



Profils Fonctionnels Fongiques : Indicateurs d'Écotoxicité des Métaux dans les Sols

J. D. Lebrun, N. Demont-Caulet, I. Gattin, K. Laval et C. Mougin

Colloque de la SEFA
Mars 2010



La Contamination des Sols, une Préoccupation Croissante...

**90% des contaminants retrouvés
dans les sols** (Crosby, 1982)



**Perturbations des fonctions
assurées par les organismes**



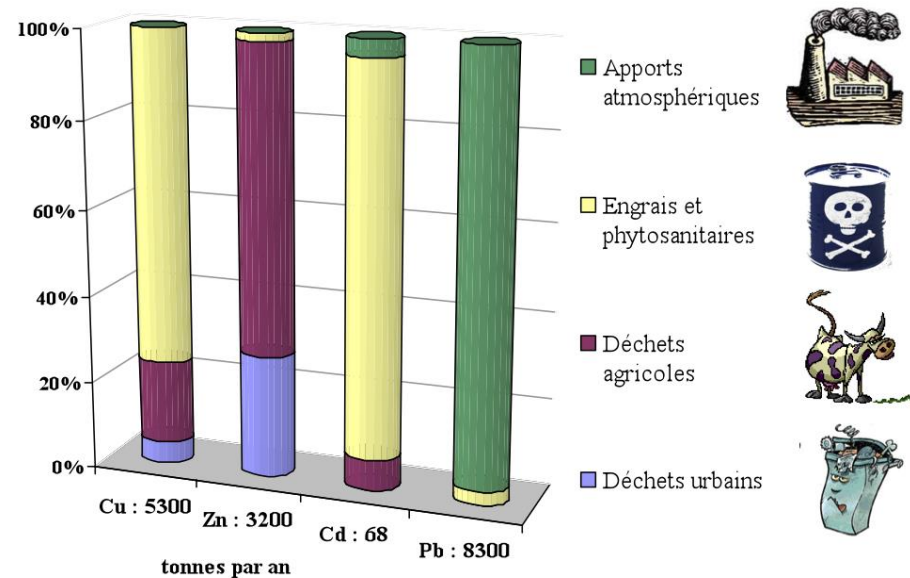
Qualité des sols



**Impacts économiques,
environnementaux
et sanitaires négatifs**

Cas des *Éléments Traces Métalliques*

- Non dégradables
- Adsorption et accumulation en surface où la biocénose est la plus abondante



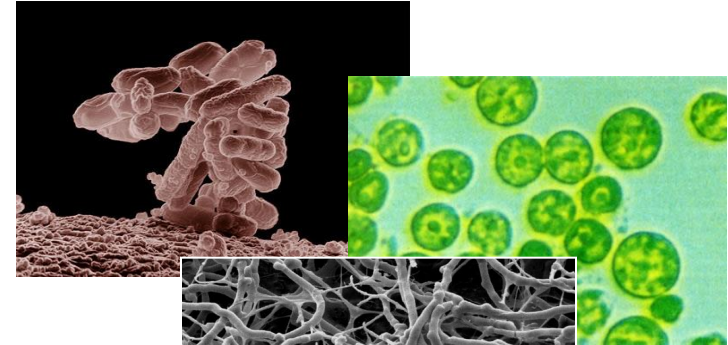
Apports des principaux métaux sur les sols cultivés en France (adapté d'après Ramade, 2007)

→ Peu d'outils pour évaluer leurs impacts sur la qualité biologique des sols

Biocénose et Fonctionnement Biologique des Sols



Milieu

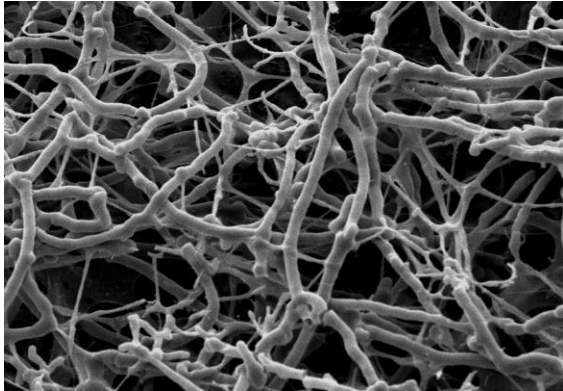


Composante biologique

Microorganismes, acteurs clés des processus environnementaux (Nannipieri et al., 2003)

- Participent à la structure du sol
- Impliqués dans le fonctionnement du sol
 - Cycles biogéochimiques (C, N, P, S...)
 - Dégradation de biopolymères (cellulose, chitine...)
 - Croissance des plantes

Les Champignons et Oxydases



Les champignons

- **Principale biomasse ubiquiste (50-70 %)**
- **Rôle écologique**
 - A la base de chaînes trophiques
 - Adaptations à différentes sources de C et N (*digestion extracellulaire*)
 - Biosynthèse / biocatalyse

→ **Capacité à synthétiser un vaste équipement enzymatique**

Oxydases impliquées dans la dégradation de la lignine (*laccases et peroxydases*)

- **Cultures de champignons en présence de contaminants organiques**
 - Stimulation de l'activité laccase (*pesticides, industriels et domestiques*) (*Mougin et al., 2002*)
 - Action au niveau transcriptionnel (*arylamide vs Trametes versicolor*)

→ **Des modulations fonctionnelles à démontrