souciant de la présence ou non d'enzyme dans l'échantillon (plus d'informations à l'annexe 1) [66].

L'évaluation de la performance catalytique d'une enzyme Michaelienne ne peut se résumer à la détermination de la constante K_M . La détermination de la constante catalytique k_{cat} puis *a posteriori* la constante K reste nécessaire. Toutefois les différents articles publiés à travers la littérature n'indiquent quasiment jamais ces deux constantes (k_{cat} et K). Cela s'explique par la difficulté supplémentaire à calculer k_{cat} , qui nécessite la détermination de la concentration de la laccase. Dans le cadre de la bioremédiation des composés pharmaceutiques, la concentration enzymatique est rarement connue et les estimations semblent approximatives. Cela peut s'expliquer par différentes manières : i) la concentration de la laccase commerciale n'est pas indiquée lors de son achat, ou ii) L'extrait brut contient plusieurs protéines et enzymes, et la concentration de la laccase spécifique sera donc surestimée par des dosages protéines totaux de l'extrait comme le dosage Bradford ou la méthode BCA (Acid Bicinchoninic). Pour y remédier, la concentration de la laccase a été mesurée grâce au logiciel GelAnalyzer (plus de détails à la section 2.2.5.).

1.5. Informations complémentaires sur les expériences

Les tests de stabilité ont communément été effectués à travers la littérature, en utilisant différents dénaturants récurrents, et ce depuis de nombreuses années. Par exemple, une publication datée de 1987 évalue la stabilité de la laccase de l'étude en mesurant sa stabilité à différents pH, différentes températures, exposée à différents composés organiques tels que l'EDTA ou l'azoture de sodium, et à différents métaux tels que le cuivre, le fer, ou le mercure. En 2021, une étude caractérise la laccase d'intérêt en évaluant sa stabilité en reprenant les mêmes dénaturants que dans la publication de 1987

[66,67]. Le choix des dénaturants semble basé sur des choix historiques et afin de respecter une certaine reproductibilité des tests effectués. Toutefois, dans le cadre de la bioremédiation, bien que l'eau usée ait déjà été utilisé comme dénaturant, il n'y aurait pas de raison d'utiliser l'EDTA, l'azotate de sodium, varier le pH ou d'augmenter fortement la température, vu que l'eau usée de STEP possède un pH relativement neutre (pH 7-8) et que la température oscillerait d'environ 4 à 22 °C. Pour ces raisons, nous avons préféré utiliser un dénaturant chimique (l'urée), un dénaturant enzymatique (les protéases), un potentiel dénaturant métallique (le cuivre), un effluent de STEP (filtrée ou non).

Paradoxalement, il semblerait que les tests « d'interférences » n'ont jamais été effectués à travers la littérature à notre connaissance. La laccase est une enzyme, et il n'est pas rare d'observer une diminution de l'activité enzymatique, en présence d'inhibiteur ou par des phénomènes de compétition. L'effluent de STEP est un milieu riche et complexe, et à notre connaissance, aucune expérience n'a évalué la potentielle diminution de l'activité enzymatique due à la matrice. Parallèlement, il est su que les petits ions tels que les ions chlorures interfèrent le site actif de la laccase. Nous avons donc évalué quelle isoenzyme était la plus sensible à ce phénomène en utilisant le NaCl et le KCl [68] et une stratégie similaire a été mise en place avec les solvants organiques. Nous appellerons « tests de robustesses » l'ensemble des tests évaluant la stabilité et l'interférence.

Comme cité précédemment, dans les pays où la température peut descendre en dessous de 0 °C, il est possible que la température de l'effluent soit de quelques degrés Celsius. Les bioréacteurs enzymatiques se développent en partie au Canada [58,69]. Bien qu'il semble nécessaire d'évaluer l'impact d'une diminution de la température sur la capacité de la laccase à son bon fonctionnement, à notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée.

La principale stratégie est basée sur l'identification de la laccase la plus pertinente pour être le composant actif des bioréacteurs enzymatiques du futurs. Toutefois quelques rares études indiqueraient une cinétique de transformation améliorée en cas d'utilisation multiple d'isoenzymes, démontrant ainsi des effets de synergies. Cela pourrait s'expliquer par une certaine préférence des isoenzymes à la transformation de certains composés, par exemple, trois isoenzymes ont été purifiées et exposées à différents composés organiques. Les résultats indiquent qu'une isoenzyme avait un fort potentiel pour la transformation des HAP, une autre pour l'ABTS alors que la troisième pour l'acide sinapique [70]. Un autre exemple indique que la transformation du vert de malachite est nulle lorsqu'elle est exposée à l'isoenzyme rLacc9, alors

qu'elle est totale, en quelques heures par l'isoenzyme rLacc6 [62]. Dans notre cas, le large éventail des composés pharmaceutiques existants et la richesse de la matrice eaux usées de STEP nous interroge donc sur la stratégie d'identifier une seule laccase afin d'améliorer les capacités du bioréacteur. Trop peu d'études ont été effectuées, et nous sommes la première étude à évaluer le potentiel effet de synergie des isoenzymes de l'extrait à transformer plusieurs composés pharmaceutiques.

1.6. Limites et solutions envisagées

Plusieurs limitations ont été identifiées qui ne semblent pas être résolues dans la littérature. La première, comme cité dans la section 1.4. , le choix des dénaturants semble avoir été fait de manière historique, afin de respecter une certaine cohérence avec les autres publications. Or, il est difficile de comparer des résultats de caractérisation d'isoenzymes sans utiliser d'étalon de référence ou sans normaliser les résultats. Le second point est la stratégie à devoir caractériser l'ensemble des laccases existantes afin d'identifier la plus adéquate. Or il existerait des dizaines de milliers de laccases et la caractérisation de toutes semblent impossible. Le troisième point est que l'identification de l'isoenzyme caractérisée semble obligatoire afin de la référencer et d'éviter que d'autres études caractérisent la même isoenzyme. Or, il est difficile d'identifier une isoenzyme car cela demanderait de déterminer l'ensemble de sa séquence peptidique, ou à l'aide de la technique d'empreinte peptidique de se fier à une base de donnée, qui serait probablement non exhaustive. Il existerait une solution à l'ensemble de ces limitations qui est expliquée dans le paragraphe suivant.

De récentes publications ont observé la présence de huit gènes pour les WRF de la famille des *Polyporaceae* [16,21,71]. Les WRF de cette famille regroupe en partie les WRF tels *T. hirsuta*, *T. versicolore* (plus de détails à la section 1.1.). Il apparaît que ces gènes sont relativement ressemblant car issus d'un ancêtre commun. La conséquence est la sécrétion de laccases avec une séquence peptidique relativement proche et dotées de propriétés physico-chimiques similaires. Les auteurs proposent donc de les classer en huit groupes correspondant aux huit potentiels gènes sécréteurs, nommés comme ceci : *lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG* et *lacH* . Pour plus de simplicité, nous appellerons groupe A pour *lacA*, etc. La figure 8 indique la similarité génétique entre chaque groupe de laccase.

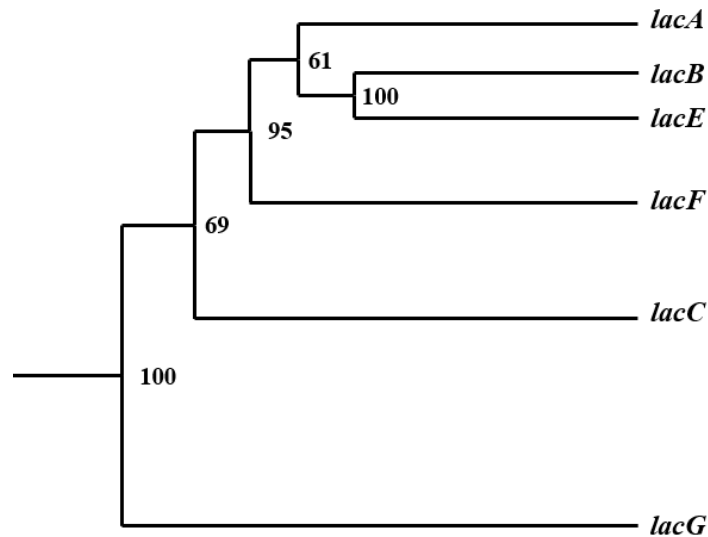


Figure 5. Similarité des gènes de la laccase pour la souche *T. hirsuta* selon Savinosa et al. [16].

Pour la souche *T. hirsuta*, la figure 8 indique que le gène *lacH* est désactivé, et *lacB* et *lacE* sont équivalents. Les laccases du groupe A et B semblent très proches, suivi de celles du groupe F. Ces trois groupes peuvent former un ensemble comparé au groupe C et G qui pourrait constituer le deuxième ensemble. On pourrait s'attendre à de fortes similitudes dans les paramètres physico-chimiques d'une laccase issue du groupe A avec celle du groupe B.

D'un point de vue expérimental, les laccases du groupe A seraient présentes et fonctionnelles chez tous les WRF [72]. Elles sont particulièrement importantes car elles semblent être systématiquement sécrétées, indépendamment de l'environnement. Ce sont les laccases ayant été le plus étudiées et caractérisées et sont appelées « laccase constitutive ». Elles sont connues pour avoir un point isoélectrique (pI) relativement bas (≤ 5), un pourcentage de glycolisation des plus faibles (environ 10%), un K_M relativement faible ($\leq 88 \mu\text{M}$), et un pH optimal acide [36,73]. Contrairement aux laccases inductibles, représentées par le reste des laccases sécrétées dépendamment de l'environnement par divers paramètres tels que la concentration en métaux, de certains composés en solution, le temps d'incubation, le changement de pH, etc. Les activateurs de gènes sont difficilement identifiables, d'autant plus que chaque organisme possède un unique activateur de production [19,72]. Les études y sont beaucoup moins abondantes, et seul le groupe B et C ont suffisamment été caractérisés pour permettre quelques descriptions : pour les laccases du groupes B, le pI est élevé (> 6), un pourcentage de glycolisation des plus faibles (environ 10%), un K_M des plus faible ($\leq 20 \mu\text{M}$), et un pH optimal acide [71,73]. Pour ce qui

est du groupe C, le pI est bas (≤ 5), un pourcentage de glycolisation des plus élevé (environ 30%), un K_M des plus élevé ($> 200 \mu\text{M}$), et un pH optimal neutre [72,73]. Les K_M et pH optimaux ont été mesurés en prenant l'ABTS comme substrat. Finalement, dans le cadre de la bioremédiation, d'un point de vue performance catalytique, les laccases du groupe B semblent être plus intéressantes avec un K_M des plus faible alors que d'un point de vue stabilité, les laccases du groupe C seraient plus intéressantes car elles posséderaient un pourcentage de glycosylation élevé, ce qui pourrait les rendre plus résistantes à l'action des protéases et radicaux libres, donc avoir une meilleure stabilité dans une eau usée.

À partir de cette classification, l'idée ne serait alors plus de comparer les laccases entre elles, mais de comparer les groupes entre eux. Il serait alors possible de résoudre les trois limitations: i) le manque de référence et de normalisation lors des expériences pourraient être pallié en utilisant la laccase constitutive (groupe A) de l'extrait comme laccase de référence et de comparer la laccase inductible (groupe X) au groupe A, ii) Il ne serait plus nécessaire de comparer toutes les laccases possibles, en effet seulement un total de huit laccases, représentatives de chacun des huit groupes (groupe A-H), pourrait être suffisant, iii) l'identification de l'isoenzyme pourrait être remplacé par sa classification dans l'un des groupes. Toutefois, les outils permettant la classification des laccases dans un des groupes est très peu développé. C'est pour cette raison qu'une section du chapitre 2 sera dédiée au développement d'outils afin de faciliter la classification des laccases.

1.7. Objectifs

L'objectif de ce mémoire est de caractériser les isoenzymes sécrétées par la souche *Trametes hirsuta* IBB450 pour une application à la bioremédiation des eaux usées. Après avoir purifié et identifié les isoenzymes, dans un premier temps la robustesse des isoenzymes sera évaluée en les exposants à différents dénaturants et interférents. Dans un second temps les performances catalytiques seront évaluées en déterminant les différentes constantes catalytiques (K_M , k_{cat} , K). Parallèlement, les potentiels effets synergiques des isoenzymes sera déterminé. Finalement, l'impact de la diminution de la température sur la cinétique de transformation des composés d'intérêt sera mesurée. L'ensemble de ces expériences seront effectuées en utilisant deux molécules d'intérêt environnemental : le diclofénac et le 17 α -éthynylestradiol.

1.8. Référence

- [1] Patel M, Kumar R, Kishor K, Mlsna T, Pittman CU, Mohan D. Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem Rev* 2019;119:3510–673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>.
- [2] Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res* 2015;72:3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.
- [3] Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci Total Environ* 2012;429:123–55. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.
- [4] CANAUD Marie-Clémence E. Health at a Glance 2017: OECD Indicators 2017.
- [5] Acuña V, Ginebreda A, Mor JR, Petrovic M, Sabater S, Sumpter J, et al. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environ Int* 2015;85:327–33. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.023>.
- [6] Klaić M, Jirsa F. 17 α -Ethinylestradiol (EE2): concentrations in the environment and methods for wastewater treatment – an update. *RSC Adv* 2022;12:12794–805. <https://doi.org/10.1039/D2RA00915C>.
- [7] Hoffmann F, Kloas W. Estrogens Can Disrupt Amphibian Mating Behavior. *PLoS ONE* 2012;7:e32097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032097>.
- [8] Valdés ME, Marino DJ, Wunderlin DA, Somoza GM, Ronco AE, Carriquiriborde P. Screening Concentration of E1, E2 and EE2 in Sewage Effluents and Surface Waters of the “Pampas” Region and the “Río de la Plata” Estuary (Argentina). *Bull Environ Contam Toxicol* 2015;94:29–33. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1417-0>.
- [9] Boucher V, Beaudon M, Ramirez P, Lemoine P, Volk K, Yargeau V, et al. Comprehensive evaluation of non-catalytic wet air oxidation as a pretreatment to remove pharmaceuticals from hospital effluents. *Environ Sci Water Res Technol* 2021;7:1301–14. <https://doi.org/10.1039/D1EW00203A>.
- [10] Alharbi SK, Price WE. Degradation and Fate of Pharmaceutically Active Contaminants by Advanced Oxidation Processes. *Curr Pollut Rep* 2017;3:268–80. <https://doi.org/10.1007/s40726-017-0072-6>.
- [11] Alharbi SK, Price WE, Kang J, Fujioka T, Nghiem LD. Ozonation of carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and trimethoprim and formation of major oxidation products. *Desalination Water Treat* 2016;57:29340–51. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1172986>.

- [12] Dai C, Zhou X, Zhang Y, Duan Y, Qiang Z, Zhang TC. Comparative study of the degradation of carbamazepine in water by advanced oxidation processes. *Environ Technol* 2012;33:1101–9. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.610359>.
- [13] Mahamuni NN, Adewuyi YG. Advanced oxidation processes (AOPs) involving ultrasound for waste water treatment: A review with emphasis on cost estimation. *Ultrason Sonochem* 2010;17:990–1003. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.09.005>.
- [14] Alharbi SK, Nghiem LD, van de Merwe JP, Leusch FDL, Asif MB, Hai FI, et al. Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from *Trametes versicolor*: Transformation products and toxicity of treated effluent. *Biocatal Biotransformation* 2019;37:399–408. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1580268>.
- [15] Mir-Tutusaus JA, Baccar R, Caminal G, Sarrà M. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Res* 2018;138:137–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056>.
- [16] Savinova OS, Moiseenko KV, Vavilova EA, Chulkin AM, Fedorova TV, Tyazhelova TV, et al. Evolutionary Relationships Between the Laccase Genes of Polyporales: Orthology-Based Classification of Laccase Isozymes and Functional Insight From *Trametes hirsuta*. *Front Microbiol* 2019;10:152. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00152>.
- [17] Dhakar K, Pandey A. Laccase Production from a Temperature and pH Tolerant Fungal Strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). *Enzyme Res* 2013;2013:1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/869062>.
- [18] Ariste AF, Batista-García RA, Vaidyanathan VK, Raman N, Vaithyanathan VK, Folch-Mallol JL, et al. Mycoremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons from a biorefinery wastewater and concomitant production of lignin modifying enzymes. *J Clean Prod* 2020;253:119810. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119810>.
- [19] Ntougias S, Baldrian P, Ehaliotis C, Nerud F, Merhautová V, Zervakis GI. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresour Technol* 2015;189:121–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149>.
- [20] Mate DM, Alcalde M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnol Adv* 2015;33:25–40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.007>.

- [21] Vasina DV, Mustafaev ON, Moiseenko KV, Sadovskaya NS, Glazunova OA, Tyurin AA, et al. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. *Biochimie* 2015;116:154–64. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.015>.
- [22] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Caminal G, Vicent T. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J Hazard Mater* 2010;176:836–42. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.112>.
- [23] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, Caminal G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 2009;74:765–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.040>.
- [24] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Blánquez P, Vicent T, Caminal G. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresour Technol* 2010;101:2159–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.019>.
- [25] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Caminal G, Vicent T. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC–DAD–MS and NMR. *Chemosphere* 2010;78:474–81. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.009>.
- [26] Jelic A, Cruz-Morató C, Marco-Urrea E, Sarrà M, Perez S, Vicent T, et al. Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Res* 2012;46:955–64. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.063>.
- [27] Prieto A, Möder M, Rodil R, Adrian L, Marco-Urrea E. Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. *Bioresour Technol* 2011;102:10987–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.055>.
- [28] Cruz-Morató C, Jelić A, Perez S, Petrović M, Barceló D, Marco-Urrea E, et al. Continuous treatment of clofibrac acid by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor: Identification of transformation products and toxicity assessment. *Biochem Eng J* 2013;75:79–85. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.020>.
- [29] Cruz-Morató C, Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barceló D, Marco-Urrea E, Vicent T, et al. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Res* 2013;47:5200–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.007>.
- [30] Cruz-Morató C, Lucas D, Llorca M, Rodriguez-Mozaz S, Gorga M, Petrovic M, et al. Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine

disruptor compounds. Sci Total Environ 2014;493:365–76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.117>.

[31] Gros M, Cruz-Morato C, Marco-Urrea E, Longrée P, Singer H, Sarrà M, et al. Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products. Water Res 2014;60:228–41. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.042>.

[32] Ferrando-Climent L, Cruz-Morató C, Marco-Urrea E, Vicent T, Sarrà M, Rodriguez-Mozaz S, et al. Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. Chemosphere 2015;136:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.051>.

[33] Llorca M, Lucas D, Ferrando-Climent L, Badia-Fabregat M, Cruz-Morató C, Barceló D, et al. Suspect screening of emerging pollutants and their major transformation products in wastewaters treated with fungi by liquid chromatography coupled to a high resolution mass spectrometry. J Chromatogr A 2016;1439:124–36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.077>.

[34] Haroune L, Saibi S, Cabana H, Bellenger J-P. Intracellular Enzymes Contribution to the Biocatalytic Removal of Pharmaceuticals by *Trametes hirsuta*. Environ Sci Technol 2017;51:897–904. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04409>.

[35] Arca-Ramos A, Kumar VV, Eibes G, Moreira MT, Cabana H. Recyclable cross-linked laccase aggregates coupled to magnetic silica microbeads for elimination of pharmaceuticals from municipal wastewater. Environ Sci Pollut Res 2016;23:8929–39. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6139-x>.

[36] Vasina DV, Pavlov AR, Koroleva OV. Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* st. 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate. BMC Microbiol 2016;16:106. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0729-0>.

[37] Ba S, Vinoth Kumar V. Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications. Crit Rev Biotechnol 2017;37:819–32. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1261081>.

[38] Ba S, Haroune L, Cruz-Morató C, Jacquet C, Touahar IE, Bellenger J-P, et al. Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. Sci Total Environ 2014;487:748–55. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.004>.

[39] Harms H, Schlosser D, Wick LY. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nat Rev Microbiol 2011;9:177–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>.

- [40] Arca-Ramos A, Eibes G, Feijoo G, Lema JM, Moreira MT. Enzymatic reactors for the removal of recalcitrant compounds in wastewater. *Biocatal Biotransformation* 2018;36:195–215. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1315411>.
- [41] Bharati SL, Chaurasia PK, editors. *Research Advancements in Pharmaceutical, Nutritional, and Industrial Enzymology*: IGI Global; 2018. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-5237-6>.
- [42] Lueangjaroenkit P, Teerapatsakul C, Sakka K, Sakka M, Kimura T, Kunitake E, et al. Two Manganese Peroxidases and a Laccase of *Trametes polyzona KU-RNW027* with Novel Properties for Dye and Pharmaceutical Product Degradation in Redox Mediator-Free System. *Mycobiology* 2019;47:217–29. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1589900>.
- [43] Pylypchuk IV, Daniel G, Kessler VG, Seisenbaeva GA. Removal of Diclofenac, Paracetamol, and Carbamazepine from Model Aqueous Solutions by Magnetic Sol–Gel Encapsulated Horseradish Peroxidase and Lignin Peroxidase Composites. *Nanomaterials* 2020;10:282. <https://doi.org/10.3390/nano10020282>.
- [44] Taboada-Puig R, Eibes G, Lloret L, Lú-Chau TA, Feijoo G, Moreira MT, et al. Fostering the action of versatile peroxidase as a highly efficient biocatalyst for the removal of endocrine disrupting compounds. *New Biotechnol* 2016;33:187–95. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.05.003>.
- [45] de Cazes M, Abejón R, Belleville M-P, Sanchez-Marcano J. Membrane Bioprocesses for Pharmaceutical Micropollutant Removal from Waters. *Membranes* 2014;4:692–729. <https://doi.org/10.3390/membranes4040692>.
- [46] Enguita FJ. *Structural Biology of Fungal Multicopper Oxidases* 2011. <https://doi.org/10.13140/2.1.3040.7689>.
- [47] Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresour Bioprocess* 2018;5:4. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>.
- [48] Naghdi M, Taheran M, Brar SK, Kermanshahi-pour A, Verma M, Surampalli RY. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. *Environ Pollut* 2018;234:190–213. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.060>.
- [49] Yoshida H. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J Chem Soc Trans* 1883;43:472–86. <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>.
- [50] Langhals H, Bathelt D. The Restoration of the Largest Archaeological Discovery—a Chemical Problem: Conservation of the Polychromy of the Chinese Terracotta Army in Lintong. *Angew Chem Int Ed* 2003;42:5676–81. <https://doi.org/10.1002/anie.200301633>.

- [51] Yang S, Hai FI, Nghiem LD, Price WE, Roddick F, Moreira MT, et al. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. *Bioresour Technol* 2013;141:97–108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.173>.
- [52] Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:215–42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.
- [53] Patel H, Gupte S, Gahlout M, Gupte A. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech* 2014;4:77–84. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1>.
- [54] Sumathi T, Viswanath B, Sri Lakshmi A, SaiGopal DVR. Production of Laccase by *Cochliobolus* sp. Isolated from Plastic Dumped Soils and Their Ability to Degrade Low Molecular Weight PVC. *Biochem Res Int* 2016;2016:1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/9519527>.
- [55] Beck S, Berry E, Duke S, Milliken A, Patterson H, Prewett DL, et al. Characterization of *Trametes versicolor* laccase-catalyzed degradation of estrogenic pollutants: Substrate limitation and product identification. *Int Biodeterior Biodegrad* 2018;127:146–59. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.020>.
- [56] Pype R, Septavaux J, Oulad Haj Amar B, Debaste F. Polymerization and formation of insoluble byproducts of diclofenac using *Trametes versicolor* laccases – Experimental study and modelling. *J Water Process Eng* 2019;32:100948. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100948>.
- [57] Lloret L, Eibes G, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Removal of Estrogenic Compounds from Filtered Secondary Wastewater Effluent in a Continuous Enzymatic Membrane Reactor. Identification of Biotransformation Products. *Environ Sci Technol* 2013;47:4536–43. <https://doi.org/10.1021/es304783k>.
- [58] Hachi M, Chergui A, Yeddou AR, Selatnia A, Cabana H. Removal of acetaminophen and carbamazepine in single and binary systems with immobilized laccase from *Trametes hirsuta*. *Biocatal Biotransformation* 2017;35:51–62. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1280032>.
- [59] Margot J, Maillard J, Rossi L, Barry DA, Holliger C. Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase. *New Biotechnol* 2013;30:803–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.06.004>.
- [60] Cai X, Davis EJ, Ballif J, Liang M, Bushman E, Haroldsen V, et al. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2006;57:2563–9. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl022>.

- [61] Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson K-EL, Dean JFD. Molecular Analysis of a Laccase Gene from the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1766–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1766-1772.1998>.
- [62] Zhuo R, Zhang J, Yu H, Ma F, Zhang X. The roles of *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 laccase isoenzymes in decolorization of synthetic dyes and the transformation pathways. *Chemosphere* 2019;234:733–45. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.113>.
- [63] Du M, Zhao L, Li C, Zhao G, Hu X. Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma Lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. *Eur Food Res Technol* 2007;224:659–65. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0355-4>.
- [64] Han M-J, Choi H-T, Song H-G. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *J Microbiol Seoul Korea* 2005;43:555–60.
- [65] Zhu Y, Zhang H, Cao M, Wei Z, Huang F, Gao P. Production of a thermostable metal-tolerant laccase from *Trametes versicolor* and its application in dye decolorization. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2011;16:1027–35. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0129-0>.
- [66] Hong J-S, Kim M-K, Kim Y-H, Lee J-B. Production and Properties of Laccase from *Coriolus versicolor*. *Korean J Mycol* 1987;15:99–170.
- [67] Si J, Ma H, Cao Y, Cui B, Dai Y. Introducing a Thermo-Alkali-Stable, Metallic Ion-Tolerant Laccase Purified From White Rot Fungus *Trametes hirsuta*. *Front Microbiol* 2021;12:670163. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670163>.
- [68] Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. “Blue” laccases. *Biochem Mosc* 2007;72:1136–50. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>.
- [69] Cabana H, Jones JP, Agathos SN. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J Biotechnol* 2007;132:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.948>.
- [70] Koschorreck K, Richter SM, Swierczek A, Beifuss U, Schmid RD, Urlacher VB. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs. *Arch Biochem Biophys* 2008;474:213–9. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.009>.
- [71] Moiseenko KV, Vasina DV, Farukshina KT, Savinova OS, Glazunova OA, Fedorova TV, et al. Orchestration of the expression of the laccase multigene family in white-rot basidiomycete *Trametes hirsuta* 072: Evidences of transcription level subfunctionalization. *Fungal Biol* 2018;122:353–62. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.006>.

[72] Savinova OS, Moiseenko KV, Vavilova EA, Tyazhelova TV, Vasina DV. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: Twins with different faces. *Biochimie* 2017;142:183–90. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.013>.

[73] Vasina DV, Mustafaev ON, Moiseenko KV, Sadovskaya NS, Glazunova OA, Tyurin AA, et al. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. *Biochimie* 2015;116:154–64. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.015>.

CHAPITRE 2. ÉTUDE COMPARATIVE DES ISOENZYMES DE LA LACCASE ISSUES DU CHAMPIGNON À POURRITURE BLANCHE *TRAMETES HIRSUTA*. CARACTÉRISATION POUR UNE APPLICATION AU TRAITEMENT DES EAUX USÉES

Article soumis au journal : « Enzyme and Microbial Technology », le 25 mai 2023.

Contribution des auteurs :

Younes El yagoubi est l'auteur principal de l'article. Il a rédigé toutes les sections du document, et toutes les figures et les tableaux ont été conçues et illustrées par lui-même. L'investigation, le développement et la conception du document a également été réalisée par l'auteur principal, sous la supervision de Pedro Segura et Hubert Cabana. Finalement, toutes les expériences ont été faites par l'auteur principal sauf celles portant sur la séparation chromatographique des isoenzymes. De plus, l'auteur principal a obtenu les résultats bruts de l'empreinte peptidique, sans n'avoir réalisé les expériences qui ont été fait par un laboratoire extérieur. **Bruno Lemieux** a effectué la totalité de la séparation et la purification chromatographique des isoenzymes. Le développement des méthodes a également été effectué par lui. L'auteur principal, ainsi que ses deux superviseurs se tenaient au courant régulièrement des expériences faites, et nous discussions fréquemment de la direction à prendre. **Pedro Segura et Hubert Cabana** ont supervisé l'auteur principal de l'article. Ils l'ont activement assisté, guidé, communiqué tout au long du bon cheminement du document. Ils ont également très largement participé à la bonne rédaction de l'article. **Pedro Segura** se distingue par des discussions quotidiennes, et donc un suivi beaucoup plus minutieux. **Hubert Cabana** est responsable de la création de ce projet et est responsable des fonds et des ressources.

Résumé de l'article :

L'évaluation des isoenzymes de la laccase issues de la souche *Trametes hirsuta* à être effectuée pour la bioremédiation de composés pharmaceutiques dans un effluent de STEP. Pour ce faire, après avoir purifié et collecté les isoenzymes de l'extrait brut, ils ont été exposés à différents dénaturants pertinents dont un effluent de STEP afin d'évaluer leur robustesse. Ensuite, des tests de performance ont été effectués en effectuant des tests de transformation des deux composés pharmaceutiques. De potentiels effets de synergies ont pu être évalués. Finalement, afin d'évaluer la bonne transformation de ces composés dans des climats froids, ces tests ont été effectués à 4 °C.

Comparative study of laccase isoenzymes from the white rot fungus *Trametes hirsuta*. Characterization for an application to wastewater treatment

Younès El Yagoubi^{1,2}, Bruno Lemieux³, Pedro A. Segura^{1,2}, Hubert Cabana^{1,4}

¹ Université de Sherbrooke Water Research Group (GRE AUS), 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

² Department of Chemistry, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

³ Plateforme de purification des protéines de l'Université de Sherbrooke, Department of Microbiology and Infectiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1E 4K8, Canada

⁴ Department of Civil and Building Engineering, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

*Corresponding author:

Hubert Cabana

Université de Sherbrooke Water Research Group,
Environmental Engineering Laboratory,
Department of Civil and Building Engineering,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1K
2R1, Canada.

E-mail: Hubert.Cabana@USherbrooke.ca

Abstract

The bioremediation of pharmaceutical compounds contained in wastewater, in an ecological and sustainable way, is possible via the oxidative action of fungal laccases. The discovery of new fungal laccases with physico-chemical characteristics pushes researchers to identify the most appropriate for diverse applications. The aim of this study is to purify and characterize laccase isoenzymes produced from the *Trametes hirsuta* IBB450 strain for the bioremediation of pharmaceutical compounds.

Two main laccases mixtures were observed and purified in the extracts and were called Y_n and Y_g . Peptide fingerprinting analysis suggested that Y_n was constituted mainly of laccase Q02497 and Y_g of laccase A0A6M5CX58, respectively. Robustness tests, based on tolerance and stability, showed that both laccases were affected in a relatively similar way by salts (KCl, NaCl), organic solvents (ACN, MeOH), denaturing compounds (urea, trypsin, copper) and were virtually unaffected and stable in wastewater. Determination of kinetic constants (Michaelis (K_M), catalytic constant (k_{cat}) and kinetic efficiency ($K=k_{cat}/K_M$)) for the transformation of synthetic hormone 17α -ethynylestradiol and the anti-inflammatory agent diclofenac indicates a lower K_M and k_{cat} for laccase Y_n but relative similar K constant compared to Y_g . Synergistic effects were observed for the transformation of diclofenac, unlike 17α -ethynylestradiol. Transformation studies of 17α -ethynylestradiol at different temperatures (4 and 21 °C) indicate a transformation rate reduction of approximately 75-80% at 4 °C against 25% for diclofenac in less than an hour. Finally, the classification of laccases Y_g and Y_n into one of eight groups (group A-H) suggests that laccase Y_g belongs to group A (constitutive laccase) and laccase Y_n belongs to group B (inducible laccase).

Keywords: diclofenac, 17α -ethynylestradiol, kinetic constants, laser diode thermal desorption, laccase A, laccase B

2.1. Introduction

The increase in the consumption of pharmaceutical products and the growth of the population living in urban centers have led to an increase in the load of wastewater to be treated in municipal wastewater treatment plants (WWTPs) [1–3]. These wastewaters contain various trace organic contaminants, such as pharmaceutical compounds, in concentrations high enough to potentially disrupt aquatic ecosystems. A recent review, presenting results of several hundred publications on the potential toxicity of diclofenac in nature, suggests that there could be harmful effects on the environment. [4]. 17 α -ethynylestradiol (EE2), is a recognized as an endocrine disruptor, its concentration in nature has been measured to several tens of ng L⁻¹ while negative effects have been observed in some adult male frogs exposed to less than 1 ng L⁻¹ [5–7]. The elimination of pharmaceutical compounds by WWTPs remains highly variable. Some of these contaminants such as acetaminophen or ibuprofen are eliminated from wastewater with high efficiency while others such as carbamazepine or temazepam are weakly eliminated [2,3].

To reduce the load of pharmaceutical contaminants in the effluents of WWTPs, the development of new treatment approaches, such as advanced oxidation treatments (AOPs), have been proposed. Although AOPs have proven their effectiveness [8–11], their use generally remains energy-intensive and thus, costly [11,12]. Also, in some cases, AOP can increase the toxicity of the treated water [8,13]. Thus, developing green and sustainable AOPs is critical. Biotreatment based on white rot fungi (WRF), as well as the extracellular enzymes represent an interesting alternative to AOPs [13,14]. For example, high transformation of acetaminophen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, naproxen, etc. in less than 48 h was observed [15–27]. Moreover, generally they do not increase the toxicity of the influent. Although the economic benefit of the use of enzyme treatments for STEP remains unclear, cost reduction studies show promising results with the reduction of costs such as the price of support materials or the price of enzyme production, and also on the improvement of enzyme activity and stability [13,28,29]. However, the use of WRF in WWTPs poses several difficulties such as their survival under non-sterile conditions and the management of the sludge produced [14]. This is not the case with extracellular enzymes, where different immobilization techniques on solid supports allow their use and recycling [30].

The use of extracellular enzymes for wastewater treatment processes pushes us to consider the choice of the WRF used to produce these enzymes. By considering the application of interest (in this case, the bioremediation of WWTP water), several parameters enter into the equation such as the optimal growth

of the fungus resulting in a high yield of laccases (EC 1.10.3.2) and other extracellular enzymes allowing high transformation rate of pharmaceutical compounds in a complex medium. For such application, the *Trametes hirsuta* species of the *Polyporaceae* family looks promising [31]. Indeed, it has been shown to be particularly robust for growth in biosolids, industrial and municipal effluents [32], which is relevant in the context of long-term ecological development. In addition, the supernatant containing the extracellular enzymes (i.e., the crude extract) revealed a strong potential for the degradation of phenolic compounds [33], and their immobilization on a solid support is possible and a topic of current research [29,34,35].

Among the extracellular enzymes excreted by *T. hirsuta*, laccase is the most promising for the development of bioremediation processes for several reasons: i) it does not require a co-substrate (e.g. H₂O₂) to function, since the final electron acceptor is O₂ [36]; ii) it is secreted in large quantities outside the WRF [37] and iii) its redox potential is one of the highest among known fungal laccases (0.780 mV vs NHE) [38] indicating that it is able to oxidize a wide range of substrates. Indeed, laccase has been used to remove multiple organic contaminants with medium to high transformation rates such as pharmaceuticals (diclofenac, acetaminophen and amoxicillin [13,39,40]), hormones (estrone, 17 β -estradiol, estriol and EE2 [41]), antiseptics such triclosan [42] and other trace contaminants such as bisphenol A [43].

In fungi, multiple genes are responsible for laccase production [44] which results in the production of various laccase isoenzymes with strong differences in the removal of contaminants [45,46]. In fact, in the *Polyporaceae* family, genomic studies suggests the presence of eight common genes involving the potential secretion of eight isoenzymes with different physicochemical properties [47]. Thus, eight different laccase groups could exist, including one that is always secreted, called constitutive laccase, and potentially others called inducible laccases (depending on external conditions) [44,47]. Physico-chemical differences can have a significant impact on key properties in the context of wastewater bioremediation like rate transformation of pharmaceutical compounds or stability in complex solutions. Indeed, for example, a study on the removal of synthetic dyes from industrial waters by laccases showed the percentage of decolorization for the synthetic dye Malachite green within 24 h was *circa* 90% and *circa* 65% for rLACC6 and rLACC10, respectively, [46]. Stability can also differ between laccases isoenzymes. For example, the same study also showed that the relative activity of laccases rLACC6 and

rLACC10 was *circa* 90% and *circa* 70%, respectively, when exposed to 10% of methanol [46]. It is therefore desirable to select the appropriate isoenzyme for a given application. Indeed, in our case where the strategy is to identify the most relevant laccase in order to improve the efficiency of future enzymatic bioreactors, the choice of an isoenzyme with optimal stability and functionality in wastewater, and a high potential for transforming pharmaceutical compounds is therefore crucial.

The objective of this study is to characterize the laccase isoenzymes secreted by the strain *T. hirsuta* IBB450 for an application to wastewater bioremediation. To do this, the stability and tolerance of the purified isoenzymes will be evaluated by exposing them to different denaturants or interferants (protease, urea, wastewater, temperature, etc.) and the catalytic performance will be measured by exposing them to two pharmaceutical compounds of interest, namely diclofenac and 17 α -ethynylestradiol.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Reagents and chemicals

Water, methanol (MeOH) and formic acid (Optima LC/MS grade) (Fisher Scientific, Ottawa, On, Canada), DCL sodium salt, and EE2 (Sigma Millipore, Oakville, On, Canada), deuterium-labeled DCL (DCL-d₄) and EE2 (EE2-d₄) (CDN-Isotopes, Pointe-Claire, Qc, Canada) were used.

Stock solutions at 1 g L⁻¹ of DCL and EE2 in MeOH were stored at -18 °C. Intermediate solutions were prepared from stock solutions in MeOH at a concentration of 20 mg L⁻¹. Stock solutions of internal standards were stored in MeOH at -18 °C at a concentration of 200 μ g L⁻¹.

Buffer solution at pH 7 was prepared from monobasic potassium phosphate (ACS grade) (EMD chemicals, Gibbstown, NJ, USA) and dibasic potassium phosphate (ACS grade) from Fisher Scientific. Buffer solution at pH 4 was prepared from glacial acetic acid (ACS grade) (VWR-Anachemia, Mississauga, ON, Canada) and sodium acetate (\geq 99% purity) from Sigma Millipore. Glycerol (GC grade), ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid)] (>98% purity) and bromophenol blue sodium salt were acquired from Sigma-Millipore. Sodium dodecyl sulfate (SDS), Coomassie brilliant blue R-250, and acrylamide/bis solution used (40% for a ratio of 29:1) (Bio-Rad, Mississauga, On, Canada) were used. Ethanol (95% purity) solution used for the discoloration of the SDS-PAGE gels

was purchased from Fisher Scientific. Phosphate Buffered Saline (PBS) was prepared by adding 8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.42 g of Na₂HPO₄ and 0.24 g of KH₂PO₄ to 1 L of Milli-Q water.

2.2.2. Medium, fungal strain and culture conditions

The fungal strain *T. hirsuta* IBB450 was provided from the Culture Collection of the Institute of Biochemistry and Biotechnology (Tbilisi, Georgia). Each culture was carried out under sterile conditions and grew over ten days at 37 °C. The slants were stored at 4 °C on potato starch, glucose, and agar 4%, 20% and 15% (w/v) respectively and were renewed every three months. The saline solution used for mycelium storage and washing pellets was 0.87 % w/v of NaCl sterile solution. The liquid cultivation medium used for the flask experiment was composed of dextrose, peptone, malt extract, yeast extract and copper sulfate 1%, 0.5%, 0.3%, 0.3% (w/v) and 1 mM respectively. All cultures were carried out under pelleted mycelium forms. The method used for pelletization was adapted from Marco-Urrea et Al. (2007) [48]. Briefly, four slants (1 cm²) of *T. hirsuta* from Petri dishes were cultivated in a 500 mL Erlenmeyer flask containing 250 mL of medium solution. After seven days of cultivation (26 °C and at 135 rpm), the solution was filtered, and the fungal biomass was rinsed with sterile saline solution. The fungal biomass was then blended in the saline solution and stored at 4 °C. Two milliliters of the first blended solution was then added in a 1 L Erlenmeyer flask containing 250 mL of cultivation medium. Then, the experience was repeated: after seven days of cultivation at 26 °C and under a 135-rpm orbital agitation, the solution was filtered, and the fungal biomass was rinsed with sterile saline solution. The fungal biomass was then blended in the saline solution and was stored at 4 °C. This solution, hereafter referred as mycelium solution, gives it the most repeatable and reproducible pellet forms.

2.2.3. Measurement of the enzymatic activity

Laccase activity was measured spectrophotometrically by measuring the oxidation of ABTS at 420 nm. Fifty µL of enzyme solution was transferred directly into the spectrophotometer cuvette containing 1.950 mL of ABTS solution (0.500 mM in acetate buffer 0.1 mM, pH 4). One unit (U) represents the amount of laccase capable of oxidizing 1 µmol of substrate per minute. Analyses were performed on a UV-Vis spectrophotometer model UV-1800 from Shimadzu. All measurements were made in triplicate.

2.2.4. Purification and separation of isoenzymes

After 14 days of cultivation, the supernatant was removed from the fungal solution. It was filtered at 1 mm, then centrifuged at *circa* 3000 g for 15 min, finally filtered at 0.22 μm . This crude extract was then concentrated approximately 200 times with Amicon Ultra-15 centrifugal filter units from Sigma Millipore (cut-off 30 and 100 kDa), to obtain only a range of proteins between 30 and 100 kDa into the final extract. Then, 1 mL of the extract was diluted with the PBS solution by a factor of 100 then reconcentrated to 1 mL to remove potential contaminants with Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (cut-off 30 kDa).

The apparatus used for separation of the proteins by size exclusion chromatography (SEC) is an AKTA Avant 25 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system from GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Sweden). A first purification was carried out with a Superdex 200 HR 10/30 SEC 24 mL (30 cm \times 10 mm, 13 μm particle size) column also made by GE Healthcare Bio-Sciences. The detection was done by measuring the absorbance at 260 nm and 280 nm. The volume of injection was 250 μL and 60 fractions of 500 μL were collected throughout the separation. Also, a solution containing four SEC standards (2000, 200, 67 and 25 kDa) was separated in a second run to estimate the molecular weight of the proteins present in each fraction. The enzymatic activity of each fraction was measured by Native-PAGE. The fractions containing the oxidizing activities were mixed and then treated according to the following protocol.

The collected fractions were diluted by a factor of 10 in Q100 buffer (40 mM Tris-Cl pH 8.8, 100 mM NaCl) and purified on a HisTRAP Q FF 1 mL (25 mm \times 7 mm, 90 μm particle size) anion exchange chromatography column from GE Healthcare Bio-Sciences. The group of enzymes containing redox activity not retained by the column was collected in the flow-through. The group of enzymes containing oxidation-reduction activity retained by the column is eluted by a NaCl gradient. The gradient of 18 column volumes at 1 mL min^{-1} was from 100 mM to 1000 mM (NaCl in 40 mM Tris-Cl pH 8.8) using the 2-pump system of AKTA Explorer 100 device from GE Healthcare Bio-Sciences. The isoenzymes of interest were subsequently concentrated on an Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit (cut-off 10 kDa) and the resulting concentrates were subjected to a change of buffer to PBS. To determine the molecular weight more accurately, a solution containing three SEC standards (66, 43 and 25 kDa) was separated to estimate the molecular weight of laccase isoenzymes purified by a Superdex-75 SEC column.

2.2.5. Electrophoresis on polyacrylamide gel

Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed according to the Laemmli protocol [49] with a Mini-PROTEAN Tetra Cell device from Bio-Rad. The separation was made with a 9% polyacrylamide gel followed by coloration with Coomassie blue. Then a non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis gel (Native-PAGE) with ABTS staining was performed using the same migrating conditions than for SDS-PAGE without DTT addition and heating. The staining solution used consists of 1 mM ABTS in acetate buffer at pH 4.

To semi-quantitatively determine the laccase concentration, a known quantity of bovine serum albumin (BSA) was loaded into 5 wells of an SDS-PAGE gel. Then, a known volume of the sample of interest is loaded into 5 more wells. After migration of the proteins through the gel and staining and then discoloration of the gel, the intensity of the bands obtained is measured by the GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc on an unsaturated scan. The intensity of the bands allows to approximate the concentration of the enzyme of interest.

2.2.6. Identification of laccase isoenzymes by peptide mass fingerprinting

After the migration of *circa* 500 ng of purified isoenzyme through an SDS-PAGE gel (see section 2.2.5), a slice of gel containing a unique protein band was excised and cut into 1 mm² squares and treated by the protocol detailed in the section S-2, in the Supporting Information. Briefly, the dehydrated samples thus obtained were enzymatically digested. A first set of samples was digested overnight with stirring at 37 °C with 12.5 ng mL⁻¹ of trypsin (MS grade) from Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, USA) in ammonium bicarbonate solution. A second set of samples was obtained by using chymotrypsin (MS grade) from Thermo Fisher Scientific and the same experimental conditions employed with trypsin except that CaCl₂ (1 M) must be added during digestion for chymotrypsin. The digested samples were then desalted through a C18 Zip-Tip column from Thermo Scientific and the solvent was evaporated. The sample was finally reconstituted in a solution of 1% formic acid before being transferred to a glass tube and stored at -20 °C until analysis by liquid chromatography-trapped ion mobility spectrometry-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-TIMS-QTOF).

The LC-TIMS-QTOF system from Bruker Daltonics (Bremen, Germany) was composed of a nanoElute liquid chromatograph coupled to a TimsTOF Pro ion mobility mass spectrometer with a Captive Spray

nano electrospray ion source, also manufactured by Bruker Daltonics. Digested peptides from *circa* 250 ng of each sample were injected into an Acclaim PepMap100 C₁₈ trap column (5 mm × 0.3 mm, 5 μm particle size) from Thermo Fisher Scientific with a constant flow of 4 μL min⁻¹ then eluted into a PepSep C₁₈ column (25 cm × 75 μm, 1.9 μm particle size) from Bruker Daltonics. The mobile phase was composed of 0.1% formic acid in H₂O (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). Peptides were eluted over a 2 h gradient of solvent B (5-37%) at a flow rate of 500 nL min⁻¹. Data was acquired using data-dependent auto-MS/MS with a *m/z* 100-1700 range, with parallel accumulation serial fragmentation (PASEF) acquisition enabled. The number of PASEF scans was set to 10 (1.27 s duty cycle) and a dynamic exclusion of 0.4 min, *m/z* dependent isolation window and a collision energy of 42 eV. The target intensity was set to 20000, with an intensity threshold of 2500.

Raw files were analyzed using MaxQuant software version 1.617.0 and the Uniprot *T. hirsuta* database (Taxon ID: 5327, version: 04/10/2018, 63 entries). The parameters used for the MaxQuant analysis (with the TIMS-DDA type in the group specific parameters) were as follows: 2 cleavage errors were allowed; the fixed modification was carbamidomethylation on cysteine. Variable changes included in the analysis were oxidation of methionine, acetylation of N-terminal proteins, and carbamylation of proteins (K, N-terminal). A mass tolerance of 10 ppm was used for precursor ions and a tolerance of 20 ppm was used for fragment ions. More details are given in section S-2. The scores returned by the identification algorithm are based on probability of matching the mass spectrum to the database sequences of interest [50].

2.2.7. Identification and properties of the laccase isoenzymes

The percentage of similarity between two amino acid sequences was carried out with the SIM-Alignment Tool for protein sequences software (Expasy (<https://web.expasy.org/sim/>)). The theoretical mass and the isoelectric point were generated by Expasy Compute pI/Mw tool (https://web.expasy.org/compute_pi/). The N-glycosylation sites and were predicted by NetNGlyc 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>).

The optimal pH of the purified isoenzymes was measured between pH 2 and 8. The initial activities at pH 4 were *circa* 500 U L⁻¹. To measure the optimal pH, a citrate buffer (pH 2-3.5), an acetate buffer (pH

4-5.5) and a phosphate buffer (pH 6-8) at 0.1 M were employed. The buffer solution employed for the measurement of activity with ABTS was adjusted according to the pH studied.

The Michaelis-Menten kinetic constants were determined according to Lineweaver and Burk methodology [51] using ABTS as a substrate. K_M (mol L^{-1}) is the ratio of the slope of the line to the y-intercept. The maximum speed V_{max} ($\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) is the ratio of the constant K_M to the slope of the line. The catalytic constant k_{cat} is the ratio between V_{max} and the laccase concentration. The kinetic efficiency constant K ($=k_{\text{cat}}/K_M$; $\text{L s}^{-1} \text{mol}^{-1}$) is the ratio of the constant k_{cat} to the constant K_M . The initial enzymatic concentration was *circa* 250 U L^{-1} . A total of 9 solutions of ABTS at different concentrations were prepared. The most concentrated solution was at $4.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ and the dilutions were made in series from a factor of 2 up to a factor of 256. The solvent was an acetate buffer at pH 4 (acetate buffer) at 0.01 M.

2.2.8. Characterization and comparison of the laccase isoenzymes for application to bioremediation

2.2.8.1. Quantification of trace organic contaminants by laser diode thermal desorption-triple quadrupole mass spectrometry

Quantitative analysis of DCL and EE2 before and after treatment with purified laccases was carried out by a laser diode thermal desorption-triple quadrupole mass spectrometry (LDTD-QqQ-MS) system composed of an LDTD source made by Phytronix (Quebec, QC, Canada) and a TQ-S micro triple quadrupole Xevo made by Waters (Milford, MA, USA). Before introducing the samples into the microwell plate, all the wells were treated with a volume of $4 \mu\text{L}$ of a coating solution ($268 \mu\text{M}$ EDTA, 1.4% NH_4OH , MeOH-Water 3:1 v/v) then dried in an oven at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min. Coating was necessary to improve the signal of the analytes [52]. To improve the repeatability of the analyses, $30 \mu\text{L}$ internal standards intermediate solution was mixed with $30 \mu\text{L}$ of each sample. Then $4 \mu\text{L}$ of this mix is introduced into the wells of the LDTD plate and dried in an oven at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min. The desorption of the compounds took place with a laser power pattern going from 0% to 45% of its maximum power in 3 s and remaining at 45% for 2 s. The carrier gas flow rate was fixed at 3 L min^{-1} . The current applied to the corona needle was fixed at $3 \mu\text{A}$. The temperature of the source was set to $150 \text{ }^\circ\text{C}$ and the flow rate of the carrier cone is fixed at 10 L h^{-1} . The analyzes were carried out in positive mode. The complete analysis time per sample was 13.2 sec. The instrument is set in MRM mode and two fragment ions are measured:

one for quantification and the other for identification (more information in Table S-1 in the Supporting Information).

2.2.8.2. Tolerance tests

The tolerance tests of purified laccases were carried out using organic solvents (MeOH and ACN), and salts (NaCl and KCl) as interfering agents. The tests with the solvents and the salts were carried out according to the same protocol: the sample was spiked with one of the salts (NaCl or KCl) at 50 mM or with one of the solvents (MeOH ACN) at 20 % v/v. At the same time, laccase (*circa* 500 U L⁻¹) was mixed with the interfering agent for 5 minutes before laccase activity being measured.

An effluent from a regional sewage treatment plant in the province of Québec, Canada also served as an interfering agent. The sample was prepared by mixing the ABTS solution concentrated 20 times and the effluent according to a 5:95 volumetric ratio. The pH of the effluent was adjusted to pH 7 by addition of HCl at 10 N, then to pH 4. The final activity was *circa* 500 U L⁻¹, and the activity was measured at these two pH values. On the other hand, laccase activity was measured at pH 7 (phosphate buffer at 0.1 M), and another sample was prepared at pH 4 (addition HCl at 10 N).

2.2.8.3. Stability tests

The activity of the enzymes of interest (*circa* 500 U L⁻¹) was measured after exposure to different denaturing compounds: 100 mM urea solution at pH 7 for 48 h, 100 mM copper sulfate solution at pH 4 for 48 h, 10 mg L⁻¹ trypsin solution at pH 7 for 48 h, sewage treatment plant effluent at pH 7 for 48 h and an acidic solution at pH 4 (0.01 M) for 72 h. The pH was stabilized at 7 with phosphate buffer (0.1 M) or at pH 4 with acetate buffer (0.1 M). At the same time, the same manipulation was carried out without denaturing. Sample containing denatured laccase was used to correct for potential fluctuations. The tubes were placed in the dark on an orbital shaker and orbitally stirred at 130 rpm.

The activity of the enzymes of interest (*circa* 500 U L⁻¹) was measured after exposure to pH 2.5 and pH 7 for 48 h and one week respectively. The solution was buffered with 0.01 M citrate buffer (pH 2.5) and

0.01 M phosphate buffer (pH 7). Tubes of 2 mL containing 1 mL of the mixture are placed at 4 °C in the dark. Finally, the activity of the enzymes was measured after being heated at 60.2 °C. After 0, 5, 10, 15, 25, 25 min, a sample of 50 µL was analyzed immediately. The pH was stabilized at 7 with phosphate buffer (0.01 M).

2.2.8.4. Transformation of pharmaceuticals

A kinetic study was carried out over 6 h for EE2 and 48 h for DCL transformation, at pH 7 (5 mM of potassium phosphate), with *circa* 150 and 750 U L⁻¹ of laccase for the elimination of EE2 and DCL respectively. Briefly, a final concentration of the enzymes of interest was added to a 50, 100, 150, 250 and 500 µg L⁻¹ solution of pharmaceutical compounds. The reaction medium was orbitally stirred in the dark at 130 rpm. The samples were withdrawn after contact times of 0 h, 1 h and 3 h for EE2 and 0 h, 24 h and 48 h for DCL. The samples taken were placed into the wells of the LDTD plate and analyzed immediately (see section 2.2.8.1). Finally, kinetics constants were obtained using Lineweaver and Burk method (see section 2.2.7).

The removal of EE2 and DCL was followed as a function of time at 4 °C and 21 °C at 400 µg L⁻¹ for 6 h and 98.5 h respectively. The initial laccase activities were of 100 U L⁻¹ and 1000 U L⁻¹ for the elimination of EE2 and DCL, respectively. For EE2, an aliquot of 30 µL was taken at the following times: 0, 1, 3 and 6 h. For DCL, an aliquot was taken for analysis at time 0, 19, 26, 38, 50, 62.5, 73 and 98.5 h. These aliquots were then processed following the protocol described in Section 2.2.8.1. The activity was monitored during the experiments and a blank control was used. To ensure that the change in volume and temperature was not significant during the sampling times, the initial solution volume was set to 10 mL. Therefore, total sampled volume was <2% of the initial volume. Regarding EE2, the experiment was repeated with 3 different concentrations: 100 µg L⁻¹, 200 µg L⁻¹, and 600 µg L⁻¹. The K_M and k_{cat} could be briefly determined to identify the limiting parameter. In the case of DCL, the experiment was repeated twice at 4000 µg L⁻¹.

The potential synergistic effect between the two enzymes of interest on EE2, DCL and ABTS was evaluated by comparing the K_M, k_{cat} and K of the two isoenzymes of interest and a 50:50 w/w mixture with the same conditions previously quoted.

2.2.8.5. Statistical analysis

Statistically significant differences for robustness tests were determined by Student's t test at the $\alpha=0.05$ level. For the determination of the enzyme kinetic constants by the linearization method of Lineweaver and Bulk, errors were expressed as a function of the confidence interval. The confidence interval is expressed as a function of the standard error of the slope or of the ordinate at the origin and of the Student's value expressed at $\alpha=0.05$ with $n-2$ degrees of freedom. Calculations were performed by Microsoft Excel (version 365).

2.3. Results

2.3.1. Purification of isoenzymes

Fourteen days after culturing the fungus, the enzymatic activity of the crude extract was around 5 kU L^{-1} and approximately 800 kU L^{-1} after concentration by centrifugation and filtration. Separation of the concentrated extract by SDS-PAGE (Figure S-3) indicated the presence of largely predominant proteins at *circa* 65 kDa. The presence of proteins *circa* 10-15 kDa was also detected in lower amounts. Finally, proteins at *circa* 50, 38, 34 and 28 kDa were also present in trace amounts. Finally, no protein with a mass greater than 100 kDa was observed.

Separation of the same concentrated crude extract by Native-PAGE using ABTS as staining dye, a technique capable of separating and detecting enzymes with oxidizing activity, indicated the presence of two-colored bands (Figure S-4). The upper band containing the oxidizing enzymes was called “Y_n” and the lower band “Y_g”. This notation will be kept throughout the publication for simplicity. According to our results from GelAnalyzer, the proportion of Y_n to Y_g was *circa* 1 to 2.

To purify the oxidizing enzymes, the crude extract was separated by FPLC-SEC (Figure 9, a). Three peaks were observed: The first peak at an elution volume of *circa* 8 mL was the dead volume (V_0), the second peak at an elution volume of *circa* 14 mL was composed of proteins of molecular mass around 60

kDa (V_{e1}) and the third peak at an elution of *circa* 19 mL was composed of proteins of around 10 kDa (V_{e2}). V_{e1} is the only peak containing proteins with oxidative activity (Figure 9, b).

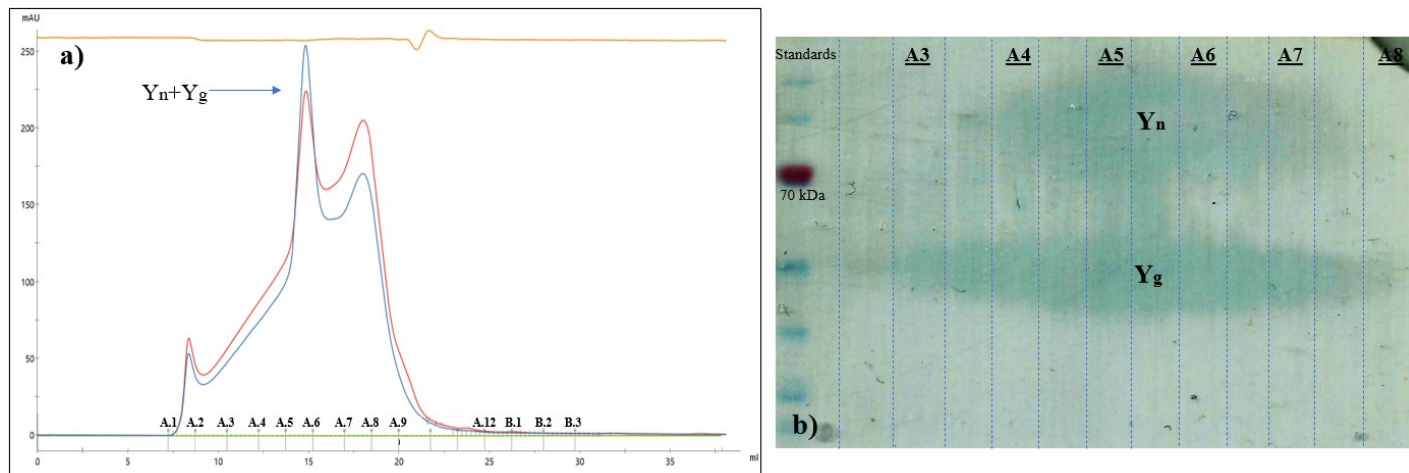


Figure 6. a) Chromatogram obtained by FPLC-SEC showing the proteins contained in the crude extract. b) Native-PAGE of the collected fractions. Orange line: Conductivity; Blue line: 280 nm; red line: 260 nm.

These two bands containing Y_n and Y_g (V_{e1} , Figure 9, b) were cut and separated again in a second SDS-PAGE gel (Figure S-4). These results demonstrated that the proteins *circa* 65 kDa had ABTS-oxidizing activity and that they had a similar apparent mass but different charges. Then, the collected fractions containing the enzymatic activity after FPLC-SEC purification were separated by FPLC-anion exchange chromatography (Figure 10). These results revealed the presence of two peaks: the first with V_{e3} *circa* 32 mL and the second with V_{e4} *circa* 37 mL (Figure 10, a). All fractions were collected, including the two peaks and the flow-through, and were migrated through a Native-PAGE gel (Figure 10, b and c). V_{e3} consists of Y_g , but Y_n was observed for V_{e4} . Y_n was not retained by the anionic resin and was present in the flow-through (Figure 10, b). This method allowed to efficiently separate and purify the two groups of oxidizing enzymes present in the crude extract. The enzymes thus purified were then submitted to peptide mass fingerprinting by LC-TIMS-QTOF for identification.

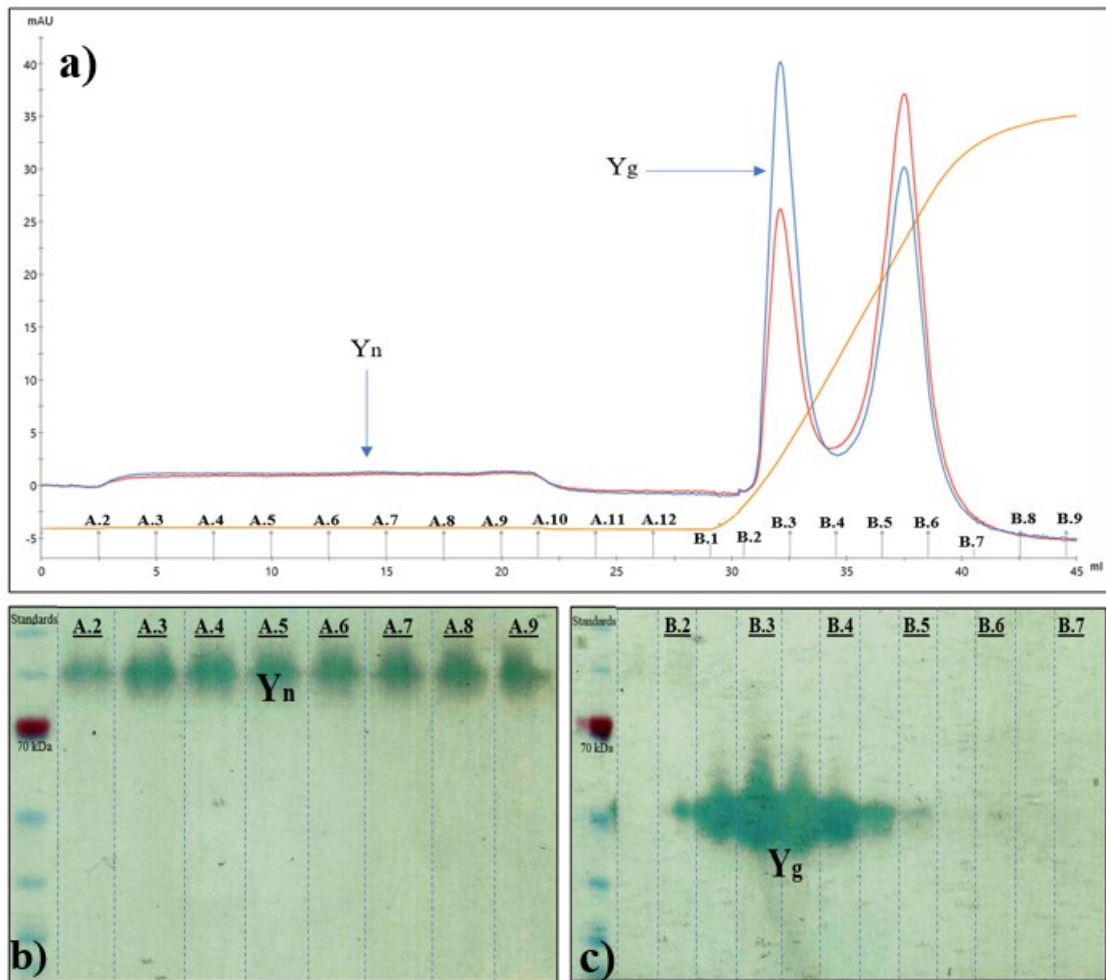


Figure 7. a) Chromatogram obtained by FPLC-anion exchange chromatography showing the proteins contained in the previously purified extract by FPLC-SEC (Figure 9). b & c) Native-PAGE of the collected FPLC fractions. Orange line: Conductivity; Blue line: 280 nm; red line: 260 nm.

2.3.2. Tentative identification of laccase isoenzymes

Based on the peptide mass fingerprinting using trypsin, two peptides of interest from isoenzyme Y_n were identified (Tableau 1). One of the peptides was unique and corresponds to the A0A6M5CX58 laccase, while the use of the leading razor protein, i.e., the protein with the best score, was necessary to match the second peptide to this same laccase.

Three peptides of interest resulting of the Y_g isoenzyme were identified. Two of these peptides are not unique but, the use of the leading razor protein allows it to be affiliated with laccase Q02497. The third peptide was unique to laccase A0A0A7M1X9. No other laccases were detected, so it would seem that *circa* 90% of the observed signal intensity is due to laccase Q02497 and *circa* 10% is due to laccase

A0A0A7M1X9. All identified and named isoenzymes of laccase were from the *T. hirsuta* strain (TRAHI in Uniprot).

Tableau 1. Main results from peptide mass fingerprinting analysis of Y_n and Y_g using trypsin for digestion.

Protein Name	Unique peptides Y_n + leading razor protein	Unique peptides Y_g + leading razor protein	Score	Intensity in Y_n fraction	Intensity in Y_g fraction
Laccase F (A0A0A7M1X9)	0	1+0	114	0	4.6×10^5
Laccase (Q02497)	0	0+2	191	0	5.5×10^6
Laccase 1 (A0A6M5CX58)	1+1	0	124	1.6×10^7	8.3×10^4

Digestion with chymotrypsin produced many more peptides of interest (Tableau 2). In total, 45 peptides of interest resulting from the digestion isoenzyme Y_n by chymotrypsin were identified and 40 of them corresponded to laccase A0A6M5CX58 with a signal intensity around ten times greater than the peptides for other laccases. Several different laccases could constitute the rest of the mixture, with relatively similar intensities between them (e.g. peptides corresponding to laccase A0A2Z2CBW5, A0A0A7M289, A0A0A7685, A0A0A7421), but the sum of their intensities does not exceed 10% of the intensities of the peptides corresponding to laccase A0A6M5CX58.

For isoenzyme Y_g , 42 peptides of interest were identified and 26 of them corresponded to laccase Q02497 with an intensity approximately ten times greater than the peptides specific to laccase F (Tableau 2). The presence of unique A0A6M5CX58 laccase peptides in the Y_g extract at high concentration would indicate possible contamination of the extract (2.2×10^8 versus 9.9×10^7 , tableau 2). However, this contamination is less visible with trypsin digestion (1.6×10^7 versus 8.3×10^4 , tableau 1). The purification of the sample used for digestion with chymotrypsin was carried out after the digestion with trypsin and came from a different batch. This batch was not used in any other experiment.

Tableau 2. Main results from peptide mass fingerprinting analysis from the digestion of Y_n and Y_g by chymotrypsin.

Protein Name	Unique peptides Y _n	Unique peptides Y _g	Score	Intensity in Y _n fraction	Intensity in Y _g fraction
Laccase F (A0A0A7M1X9)	0	6	67	0	4.5×10 ⁷
Laccase (Q02497)	0	2	323	6.6×10 ⁵	2.7×10 ⁸
Laccase 1 (A0A6M5CX58)	19	7	323	2.2×10 ⁸	9.9×10 ⁷

Peptide mass fingerprinting analysis of Y_n and Y_g by trypsin and chymotrypsin are complementary and allowed to conclude that: i) Y_n is composed of 96% of laccase A0A6M5CX58 and 4% of a mixture of other laccases and ii) Y_g is composed of 89% of laccase Q02497 and of 7% laccase F (Figure S-5). For sake of clarity, we will continue to call laccase Y_n and laccase Y_g these two mixtures.

2.3.3. Characterization of the laccase isoenzymes for application to bioremediation

2.3.3.1. Tolerance tests

Results of tolerance tests are shown in Figure 11. A decrease in activity of *circa* 50% for both laccases was observed when exposed to organic solvents (MeOH or ACN) at 25% *v/v* concentration. On the other hand, the activity drops to *circa* 40% for both laccases in the presence of 50 mM NaCl or KCl. However, laccase Y_g appears to be more tolerant than laccase Y_n towards these salts. The enzymatic activity of both laccases after acidification of the wastewater effluent to pH 4 is not significantly different from the reference activity conditions (deionized water at pH 4).

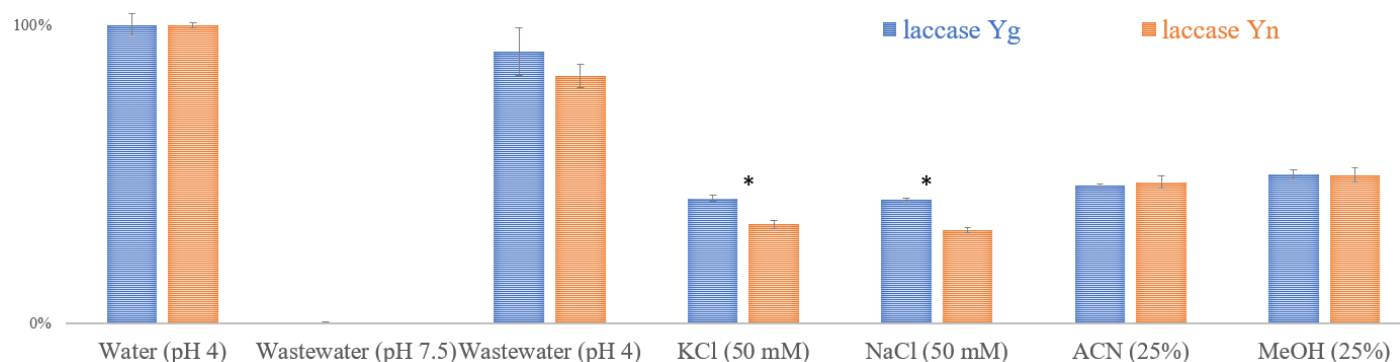


Figure 8. Mean residual relative activity (%) of laccase Y_n and Y_g in the presence of diverse interferences. Error bars indicate standard deviations (n=3). Asterisks (*) indicate that the observed difference is statistically significant ($p < 0.05$).

2.3.3.2. Stability tests

Results of the stability tests are shown in Figure 12. After 24 h at pH 2.5, laccase Y_g has its activity reduced by half, which was not the case for laccase Y_n which appears to tolerate low pH well since it did not show a significant decrease in activity over the incubation time. Activity of both laccases does not decrease with the presence of copper sulfate. However, the presence of urea or trypsin decreases the activity of the two laccases, but laccase Y_n was significantly more affected than laccase Y_g. No significant decrease in laccase activity was measured after exposure to wastewater effluent (filtered or not, data not shown).

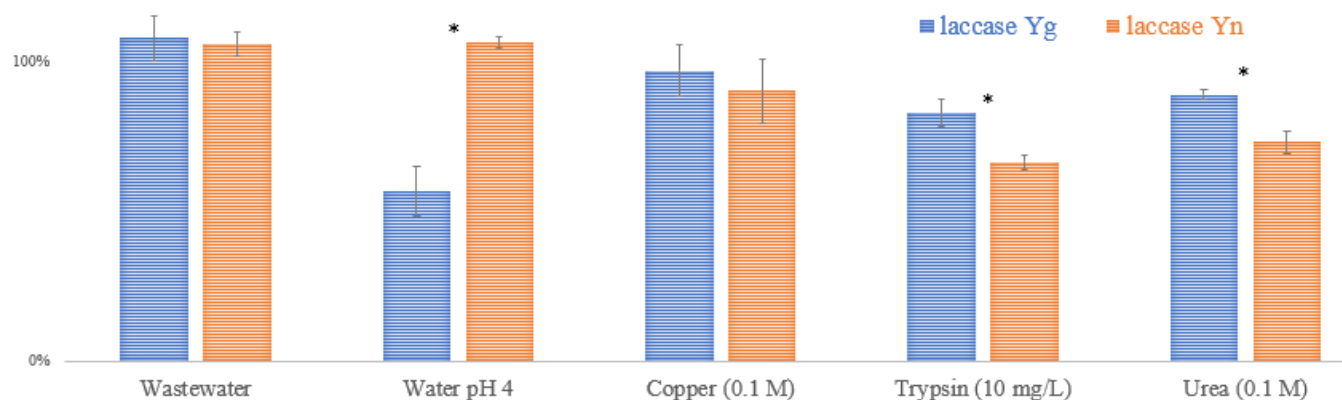


Figure 9. Mean residual relative activity (%) of laccase Y_g and Y_n after 48 h of exposure to various denaturants (72 h at pH 4). Error bars indicate the standard deviations (n=3). Asterisks (*) indicate that the observed difference is statistically significant ($p < 0.05$).

2.3.3.3. Removal kinetics of EE2 and DCL by laccase Y_g and Y_n

The elimination kinetics of the two compounds were relatively similar for the two isoenzymes, which is reflected by a relatively similar K constant: $(4.5 \pm 0.3) \times 10^1 \text{ L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and $(4 \pm 1) \times 10^1 \text{ L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ for DCL and $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and $(1.5 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ for EE2 for laccase Y_g and laccase Y_n respectively (Tableau 3). However, the K_M is globally higher for laccase Y_g than for laccase Y_n with a result of 9.8 ± 0.7 and $4 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}$ for DCL and 5.6 ± 0.9 and $3.7 \pm 0.5 \text{ } \mu\text{M}$ for EE2, respectively (Tableau 3). Conversely, k_{cat} is overall lower for the laccase Y_g compared to laccase Y_n with a result of $(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ and $(9 \pm 3) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ for DCL and $(7 \pm 1) \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $(3.4 \pm 0.4) \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ for EE2 (Tableau 3). Therefore, the constant K, being the ratio between the constant k_{cat} and K_M , was relatively similar in both laccases, as mentioned earlier. For the case of EE2 and ABTS, no case of synergy effect was observed contrary to the case of DCL. The impact of the synergy is positive and increases performance by approximately 50% (Tableau 3).

Tableau 3. Kinetic constants (K_M , k_{cat} , K) obtained by the two isoenzymes individually and mixed (1:1, w/w) taking ABTS, DCL and EE2 as substrate at pH 7. Error indicates the 95% confidence interval.

Kinetic constant	Isoenzyme	ABTS	DCL	EE2
K_M (μM)	Y_g	30.2 ± 0.4	9.8 ± 0.7	5.6 ± 0.9
	$Y_g + Y_n$	32.0 ± 0.6	1.2 ± 0.2	4 ± 1
	Y_n	33.7 ± 0.7	4 ± 1	3.7 ± 0.5
k_{cat} (min^{-1})	Y_g	$(2.36 \pm 0.02) \times 10^4$	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$(7 \pm 1) \times 10^{-1}$
	$Y_g + Y_n$	$(1.75 \pm 0.03) \times 10^4$	$(4.3 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	$(5 \pm 2) \times 10^{-1}$
	Y_n	$(1.04 \pm 0.04) \times 10^4$	$(9 \pm 3) \times 10^{-3}$	$(3.4 \pm 0.4) \times 10^{-1}$
K ($\text{L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)	Y_g	$(1.30 \pm 0.02) \times 10^7$	$(4.5 \pm 0.3) \times 10^1$	$(2.1 \pm 0.4) \times 10^3$
	$Y_g + Y_n$	$(9.1 \pm 0.2) \times 10^6$	$(6 \pm 1) \times 10^1$	$(1.9 \pm 0.9) \times 10^3$
	Y_n	$(5.1 \pm 0.1) \times 10^6$	$(4 \pm 1) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^3$

2.3.3.4. Removal of DCL and EE2 at different temperatures by laccase Y_g

For EE2, after the first hour, approximately 80% and 30% of removal was observed at 21 and 4 °C, respectively. After 6 h, removal was complete at both temperatures. Thus, the ratio of removal (21 vs 4

°C) was approximately 3.2 after a contact time of 1 h. Changing the initial concentration of EE2 (100, 200, and 600 $\mu\text{g L}^{-1}$) gives us ratios of 3.3, 3.0, and 3.1 respectively (Figure 13 and Figure S-6) with an overall similar elimination pattern, regardless of the concentration. This demonstrates that the elimination kinetics at 4 °C are reduced by about 67 to 70% compared to 21 °C, which can be explained by a reduction of a factor 4 in the k_{cat} (the K_M was relatively similar, data not shown).

In the case of DCL, after 20 h, about 40 and 20% removal was observed at 21 and 4 °C, respectively. Then the difference in removal kinetics observed between the two temperatures are much less clear, with a decrease of about 20 and 25% from the 20th hour to the 40th h. Finally, the removal kinetics at 4 °C is close than at 21 °C (20%) from 40th to 96th h (Figure 13). The ratio of elimination kinetics 21 °C vs 4 °C is approximately 1.33. This trend is confirmed at a concentration of 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$, with a similar final elimination time at 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (approximately 90 h) (Figure S-8). Thus, enzyme activity remained constant throughout the experiment (Figure 13).

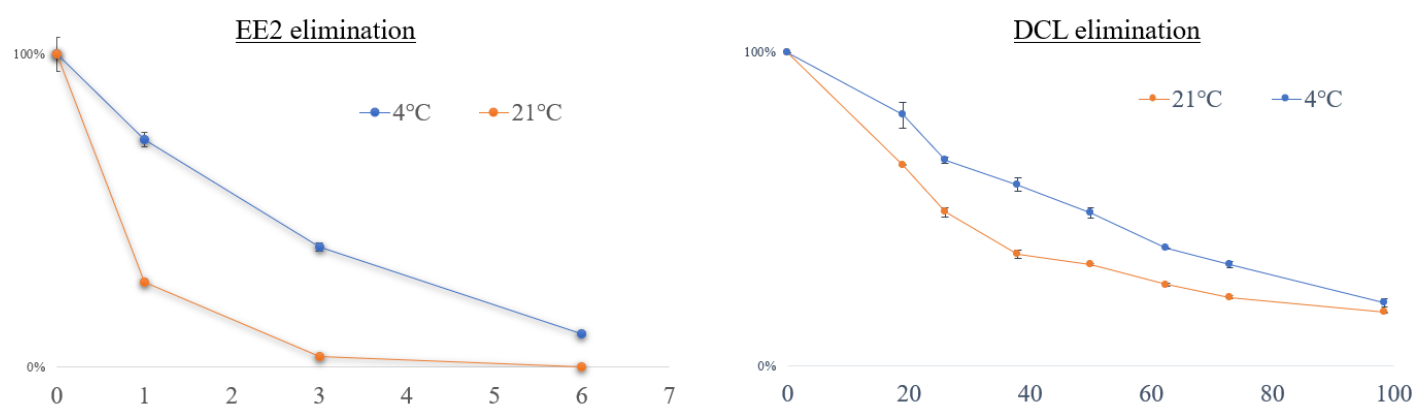


Figure 10. Relative elimination of DCL and EE2 at 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%) as a function of time (h) at 4 and 21 °C and pH 7, by laccase Y_g .

2.4. Discussion

2.4.1. Purification of isoenzymes

Although molecular weight, robustness, and removal performance of laccases Y_n and Y_g are very close, we observe a totally different behavior of their interaction with ions. In fact, 275 mM of NaCl is sufficient to desorb the Y_g laccase from the anionic column, whereas less than 100 mM would be needed for the Y_n

laccase (Figure 10). Chloride ions are often used as competing ions in the literature, with a gradient that can vary from 0 to 1000 mM and a pH between 4.8 and 8.0 [53–56]. Moreover, unlike the laccase Y_g , we observe a very weak migration of the laccase Y_n through the Native-PAGE gel (migrating from the anode towards the cathode, negatively charged, Figure S-3). These two observations could be related, partly explained by a higher pI at the surface of the laccase Y_n .

A strong disparity of the results in connection with molecular mass of the purified proteins was observed according to the method used. For example, the molecular mass of laccase Y_g was 56, 66, or 51 kDa for the theoretical mass, SDS-PAGE and FPLC-SEC, respectively (Figure S-8). The theoretical mass could underestimate the molecular weight because it does not take into account glycosylation which generally represents 10 to 30% of the mass of the enzyme [57]. As for SDS-PAGE, previous studies indicate that in 40% of cases, the method overestimates or underestimates the exact weight [58,59]. Finally, in the case of size exclusion-FPLC, the particular three-dimensional structure of the laccase (up to 30% glycosylation) [60] could be different from that of the standards, thus giving distorted results. Although the mass of fungal laccase is often between 60 and 70 kDa [61,62], rare exceptions have measured a mass of about 45 kDa [63,64].

2.4.2. Tentative identification of laccase isoenzymes

The identification of laccases in both mixtures was based on a limited set of entries (63 entries for proteins including 17 for laccase from *T. hirsuta*) in UniProt, therefore only proteins listed in the database can be accurately identified. Few peptides were formed with trypsin digestion, which can be explained by the low abundance of arginine or lysine in laccases (*circa* 20-30 for over 500 amino acids) and their distribution through the peptide sequence, either too close or too far apart, thus giving peptides either too small or too large. However, since two complementary digestion methods (trypsin and chymotrypsin) were used and high scores between 67 and 323 were obtained, the results are reliable and the identification has a high confidence, indeed, a score above 40 could be considered high confidence [50].

Identifying a protein by determining its amino acid sequence can be complex and expensive. Peptide mass fingerprinting is a simpler and less expensive alternative based on enzymatic digestion of proteins to obtain characteristic peptides and database searching. However, it is difficult to evaluate the completeness of the database which limits this technique to study unknown laccases. Therefore, an

alternative approach based on the classification of laccases into groups according to physico-chemical parameters will be discussed in section 2.4.3.5.

2.4.3. Characterization and comparison of the laccase isoenzymes for application to bioremediation

2.4.3.1. Tolerance tests

Laccase activity is often measured under optimal conditions, far from the actual conditions of use. Activity tests performed in this study were measured a few minutes after the addition of different interferents so the loss of activity is essentially reversible. Interferences are known to bind with the T2/T3 copper center and prevent electron transfer from the T1 site, more particularly small anions such as chloride or hydroxide [65]. Laccase isoenzyme Y_g seems to be less disturbed than Y_n by chloride ions. The same observation was made with hydroxide anions with a relative activity decrease from 100% for both isoenzymes to 22 and 4% for laccases Y_g and Y_n , respectively, at pH 6 (Figure S-9). Our results agree with the literature [46] which indicates a significant decrease of laccase activity (-10%) from a chloride concentration of 5 mM. Regarding organic solvents, our results are also consistent with the literature [46]. Indeed up to 10% in organic solvent (methanol, acetonitrile) the loss of activity is negligible. In parallel, results show that isoenzymes Y_n and Y_g are weakly affected by wastewater. This result is especially interesting since it demonstrates that the complex composition of the effluent does not appear to significantly disturb the activity of both laccases and therefore the possibility of using laccases in this type of matrix.

2.4.3.2. Stability tests

The two isoenzymes appear to have similar stability (Figure 12). The low denaturation observed with the tested denaturants (100 mM urea, 100 mM copper, 10 mg L⁻¹ trypsin, wastewater) indicates a high potential for use, even in a complex matrix. Moreover, the literature indicates that up to 10 mM, most metals do not have a significant negative impact (or few) on laccase activity (e.g. magnesium, copper, zinc, calcium) [46,56,63,64,66,67]. The stability seems slightly greater for the laccase Y_g (*versus* trypsin and urea used as denaturants) except at acid pH (2.5) where the laccase Y_n has excellent stability. Equivalent studies have been carried out and strong disparities have been observed between other

isoenzymes. For example, laccase α and β retain more than 90% of their initial activities, against 55 and 15% for laccase γ and δ respectively in 25 h tests at pH 4. Generally, laccase is more stable at neutral pH for two reasons: i) high acidity modifies the ionization of the side chains and disrupts the normal functioning of laccase; and ii) hydroxide anions can interact with the copper core of laccase [68].

Overall, the robustness (stability and tolerance) of the two isoenzymes is relatively close, which could be explained by a similar percentage of glycosylation (based on laccase Q02497 and A0A6M5CX58, results not shown). Indeed, several studies suggest that the good stability of a laccase is directly linked to its percentage of glycosylation, playing the role of a protective shell. Finally, although free laccases lose their activity after one week (results not shown) [69,70], it is known that their immobilization on a solid support increases their stability. Indeed, it has been reported that immobilized laccases can conserve 50% of their initial activity after 15 days [70]. In parallel, the present study demonstrates that wastewater does not decrease the activity of laccase which is an essential property and almost never determined for the application of laccases to the bioremediation of sewage.

2.4.3.3. Removal kinetics of EE2 and DCL by laccase Y_g and Y_n

Since the formation of new substrates for laccase from DCL or EE2 will bias the constants obtained (K_M , k_{cat} and K) like hydroxy-DCL or hydroxy-EE2 [71,72]. We recommend adding the term "apparent" to be more accurate. Very few studies in the literature were available to compare the results concerning pharmaceutical compounds. For example, a K_M of 3.78 μM for EE2 using laccase from *T. versicolor* has been determined in a previous study [41], compared to 4 ± 1 μM in this study. This is explained by equivalent oxidation-reduction power of laccases from *T. versicolor* and *T. hirsuta* [61]. Our results indicate a relatively equivalent K for laccases Y_g and Y_n , thanks to the compensation of K_M and k_{cat} . Similar results have been identified in the literature: laccase α , β and γ have a very close K despite a very strong difference in the K_M , ranging from 22 to 359 μM and in the k_{cat} , ranging from 55 to 647 s^{-1} for the transformation of the ABTS [45,73].

To our knowledge, kinetic studies involving synergistic effects of enzymes on pharmaceutical compounds are rare in the literature. We can quote for example the decolorization of indigo carmine was 15, 10 and 5% by laccase I, II, III respectively and 58% when the three of them were combined [74]. However, a

definitive explanation for this phenomenon remains unknown. It is possible that the synergistic effect observed could be explained by a greater affinity of one isoenzyme to the initial compounds and of the other isoenzyme to the transformed compounds. However, additional experiments, out of the scope of the present study, are necessary to validate this hypothesis.

2.4.3.4. Removal of DCL and EE2 at different temperatures by laccase *Y_g*

The rapid transformation and the kinetic constants obtained for EE2 are consistent with previous studies [41,75]. EE2, like many estrogens, is known to be easily transformed by laccase, in particular thanks to the presence of a phenol group within the structure but also a lower oxidation-reduction potential than that of the laccase of the *T. hirsuta* strain (0.40-0.60 V vs Ag/AgCl for EE2) [76–79]. The removal of DCL by laccases is known [13,72]. In this study, its rate of transformation is almost 100 times lower than that of EE2, which could be explained by the absence of a phenol group and an higher oxidation potential (0.65 V vs Ag/AgCl for DCL) [80,81]

The drop in temperature had a negative impact on the kinetics of transformation of both pharmaceutical compounds by laccase. However, contrary to the transformation of EE2, the decrease in temperature had a lower impact on DCL transformation rate, especially at 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figure S-8). One of the hypotheses that can explain this observation is that the temperature drop ($\Delta T = 18\text{ }^{\circ}\text{C}$) was not sufficient for the Gibbs energy to become unfavorable. Unlike the case of EE2, if the main mechanism of transformation of DCL is by the formation of a free radical, this mechanism could be less affected by low temperatures and could thus explain the small difference in kinetics between the two temperatures. In parallel, the transformation kinetics was also close at 400 or 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (80% transformation after 90 hours for both, Figure 13 and S-8), which is nearer to order 1 reaction (usually as a radical reaction) than enzymatic reaction (as a Michaelis-Menten reaction). To our knowledge, this study was the first to compare the transformation kinetics of pharmaceutical compounds by purified laccase as a function of temperature.

2.4.3.5. Classification of laccases

One of the main limitations in laccase research nowadays is the impossibility of standardizing the results obtained from the characterization of laccases by the different research groups. Thus, it is difficult or impossible to compare results reliably. Another important limitation is the excessive number of existing laccases. Only for fungi of the genus *Trametes*, more than a hundred laccases have been listed and new strains are regularly discovered, it will be difficult to characterize all the isoenzyme for a given application. Another important issue was the difficulty in clearly identifying a laccase without having to determine the entire peptide sequence. Proteomic studies could be an alternative, but it is not possible to know their completeness of the database. Finally, identifying all the peptide sequences of all the isoenzymes seems necessary.

The classification of laccases in groups would allow to solve the three points previously: i) as the constitutive laccase seems to be secreted by all fungi of the class *Polyporaceae* and they share similar physicochemical properties [44,82], it would be possible to use it as a reference isoenzyme for the characterization of inducible isoenzymes and therefore to work semi-quantitatively, ii) to avoid the characterization of all the isoenzymes of each strain for a given application, it would be possible to characterize a single isoenzyme from each group, which would be representative of their set, iii) the exact identification of an isoenzyme by genomic tools is not obligatory to classify it in a group, which does not depends solely on its physico-chemical characteristics. Thus, this will ultimately lead to more concise and effective results for knowledge sharing and will improve the identification of the best enzymes for specific applications, such as the bioremediation of wastewater.

A very promising classification based on the homology of laccase-secreting genes from the fungi of *Polyporaceae* family based on eight groups named A-H was developed by Savinosa et al. [44,47,60,83,84]. In parallel, Savinosa and al, by reviewing the characterization studies available in the literature, observed similar physicochemical properties between the different laccases, because two laccases from the same group will share similar characteristics [47,84].

Unfortunately, the tools allowing the classification of isoenzymes based on physicochemical properties are still underdeveloped. This is why, from the results of this study, and based on the studies already published [47], a set of simple tools for classifying laccases are proposed herein. To classify the two

purified isoenzymes in one of the eight groups proposed by Savinosa et al., and based on their results, we identified four discriminating parameters: molecular weight, the half-life time at 60 °C, the K_M using ABTS as substrate and the pI. Tableau 4 describes the eight isoenzymes (A-H) from *T. hirsuta 072* (which can be considered as references) [44,47,83] according to the four parameters chosen. For more details concerning the choice of parameters please consult section S-10 in the Supporting Information.

Tableau 4. Reference isoenzymes from *T. hirsuta 072* according to four key parameters [44,47,83].

	molecular weight	pI	t_{1/2} 60 °C	K_M (ABTS)
Laccase A (group A)	<i>circa</i> 66 kDa	< 5	> 10 min	< 80 μM
Laccase B (group B)	<i>circa</i> 66 kDa	> 6	<i>circa</i> few min	< 80 μM
Laccase C (group C)	> 71 kDa	< 5	<i>circa</i> few min	> 200 μM
Laccase D (group D)	> 71 kDa	> 6	> 10 min	> 200 μM
Laccase F (group F)	interm	> 6	interm	interm
Laccase G (group G)	> 71kDa	< 5	nd	> 200 μM
Laccase H (group H)	interm	< 5	> 10 min	> 200 μM

Note: Interm intermediate value. ND = no defined.

For the case of laccase Y_g , results indicate similar characteristics with the group A. It is manifested by a relatively low molecular weight (*circa* 66kDa, experimentally determined by SDS-PAGE), a relatively high isoelectric point (<5, theoretical pI of laccase Q02497), a relatively high half-life at 60 °C (*circa* 30 min, experimentally determined, data no shown) and a low K_M (<80 μM, experimentally determined). Moreover, constitutive laccase (group A) appears to be the most secreted isoenzyme, which is consistent with the results for laccase Y_g . For the case of the laccase Y_n , it has characteristics similar to group B. This is suggested by a relatively low molecular weight (*circa* 66 kDa, experimentally determined by SDS-PAGE), a relatively high isoelectric point (>6, theoretical pI of laccase A0A6M5CX58), a relatively low half-life at 60 °C (<3 min, experimentally determined) and a low K_M (<80 μM, experimentally determined). Finally, the percentage of similarity of the peptide sequence could be an additional parameter for the classification of an isoenzyme. In our case, the percentage of similarity between laccase Y_g and laccase A is the highest with 88% (using laccase Q02497). A similar result is obtained between laccase Y_n and laccase B with 84% (using laccase A0A6M5CX58). In the future, more tools could be

standardized such as SDS-PAGE for the determination of molecular weight and thus obtain comparable results. In parallel, the commercial laccase, such as *T. versicolor* one, could be used as a standard, because it remains commonly used and remains easily accessible.

The similar results of the stability tests between laccase Y_g and Y_n are consistent at a similar percentage of glycosylation (probably *circa* 10%), as it is the case for laccases of groups A and B. The difference in isoelectric point could explain the greater impact of chloride ions on laccase Y_n . The laccase Y_n (group B) has an overall lower K_M and k_{cat} than the laccase Q02497 (group A) [60]. Group B laccases are known to have a low K_M . However, the lack of information on k_{cat} in the literature gives the impression that group B laccases are more efficient. While the results indicate also lower k_{cat} , which does not necessarily make it more efficient, with a similar K constant [44,60]. Finally, the group A-B laccases could be complementary. Indeed, group A laccase, with a high k_{cat} , would quickly and efficiently transform substrates at high concentration, then after acidification of the medium, group B laccase would attack more meticulously at low concentration substrates, thanks to a lower K_M and a high stability at very low pH.

2.5. Conclusion

The objective of this study was to characterize and compare two laccase isoenzymes from the *T. hirsuta* strain for the bioremediation of municipal wastewater. Laccase Y_g (composed mainly of laccase Q02497 or a closely related laccase) and laccase Y_n (composed mainly of laccase A0A6M5CX58 or a closely related laccase) are the two major isoenzymes of the crude extract, based on peptide mass fingerprinting analysis. Two key parameters for the intended application were evaluated for both isoenzymes: robustness (tolerance and stability) in a complex medium and performance for the transformation of pharmaceutical compounds. Regarding robustness, the two isoenzymes do not seem to be interfered by a wastewater plant effluent and preserve all of their respective activity. The same observation was done concerning stability; the two isoenzymes preserved all of their activity after exposure to a wastewater plant effluent for 48 h (filtered or not). The performance tests indicate that laccase Y_g has a higher k_{cat} but also a lower K_M than laccase Y_n for EE2 and DCL thus making the conclusion of this point more nuanced with a relatively similar K constant. Synergistic effects were also observed for DCL. Thus, the Y_n and Y_g isoenzymes

could be complementary. The use of laccase for bioremediation at low temperature is possible, and in the case of DCL, the decrease in the rate of transformation remains relatively low (*circa* 25%). Therefore, bioremediation of wastewater using these laccases remains possible in cold climates. Finally, this study proposed a set of tools allowing the classification of isoenzymes based on a few experiments that could improve the efficiency and the comparability of laccase properties between research groups. The results would indicate that laccase Y_g would be from group A while laccase Y_n from group B.

2.6. Credit authorship contribution statement

Younes EL YAGOUBI: conceptualization, data processing, formal analysis, investigation, methodology, writing – review and editing, writing – original draft. **Bruno LEMIEUX**: formal analysis, investigation, methodology, data curation, software. **Pedro SEGURA**: conceptualization, supervision, resource, investigation, visualization, validation, writing – review and editing, writing – original draft. **Hubert CABANA**: supervision, conceptualization, project administration, funding acquisition, resources, writing – review and editing, writing – original draft.

2.7. Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

2.8. Acknowledgements

This project was undertaken with the financial support extended by the Government of Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), as well as *Le programme de formation orientée vers la nouveauté, la collaboration et l'expérience en recherche - Le programme en technologies environnementales de décontamination et gestion intégrée des eaux et effluents résiduaires* (FONCER-TEDGIEER).

2.9. References

- [1] Patel M, Kumar R, Kishor K, Mlsna T, Pittman CU, Mohan D. Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem Rev* 2019;119:3510–673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>.
- [2] Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res* 2015;72:3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.
- [3] Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci Total Environ* 2012;429:123–55. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.
- [4] Acuña V, Ginebreda A, Mor JR, Petrovic M, Sabater S, Sumpter J, et al. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environ Int* 2015;85:327–33. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.023>.
- [5] Klačić M, Jirsa F. 17 α -Ethinylestradiol (EE2): concentrations in the environment and methods for wastewater treatment – an update. *RSC Adv* 2022;12:12794–805. <https://doi.org/10.1039/D2RA00915C>.
- [6] Hoffmann F, Kloas W. Estrogens Can Disrupt Amphibian Mating Behavior. *PLoS ONE* 2012;7:e32097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032097>.
- [7] Valdés ME, Marino DJ, Wunderlin DA, Somoza GM, Ronco AE, Carriquiriborde P. Screening Concentration of E1, E2 and EE2 in Sewage Effluents and Surface Waters of the “Pampas” Region and the “Río de la Plata” Estuary (Argentina). *Bull Environ Contam Toxicol* 2015;94:29–33. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1417-0>.
- [8] Boucher V, Beaudon M, Ramirez P, Lemoine P, Volk K, Yargeau V, et al. Comprehensive evaluation of non-catalytic wet air oxidation as a pretreatment to remove pharmaceuticals from hospital effluents. *Environ Sci Water Res Technol* 2021;7:1301–14. <https://doi.org/10.1039/D1EW00203A>.
- [9] Alharbi SK, Price WE. Degradation and Fate of Pharmaceutically Active Contaminants by Advanced Oxidation Processes. *Curr Pollut Rep* 2017;3:268–80. <https://doi.org/10.1007/s40726-017-0072-6>.

- [10] Alharbi SK, Price WE, Kang J, Fujioka T, Nghiem LD. Ozonation of carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and trimethoprim and formation of major oxidation products. *Desalination Water Treat* 2016;57:29340–51. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1172986>.
- [11] Dai C, Zhou X, Zhang Y, Duan Y, Qiang Z, Zhang TC. Comparative study of the degradation of carbamazepine in water by advanced oxidation processes. *Environ Technol* 2012;33:1101–9. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.610359>.
- [12] Mahamuni NN, Adewuyi YG. Advanced oxidation processes (AOPs) involving ultrasound for waste water treatment: A review with emphasis on cost estimation. *Ultrason Sonochem* 2010;17:990–1003. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.09.005>.
- [13] Alharbi SK, Nghiem LD, van de Merwe JP, Leusch FDL, Asif MB, Hai FI, et al. Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from *Trametes versicolor*: Transformation products and toxicity of treated effluent. *Biocatal Biotransformation* 2019;37:399–408. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1580268>.
- [14] Mir-Tutusaus JA, Baccar R, Caminal G, Sarrà M. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Res* 2018;138:137–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056>.
- [15] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Caminal G, Vicent T. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J Hazard Mater* 2010;176:836–42. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.112>.
- [16] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, Caminal G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 2009;74:765–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.040>.
- [17] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Blánquez P, Vicent T, Caminal G. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresour Technol* 2010;101:2159–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.019>.
- [18] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Caminal G, Vicent T. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere* 2010;78:474–81. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.009>.

- [19] Jelic A, Cruz-Morató C, Marco-Urrea E, Sarrà M, Perez S, Vicent T, et al. Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Res* 2012;46:955–64. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.063>.
- [20] Prieto A, Möder M, Rodil R, Adrian L, Marco-Urrea E. Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. *Bioresour Technol* 2011;102:10987–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.055>.
- [21] Cruz-Morató C, Jelić A, Perez S, Petrović M, Barceló D, Marco-Urrea E, et al. Continuous treatment of clofibric acid by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor: Identification of transformation products and toxicity assessment. *Biochem Eng J* 2013;75:79–85. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.020>.
- [22] Cruz-Morató C, Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barceló D, Marco-Urrea E, Vicent T, et al. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Res* 2013;47:5200–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.007>.
- [23] Cruz-Morató C, Lucas D, Llorca M, Rodriguez-Mozaz S, Gorga M, Petrovic M, et al. Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. *Sci Total Environ* 2014;493:365–76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.117>.
- [24] Gros M, Cruz-Morato C, Marco-Urrea E, Longrée P, Singer H, Sarrà M, et al. Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products. *Water Res* 2014;60:228–41. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.042>.
- [25] Ferrando-Climent L, Cruz-Morató C, Marco-Urrea E, Vicent T, Sarrà M, Rodriguez-Mozaz S, et al. Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. *Chemosphere* 2015;136:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.051>.
- [26] Llorca M, Lucas D, Ferrando-Climent L, Badia-Fabregat M, Cruz-Morató C, Barceló D, et al. Suspect screening of emerging pollutants and their major transformation products in wastewaters treated with fungi by liquid chromatography coupled to a high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2016;1439:124–36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.077>.

- [27] Haroune L, Saibi S, Cabana H, Bellenger J-P. Intracellular Enzymes Contribution to the Biocatalytic Removal of Pharmaceuticals by *Trametes hirsuta*. *Environ Sci Technol* 2017;51:897–904. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04409>.
- [28] Cuprys A, Thomson P, Suresh G, Roussi T, Brar SK, Drogui P. Potential of agro-industrial produced laccase to remove ciprofloxacin. *Environ Sci Pollut Res* 2022;29:10112–21. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13578-2>.
- [29] Becker D, Rodriguez-Mozaz S, Insa S, Schoevaart R, Barceló D, de Cazes M, et al. Removal of Endocrine Disrupting Chemicals in Wastewater by Enzymatic Treatment with Fungal Laccases. *Org Process Res Dev* 2017;21:480–91. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00361>.
- [30] Arca-Ramos A, Kumar VV, Eibes G, Moreira MT, Cabana H. Recyclable cross-linked laccase aggregates coupled to magnetic silica microbeads for elimination of pharmaceuticals from municipal wastewater. *Environ Sci Pollut Res* 2016;23:8929–39. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6139-x>.
- [31] Ntougias S, Baldrian P, Ehaliotis C, Nerud F, Merhautová V, Zervakis GI. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresour Technol* 2015;189:121–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149>.
- [32] Ariste AF, Batista-García RA, Vaidyanathan VK, Raman N, Vaithyanathan VK, Folch-Mallol JL, et al. Mycoremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons from a biorefinery wastewater and concomitant production of lignin modifying enzymes. *J Clean Prod* 2020;253:119810. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119810>.
- [33] Steevensz A, Al-Ansari MM, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples. *J Chem Technol Biotechnol* 2009;84:761–9. <https://doi.org/10.1002/jctb.2109>.
- [34] Ba S, Haroune L, Cruz-Morató C, Jacquet C, Touahar IE, Bellenger J-P, et al. Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Sci Total Environ* 2014;487:748–55. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.004>.
- [35] Cabana H, Jones JP, Agathos SN. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J Biotechnol* 2007;132:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.948>.

- [36] Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:215–42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.
- [37] Vasina DV, Pavlov AR, Koroleva OV. Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* st. 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate. *BMC Microbiol* 2016;16:106. <https://doi.org/10.1186/s126-016-0729-0>.
- [38] Shleev S, Christenson A, Serezhenkov V, Burbaev D, Yaropolov A, Gorton L, et al. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. *Biochem J* 2005;385:745–54. <https://doi.org/10.1042/BJ20041015>.
- [39] Hachi M, Chergui A, Yeddou AR, Selatnia A, Cabana H. Removal of acetaminophen and carbamazepine in single and binary systems with immobilized laccase from *Trametes hirsuta*. *Biocatal Biotransformation* 2017;35:51–62. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1280032>.
- [40] Becker D, Varela Della Giustina S, Rodriguez-Mozaz S, Schoevaart R, Barceló D, de Cazes M, et al. Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresour Technol* 2016;219:500–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.004>.
- [41] Auriol M, Filali-Meknassi Y, Tyagi RD, Adams CD. Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water Res* 2007;41:3281–8. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.008>.
- [42] Cabana H, Jones JP, Agathos SN. Elimination of Endocrine Disrupting Chemicals using White Rot Fungi and their Lignin Modifying Enzymes: A Review. *Eng Life Sci* 2007;7:429–56. <https://doi.org/10.1002/elsc.200700017>.
- [43] Nguyen LN, Hai FI, Price WE, Leusch FDL, Roddick F, McAdam EJ, et al. Continuous biotransformation of bisphenol A and diclofenac by laccase in an enzymatic membrane reactor. *Int Biodeterior Biodegrad* 2014;95:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.017>.
- [44] Vasina DV, Mustafaev ON, Moiseenko KV, Sadovskaya NS, Glazunova OA, Tyurin AA, et al. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. *Biochimie* 2015;116:154–64. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.015>.
- [45] Koschorreck K, Richter SM, Swierczek A, Beifuss U, Schmid RD, Urlacher VB. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C

coupling and oxidation of PAHs. *Arch Biochem Biophys* 2008;474:213–9. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.009>.

[46] Zhuo R, Zhang J, Yu H, Ma F, Zhang X. The roles of *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 laccase isoenzymes in decolorization of synthetic dyes and the transformation pathways. *Chemosphere* 2019;234:733–45. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.113>.

[47] Savinova OS, Moiseenko KV, Vavilova EA, Chulkin AM, Fedorova TV, Tyazhelova TV, et al. Evolutionary Relationships Between the Laccase Genes of Polyporales: Orthology-Based Classification of Laccase Isozymes and Functional Insight From *Trametes hirsuta*. *Front Microbiol* 2019;10:152. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00152>.

[48] Marco-Urrea E, Parella T, Gabarrell X, Caminal G, Vicent T, Adinarayana Reddy C. Mechanistics of trichloroethylene mineralization by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 2008;70:404–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.074>.

[49] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

[50] Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res* 2011;10:1794–805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>.

[51] Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc* 1934;56:658–66. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>.

[52] Dion-Fortier A, Gravel A, Guérette C, Chevillat F, Blais S, Auger S, et al. Signal enhancement in laser diode thermal desorption-triple quadrupole mass spectrometry analysis using microwell surface coatings. *J Mass Spectrom* 2019;54:167–77. <https://doi.org/10.1002/jms.4328>.

[53] Du M, Zhao L, Li C, Zhao G, Hu X. Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma Lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. *Eur Food Res Technol* 2007;224:659–65. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0355-4>.

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

[55] Han M-J, Choi H-T, Song H-G. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *J Microbiol Seoul Korea* 2005;43:555–60.

- [56] Zhu Y, Zhang H, Cao M, Wei Z, Huang F, Gao P. Production of a thermostable metal-tolerant laccase from *Trametes versicolor* and its application in dye decolorization. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2011;16:1027–35. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0129-0>.
- [57] Morozova OV, Shumakovich GP, Shleev SV, Yaropolov YaI. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl Biochem Microbiol* 2007;43:523–35. <https://doi.org/10.1134/S0003683807050055>.
- [58] Shirai A, Matsuyama A, Yashiroda Y, Hashimoto A, Kawamura Y, Arai R, et al. Global Analysis of Gel Mobility of Proteins and Its Use in Target Identification. *J Biol Chem* 2008;283:10745–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709211200>.
- [59] Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:1760–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>.
- [60] Savinova OS, Moiseenko KV, Vavilova EA, Tyazhelova TV, Vasina DV. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: Twins with different faces. *Biochimie* 2017;142:183–90. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.013>.
- [61] Strong PJ, Claus H. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2011;41:373–434. <https://doi.org/10.1080/10643380902945706>.
- [62] Enguita FJ. *Structural Biology of Fungal Multicopper Oxidases* 2011. <https://doi.org/10.13140/2.1.3040.7689>.
- [63] Chmelová D, Ondrejovič M. Purification and characterization of extracellular laccase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* and decolorization of triphenylmethane dyes: Dye decolorization by *Ceriporiopsis subvermispora* laccase. *J Basic Microbiol* 2016;56:1173–82. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600152>.
- [64] Zheng F, An Q, Meng G, Wu X-J, Dai Y-C, Si J, et al. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. *Int J Biol Macromol* 2017;102:758–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.089>.
- [65] Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. “Blue” laccases. *Biochem Mosc* 2007;72:1136–50. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>.
- [66] Halaburgi VM, Sharma S, Sinha M, Singh TP, Karegoudar TB. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochem* 2011;46:1146–52. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.002>.

- [67] Lin Y, Zhang Z, Tian Y, Zhao W, Zhu B, Xu Z, et al. Purification and characterization of a novel laccase from *Coprinus cinereus* and decolorization of different chemically dyes. *Mol Biol Rep* 2013;40:1487–94. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2191-x>.
- [68] Arca-Ramos A, Eibes G, Feijoo G, Lema JM, Moreira MT. Enzymatic reactors for the removal of recalcitrant compounds in wastewater. *Biocatal Biotransformation* 2018;36:195–215. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1315411>.
- [69] Ammann EM, Gasser CA, Hommes G, Corvini PF-X. Immobilization of defined laccase combinations for enhanced oxidation of phenolic contaminants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:1397–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5055-y>.
- [70] George J, Rajendran DS, Venkataraman S, Rathankumar AK, Saikia K, Muthusamy S, et al. Insolubilization of *Trametes versicolor* laccase as cross-linked enzyme aggregates for the remediation of trace organic contaminants from municipal wastewater. *Environ Res* 2022;209:112882. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112882>.
- [71] Chappell HA, Milliken A, Farmer C, Hampton A, Wendland N, Coward L, et al. Efficient remediation of 17 α -ethinylestradiol by *Lentinula edodes* (shiitake) laccase. *Biocatal Agric Biotechnol* 2017;10:64–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.004>.
- [72] Lonappan L, Rouissi T, Laadila MA, Brar SK, Hernandez Galan L, Verma M, et al. Agro-industrial-Produced Laccase for Degradation of Diclofenac and Identification of Transformation Products. *ACS Sustain Chem Eng* 2017;5:5772–81. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00390>.
- [73] Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb Technol* 2006;39:141–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.027>.
- [74] Zapata-Castillo P, Villalonga-Santana L, Islas-Flores I, Rivera-Muñoz G, Ancona-Escalante W, Solís-Pereira S. Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Lett Appl Microbiol* 2015;61:252–8. <https://doi.org/10.1111/lam.12451>.
- [75] Nguyen LN, Hai FI, Price WE, Kang J, Leusch FDL, Roddick F, et al. Degradation of a broad spectrum of trace organic contaminants by an enzymatic membrane reactor: Complementary role of membrane retention and enzymatic degradation. *Int Biodeterior Biodegrad* 2015;99:115–22. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.004>.

- [76] Smajdor J, Piech R, Pięk M, Paczosa-Bator B. Sensitive Voltammetric Determination of Ethinyl Estradiol on Carbon Black Modified Electrode. *J Electrochem Soc* 2017;164:H885–9. <https://doi.org/10.1149/2.0851713jes>.
- [77] Li C. Voltammetric determination of ethinylestradiol at a carbon paste electrode in the presence of cetyl pyridine bromine. *Bioelectrochemistry* 2007;70:263–8. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.10.001>.
- [78] Perez C, Simões FR, Codognoto L. Voltammetric determination of 17 α -ethinylestradiol hormone in supply dam using BDD electrode. *J Solid State Electrochem* 2016;20:2471–8. <https://doi.org/10.1007/s10008-015-3091-5>.
- [79] Santos AM, Wong A, Prado TM, Fava EL, Fatibello-Filho O, Sotomayor MDPT, et al. Voltammetric determination of ethinylestradiol using screen-printed electrode modified with functionalized graphene, graphene quantum dots and magnetic nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers. *Talanta* 2021;224:121804. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121804>.
- [80] Chethana BK, Basavanna S, Arthoba Naik Y. Voltammetric Determination of Diclofenac Sodium Using Tyrosine-Modified Carbon Paste Electrode. *Ind Eng Chem Res* 2012;51:10287–95. <https://doi.org/10.1021/ie202921e>.
- [81] Mofidi Z, Norouzi P, Seidi S, Ganjali MR. Determination of diclofenac using electromembrane extraction coupled with stripping FFT continuous cyclic voltammetry. *Anal Chim Acta* 2017;972:38–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.011>.
- [82] Yang J, Li W, Ng TB, Deng X, Lin J, Ye X. Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Front Microbiol* 2017;8:832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>.
- [83] Moiseenko KV, Vasina DV, Farukshina KT, Savinova OS, Glazunova OA, Fedorova TV, et al. Orchestration of the expression of the laccase multigene family in white-rot basidiomycete *Trametes hirsuta* 072: Evidences of transcription level subfunctionalization. *Fungal Biol* 2018;122:353–62. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.006>.
- [84] Savinova OS, Zorov IN, Vasina DV, Sinitsyn AP, Fedorova TV. The Minor Recombinant Laccase Isozymes of *Trametes hirsuta* 072: Preparation and Properties. *Mosc Univ Chem Bull* 2019;74:173–9. <https://doi.org/10.3103/S0027131419040072>.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Durant les trois ans passés sur ce projet, afin de mener à bien cette thématique de recherche la principale conclusion que j'en tire est d'accepter son aspect multidisciplinaire. Généralement, un laboratoire de biochimie/enzymologie aura une forte expertise dans la purification des isoenzymes mais la caractérisation ne s'appliquera globalement pas à une thématique appliquée et les substrats utilisés ne seront que rarement des composés pharmaceutiques, qui demandent des compétences et des coûts plus importants que les colorants, qu'un laboratoire d'ingénierie ou de chimie, qui auront les qualités inverses. Cette étude a pris en considération l'aspect multidisciplinaire de cette thématique la rendant la plus exhaustive possible, et proposant une méthodologie complète comprenant une étape de purification, d'identification et de caractérisation spécifique à l'application voulue des isoenzymes d'une souche de WRF pertinente en utilisant des composés d'intérêt environnemental comme substrats.

L'objectif de cette étude est de purifier et de caractériser les isoenzymes de la laccase issus de la souche *T. hirsuta IBB450* pour la bioremédiation d'un effluent de STEP. Les résultats obtenus ont confirmé la potentielle application des laccases grâce à : i) une tolérance et une stabilité suffisantes pour être utilisées dans un effluent de STEP, ii) la transformation complète de plusieurs composés pharmaceutiques, même à faible température.

L'originalité du projet s'articule en plusieurs points. 1) La purification accomplie des isoenzymes de l'extrait brut. En effet, cette purification nécessite des compétences et du matériel spécifique. On peut citer notamment les différentes méthodes électrophorétiques sur gel utilisées, mais surtout l'utilisation de différentes FPLC. Cela explique en partie le nombre important de publications ayant utilisées l'extrait brut comme source oxydante, ou la laccase commerciale. 2) L'identification des isoenzymes précédemment purifiées. Bien que la méthode de l'empreinte peptidique soit une méthode plus simple et moins onéreuse que le séquençage complet d'une protéine, elle nécessite du matériel et des compétences spécifiques. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'identification ne soit pas systématique. Finalement, l'identification des isoenzymes reste recommandée, *a minima* par des études d'empreinte peptidique afin de faire progresser plus efficacement les études de caractérisation en évitant que d'autres laboratoires caractérisent la même isoenzyme par exemple. 3) Une caractérisation spécifique pour une application à

la bioremédiation d'un effluent de STEP des isoenzymes. 3.1) Les tests de tolérance effectués dans ce projet. À travers la littérature, la stabilité d'une isoenzyme est un paramètre couramment déterminé. Cela permet d'estimer sa capacité à conserver sa fonctionnalité dans le temps. Toutefois, d'après nos recherches, le concept de tolérance n'a pas été abordé. Le but est d'évaluer la capacité d'une laccase à maintenir son activité après avoir été exposée à différents inhibiteurs ou interférents. Ces deux tests sont complémentaires car, pour une matrice définie, une isoenzyme peut être stable mais fortement interférée, ou inversement. Ces tests sont particulièrement importants dans le cas de la bioremédiation d'un effluent de STEP car même si la bonne stabilité a déjà été vérifiée, à notre connaissance, aucune n'a pris en compte le potentiel effet désactivant de cette dernière. 3.2) Le choix des dénaturants pour les tests de stabilité. Dans la littérature, ce choix semble fait de façon historique, et par soucis de cohérence avec les autres publications mais sans être spécifique à une application, tel que le mercure, le DMSO ou l'azoture de sodium. Cette étude propose un choix de plusieurs dénaturants en lien avec l'application voulue comme la trypsine, l'urée ou en encore un effluent de STEP. 3.3) Le choix des paramètres permettant l'évaluation et la comparaison des performances catalytiques des isoenzymes. En effet, de nombreuses études évaluent ceci à travers la vitesse de transformation d'un composé en fonction du temps. Bien que non-optimal, la difficulté réside souvent sur la bonne normalisation des quantités de laccase utilisées, qui est souvent déterminé par rapport à l'activité relative à l'oxydation de l'ABTS à pH 4. L'une des solutions est de mesurer les constantes enzymatiques. Malheureusement, ces études sont généralement longues et fastidieuses, expliquant ainsi sa rareté à travers la littérature. L'utilisation d'une méthode LDTD-QqQ a permis d'effectuer ces études aisément et rapidement. D'autre part, si la détermination de la constante K_M reste rare, elle est beaucoup plus répandue que la constante k_{cat} ou K . Ceci s'explique par la nécessité de connaître la concentration enzymatique molaire. Bien que quelques techniques soient plus accessibles telles que la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay), elle ne reste pas spécifique à la laccase. Dans cette étude, il a été possible d'estimer la concentration molaire enzymatique de façon spécifique grâce au logiciel GelAnalyzer. De façon plus générale, cette étude illustre explicitement que la seule détermination de la constante K_M ne peut donner lieu à quelque conclusion hâtive. La détermination de la constante catalytique k_{cat} en plus de la constante K_M sont les deux éléments *sine qua non* pour conclure sur la relative performance catalytique d'une enzyme. 4) Bien que des effets de synergies aient été observés dans cette étude et dans d'autres, elles restent quasiment inexistantes. En effet, à notre connaissance, cette étude est la première à avoir effectué ce test avec des composés pharmaceutiques, et ces résultats positifs nous interrogent sur la bonne stratégie à adopter concernant le choix des isoenzymes. Il est possible que

l'identification de l'isoenzyme la plus pertinente pour une application donnée pourrait *in fine* ne pas être la solution optimale. Toutefois il reste difficile d'évaluer la portée potentielle de ces résultats préliminaires. 5) Les tests concernant l'influence de la température sur la cinétique d'élimination du substrat n'ont jamais été réalisées, à notre connaissance. Cette étude indique des résultats intéressants, avec de faibles différences sur la vitesse de transformation du DCL à 22 ou 4 °C, qui pourraient s'expliquer par un mécanisme de transformation qui pourrait être différent de celui de l'EE2. Le potentiel de la laccase à pouvoir être utilisé même dans les pays à climat froid est réel. 6) Cette étude propose une nouvelle stratégie de caractérisation et de comparaison des isoenzymes à travers la littérature, développé dans le prochain paragraphe.

Jusqu'à ce jour, la stratégie globale se basait sur le partage des résultats obtenus après avoir réalisés différents tests sur les isoenzymes d'intérêts. Ainsi chacun présentait une nouvelle laccase dotée de propriétés intéressantes, en utilisant différents titres comme « une nouvelle laccase thermorésistante... » ou « une nouvelle laccase pH et métal stable... ». Or, les résultats s'accumulent et aucune avancée semblent se dessiner. Cela peut s'expliquer par plusieurs points : 1) La trop grande fluctuation des résultats, due à l'impossibilité de reproduire exactement les mêmes expériences (activité enzymatique, qualité de la purification, s'expliquant par l'absence de référence ou de moyens de normalisation ne permet qu'une caractérisation qualitative rendant difficile la comparaison avec d'autres études, 2) La découverte de nouvelles laccases rendent la caractérisation exhaustive de toutes pratiquement impossible, 3) La difficulté d'identifier les isoenzymes de l'extrait brut, rend le partage des connaissances faiblement optimal.

Afin de proposer une solution aux trois points, nous suggérons la classification des isoenzymes dans l'un des huit groupes proposés par Savinosa et al (2018). L'identification sera faite, non pas de l'isoenzyme la plus pertinente, mais du groupe le plus adéquat pour une application donnée. En lien avec la numérotation du paragraphe précédent : 1') La laccase constitutive, issue du groupe A, de l'extrait pourrait servir de référence, ainsi il serait possible de normaliser afin d'obtenir des résultats semi-quantitatifs, répondant à la question : la laccase inductible de la souche (groupe X) est-elle plus ou moins intéressante que la laccase constitutive (groupe) pour telle application ? 2') la découverte de nouvelles laccases ne serait plus un problème car les isoenzymes d'un même groupe partagent des propriétés physico-chimiques semblables. Il suffirait de caractériser huit isoenzymes, tous représentatives de leurs groupes afin d'obtenir une relative exhaustivité du potentiel des laccases, 3') Identifier une isoenzyme ne

sera plus nécessaire car il suffirait de la définir parmi un des groupes à l'aide de tests simple à réaliser développés dans cette étude.

Afin de réaliser cette nouvelle stratégie, il est nécessaire de développer différents outils permettant de faciliter la classification des isoenzymes, comme proposé dans cette étude. Ces outils sont basés sur des expériences simples et à la portée d'un plus grand nombres de laboratoires : i) la détermination du point isoélectrique calculé ou non, ii) le poids moléculaire obtenu par SDS-PAGE, iii) le K_M par rapport à l'ABTS pouvant être déterminé avec un spectrophotomètre UV-vis, iv) le temps de demi-vie à 60 °C. L'étude indique que le temps de demi-vie à pH faible pourrait être un facteur discriminant. *In fine*, en supposant cette nouvelle stratégie viable, cette étude est la première à apporter des résultats sur la bioremédiation d'un effluent de STEP par une laccase du groupe A et du groupe B.

À l'avenir, la caractérisation des laccases issues des autres groupes (C-H) devrait être effectuée afin de déterminer le plus pertinent pour la bioremédiation d'une eau usée. Cette caractérisation devrait être effectuée, si possible, en prenant en considération les points clefs apportés dans le paragraphe précédent. La contribution potentielle d'un mélange d'isoenzymes sur le réel intérêt à la transformation de composés pharmaceutique dans le cadre de la bioremédiation d'un effluent de STEP est encore trop peu développée. C'est pourquoi, davantage d'études doivent être apportées sur ce point afin de le clarifier. Pour les études à venir, il sera important de prendre en considération l'impact de la matrice sur la bonne transformation des composés pharmaceutiques, à des concentrations réelles, pour réduire le biais pouvant découler des diverses interactions possibles entre la matrice, les composés pharmaceutiques et la laccase.

ANNEXE

Annexe S-1. Intérêt de la LDTD

L'utilisation d'un MS-QqQ est adaptée pour les analyses de composés connus et il possède une étendue significative des masses à analyser (m/z 4000). De plus sa bonne sensibilité, sa capacité à discriminer un composé d'intérêt d'une matrice complexe, sa robustesse et son faible coût rend l'utilisation de cette technologie pour ce type d'application populaire. La source d'ionisation (APCI) procure une ionisation douce grâce à un plasma crée par l'effet couronne et est compatible avec le MS-QqQ. Par rapport à la source d'ionisation par électronébuliseur, la source APCI est moins impactée par les effets de matrices comme la suppression de signal. Cette technologie permet d'analyser des composés peu ou moyennement polaire, volatiles et thermostable. Couplée au système d'introduction LDTD, l'interface LDTD-APCI permet d'analyser rapidement des composés (entre < 10 s par échantillon) sans séparation chromatographique. Brièvement, le système d'introduction LDTD est composé en deux parties : un échantillonneur et une source de désorption. L'échantillonneur est une plaque contenant 96 puits en acier inoxydable servant à recueillir l'échantillon à analyser (entre 2 et 10 μ L en général). L'échantillon, solubilisé dans un solvant, est placé dans un four (~ 60 °C) afin d'évaporer le solvant et d'obtenir le composé cristallisé au fond du puit, sur la plaque en acier inoxydable ayant la capacité de retenir l'échantillon est d'avoir une diffusion rapide de la chaleur. La source de désorption est l'utilisation d'un laser qui va irradier l'autre côté du puit pendant quelques secondes. L'énergie emmagasinée par l'acier inoxydable est transmise sous forme d'une énergie thermique aux composés d'intérêt sous forme de cristaux. Sous la chaleur, les composés se désorbent sous une température inférieure à celle du point de fusion, permettant ainsi l'analyse de composés thermosensibles, se rendant ainsi à la source d'ionisation APCI. Optimiser la puissance du laser permettrait de purifier l'extrait en désorbant qu'une partie des analytes, notamment les composés avec une volatilité plus faible (informations issues de la maîtrise de Michel Boisvert, 2012).

Les composés désorbés sont ensuite transportés vers la source d'ionisation APCI ou ils seront ionisés avant de transiter vers l'analyseur de masse. Contrairement à la source ESI, il a été observé que la source APCI est moins impactée par les effets de matrice. Cela pourrait s'expliquer par une évaporation du solvant plus faible par l'augmentation de la viscosité et de la tension de surface des gouttelettes produites en ESI. La vaporisation serait donc moins efficace. On peut également ajouter la non-utilisation de solvant organique permet d'obtenir un bruit de fond généralement bas. Parallèlement, l'utilisation d'un analyseur

de masse de type QqQ permet de discriminer un composé d'intérêt d'une matrice complexe, et donc de compenser la non-utilisation d'une séparation chromatographique des analytes. Ceci est possible notamment en travaillant avec le mode surveillance de réaction multiple. *In fine*, la capacité de la source APCI à être moins impactée par les effets de matrice et la technologie triple quadripôle à pouvoir discriminer un composé d'intérêt d'une matrice complexe rendent la technologie LDTD viable. Cela a pour avantage de réduire la préparation de l'échantillon et d'augmenter significativement le temps d'analyse des échantillons. De plus, la non-utilisation de colonne chromatographique a plusieurs avantages techniques comme : la non-utilisation de solvants organiques, l'absence de « carry-over », ou encore l'absence d'entretien et donc la possibilité d'analyser des composés potentiellement nuisibles pour les colonnes chromatographiques comme des protéines. Au contraire, la présence de protéine comme la BSA pourrait augmenter le signal des composés pharmaceutiques. Enfin, la potentielle absence de désorption de composés adsorbés à la plaque par le laser peut être résolu par différentes techniques d'enrobage de surface des plaques (coating), dont l'utilisation de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) qui sera utilisé dans cette étude. Le coating peut également être effectué avec des protéines comme la BSA, augmentant la sensibilité de certains composés pharmaceutiques.

Annexe S-2. Detailed protocol of proteomics experiments:

In-gel separation and tryptic digestion

500 ng of purified proteins were separated on SDS-PAGE gel 4–12% bis-Tris 1.5 mm × 10 well (Invitrogen). After migration, the gel was stained with Coomassie Blue (SimplyBlue SafeStain) for 1 h under agitation and then discoloured overnight under agitation. Each slice of gel containing a unique protein band was excized and cut into cubes (1×1 mm) and transferred in microcentrifuge tube. Then, they were washed with MS grade water for 15 min under agitation then with 50% acetonitrile for 15 min under agitation until gel slice shrunk and became opaque. The gel slices were then subjected to a wash cycle (20 mM ammonium bicarbonate for 15 min under agitation and 20 mM ammonium bicarbonate/100% acetonitrile (1:1, v/v) for 15 min under agitation) until the gel became clear. The samples were then dehydrated by washing with 100% acetonitrile for 5 min under agitation until the precipitate became white and solid. Acetonitrile was removed and dehydrated samples were rehydrated in 20 mM ammonium bicarbonate containing 10 mM DTT, heated at 56 °C for 1 h and treated with 20 mM ammonium bicarbonate containing 50 mM chloroacetamide (Sigma-Aldrich) for 30 min at 25 °C, away from light. The gel slices were then washed with 20 mM ammonium bicarbonate for 15 min under

agitation and 20 mM ammonium bicarbonate/100% acetonitrile (1:1, v/v) for 15 min under agitation. The samples were then dehydrated again by washing with 100% acetonitrile for 5 min under agitation. Acetonitrile was removed and dehydrated samples were digested in 20 mM ammonium bicarbonate containing 12.5 ng/ml of Trypsin MS Grade (Thermo Fisher) at 37 °C overnight under agitation.

Peptides extraction

After the tryptic digestion, the supernatant was collected in a new microcentrifuge tube. Digested samples were next incubated with 100% acetonitrile (volume equal to the digestion volume in the previous step) for 30 min at 37 °C under agitation. The supernatant was collected and digested samples underwent two incubations in 1% formic acid for 20 min at 37 °C under agitation for extracting peptides from gel. The supernatant from this step was mixed with the first supernatant. The samples were then dehydrated by washing with 100% acetonitrile for 10 min at 37 °C under agitation until the precipitate became white and solid. The supernatant from this step was transferred to the same microcentrifuge tube containing supernatants from the earlier steps. The supernatants containing peptides were then concentrated by centrifugal evaporator at 60 °C until complete drying (*circa* 3 h).

Peptides desalting

Peptides were resuspended in 30 µl of 0.1% trifluoroacetic acid. C18 column Zip-Tip (Thermo Scientific) was previously washed with 100% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid, and peptides were loaded into the column by doing 10 up and down, washed with 0.1% trifluoroacetic acid and eluted with 30 µl of 50% acetonitrile/1% formic acid by doing up and down in a new microcentrifuge tube. Desalted peptides were then dried by centrifugal evaporator at 60 °C until complete drying and resuspended in 1% formic acid. Peptides were assayed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and read at an absorbance of 205 nm. The peptides were then transferred to a glass vial and stored at -20 °C until analysis by mass spectrometry.

LC-MS/MS Analysis

For LC-MS/MS, 250 ng of each sample were injected into an HPLC (nanoElute, Bruker Daltonics) and loaded onto a trap column with a constant flow of 4 µL min⁻¹ (Acclaim PepMap100 C18 column, 0.3 mm id x 5 mm, Dionex Corporation) then eluted onto an analytical C18 Column (1.9 µm beads size, 75 µm x 25 cm, PepSep). Peptides were eluted over a 2-hour gradient of ACN (5-37%) in 0.1% FA at 500 nL/min while being injected into a TimsTOF Pro ion mobility mass spectrometer equipped with a Captive Spray nano electrospray source (Bruker Daltonics). Data was acquired using data-dependent auto-MS/MS with a 100-1700 m/z mass range, with PASEF enabled with a number of PASEF scans set at 10 (1.27 seconds

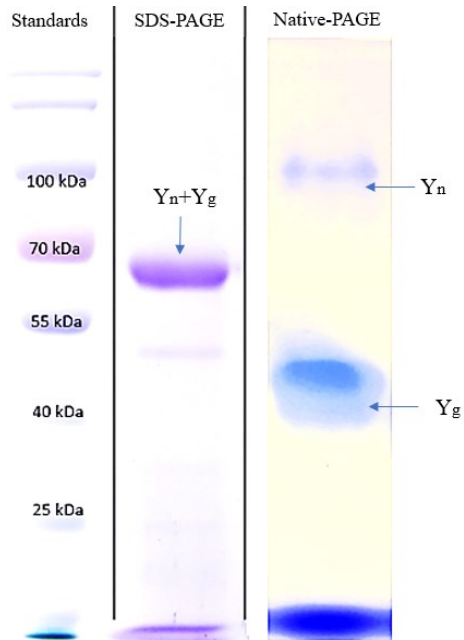
duty cycle) and a dynamic exclusion of 0.4 min, m/z dependent isolation window and collision energy of 42.0 eV. The target intensity was set to 20,000, with an intensity threshold of 2,500.

Protein Identification by MaxQuant Analysis

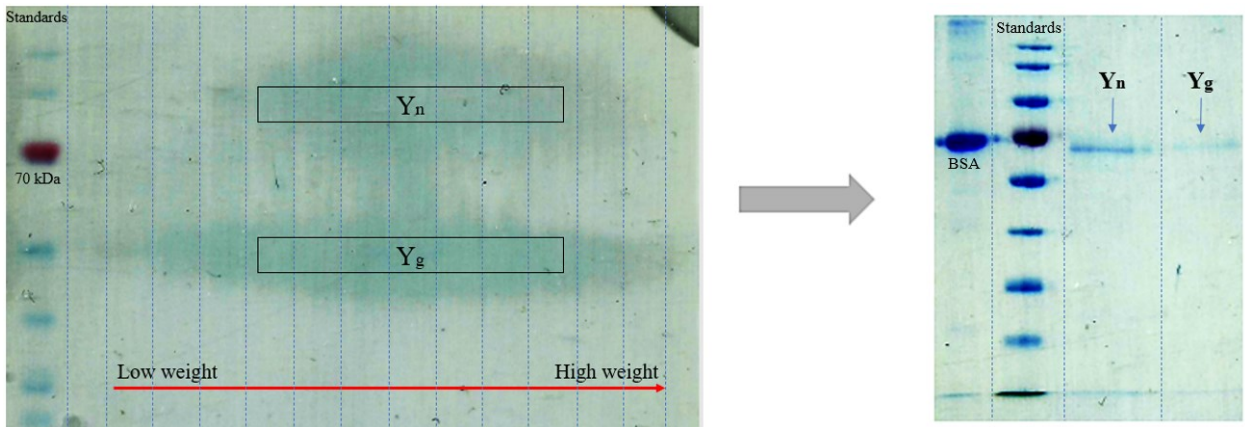
The raw files were analyzed using the MaxQuant version 1.6.17.0 software (Cox J, Mann M. Nat Biotechnol. 2008;26:1367–72.) and the Uniprot *Trametes hirsuta* (White-rot fungus) (*Coriolus hirsutus*) [5327] database (10/04/2018, 63 entries). The settings used for the MaxQuant analysis (with TIMS-DDA type in group-specific parameters) were: 2 miscleavages were allowed; fixed modification was carbamidomethylation on cysteine; enzymes were Trypsin (K/R not before P); variable modifications included in the analysis were methionine oxidation, protein N-terminal acetylation and protein carbamylation (K, N-terminal). Only for chymotrypsin, cleave L, F, W, Y, not before P, number of miscleavage set to 4. A mass tolerance of 10 ppm was used for precursor ions and a tolerance of 20 ppm was used for fragment ions. Identification values "PSM FDR", "Protein FDR" and "Site decoy fraction" were set to 0.05. Minimum peptide count was set to 1. Label-Free-Quantification (LFQ) was also selected with a LFQ minimal ratio count of 2. Both the "Second peptides" and "Match between runs" options were also allowed. Following the analysis, the results were sorted according to several parameters. Proteins positive for at least either one of the "Reverse", "Only identified by site" or "Potential contaminant" categories were eliminated, as well as proteins identified from a single peptide.

Table S-1. Transition of diclofenac and ethynyl estradiol with collision energy and cone voltage

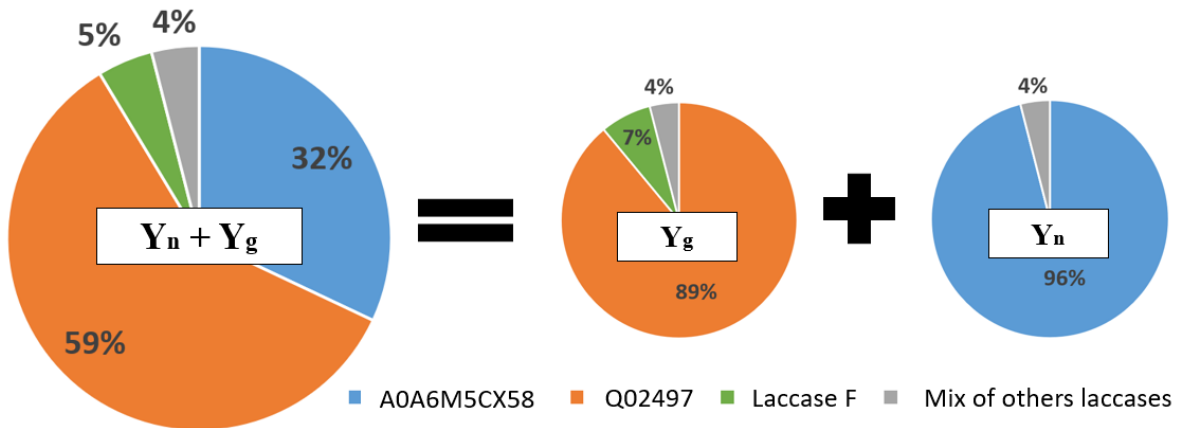
		Cone (V)	Collision (V)
diclofenac	296.04	30	20
		30	20
diclofenac-d4	299.96	30	20
		30	20
ethynylestradiol	279.1	15	15
		15	15
ethynyestradiol-d4	283.1	15	15
		15	15



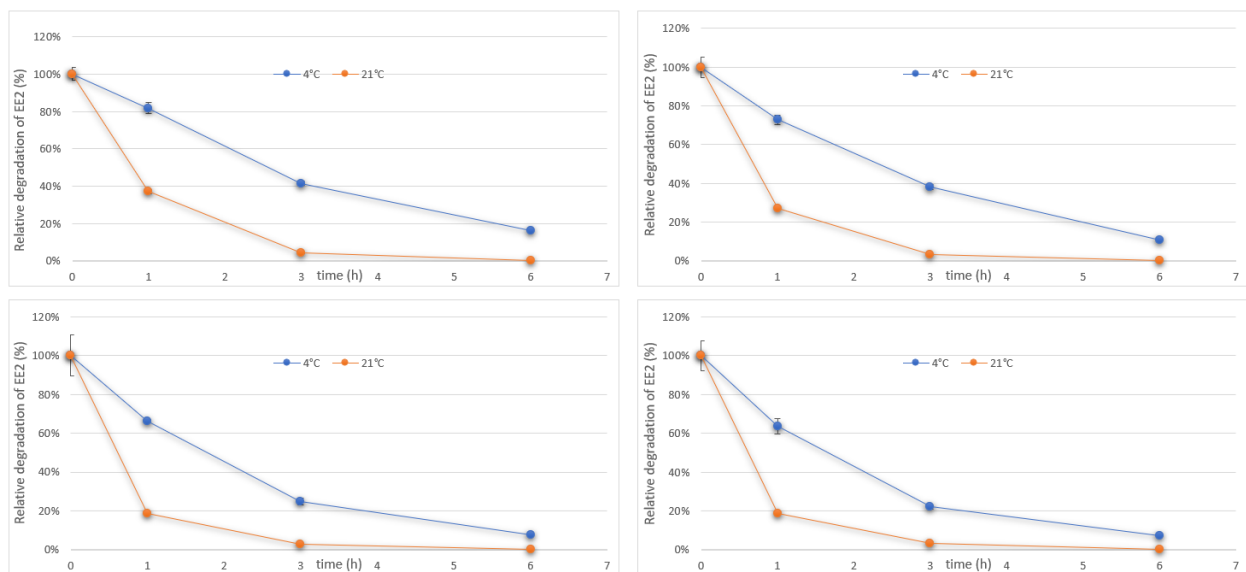
Annexe S-3. Polyacrylamide gel electrophoresis of the concentrated crude extract diluted by a factor of 5. *Left:* Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel. *Right:* Native polyacrylamide gel.



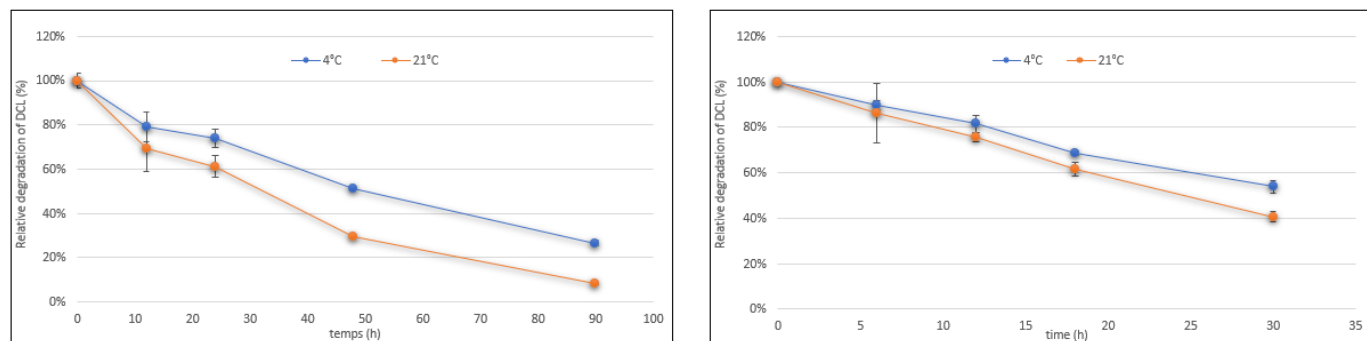
Annexe S-4. Native-PAGE Y_n and Y_g band enzymes extracted and then migrated in an SDS-PAGE gel.



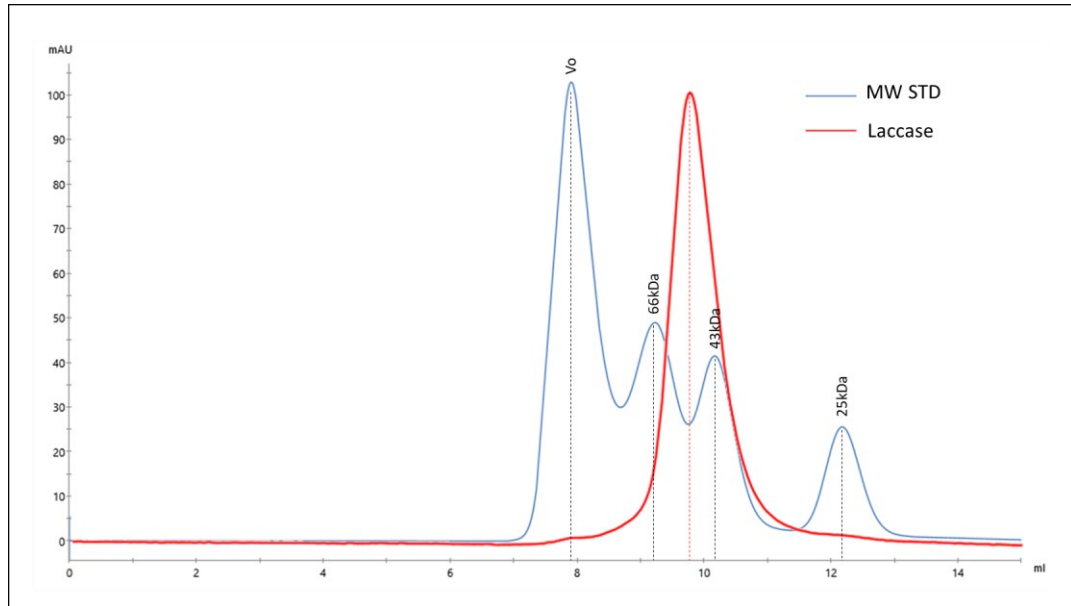
Annexe S-5. Estimated composition of the laccases of the crude extract corresponding to the average of the two taking into account the mass ratio. The composition of the two laccases purified were the two circles in the right.



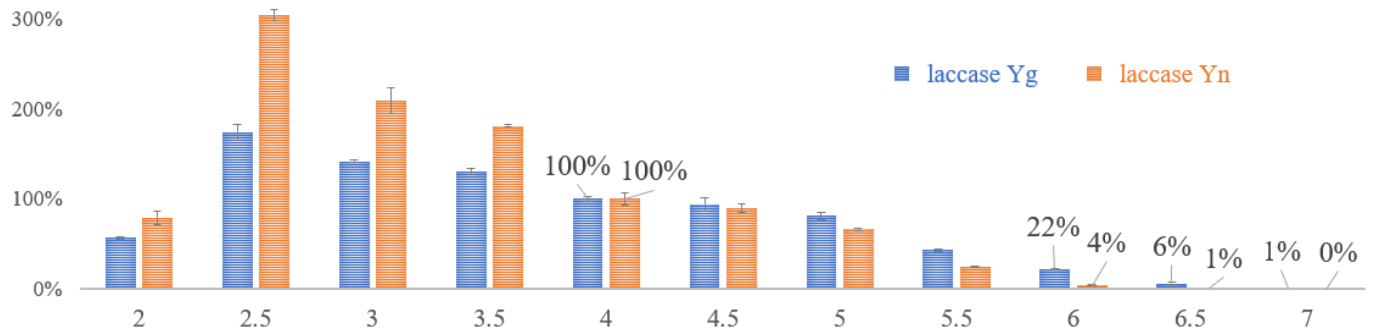
Annexe S-6. Degradation of EE₂ as a function of time at different concentrations (100, 200, 400, 600 ppb, at the bottom right, at the bottom left, top right and top left respectively), at pH 7 and around 100 U L⁻¹.



Annexe S-7. Degradation of DCL as a function of time at 4000 ppb, at pH 7 and around 1000 U L⁻¹. Experiment carried out twice, at two different times.



Annexe S-8. SEC analysis of the two oxidizing enzymes. The results indicate a V_e equivalent to a molecular weight of approximately 51 kDa.



Annexe S-9. Relative activity (normalized at pH 4) as function as pH of laccase Y_g and Y_n

Annexe S-10. More explanation on the choice of key parameters for tool classification

Starting from the studies of (Savinosa et al.), we have identified 5 key parameters, which can be determined by simple and rapid experiments, in order to obtain a tool allowing this classification. The majority of laccases have a pI lower than five (4-5) or higher than six (6-7). The second is the molecular weight, the majority of laccases have a molecular weight (with glycosylation) of around 64-67 kDa or more than 71-80 kDa. The third is the K_M taking ABTS as a substrate. The K_M of laccases could be divided into two categories: a low K_M below 80 μ M and a high K_M above 200 μ M. The fourth is the half-life time at 60 °C. Part of the laccases seem to be relatively heat resistant, with a time greater than 10 minutes, unlike the other group with a stability of less than a few minutes. Finally, the percentage of

similarity of the peptide sequence of the isoenzyme of interest compared to reference isoenzymes allows us to guide our choices. Other parameters were discarded such as the optimal pH or the number of glycosylation, considered to be not very discriminating in both cases. It is likely that the glycosylation number parameter is strongly correlated with the molecular weights because the mass of the different isoenzymes is very close, between 55 and 57 kDa, and that the different masses observed are due to the greater or lesser percentage of glycosylation.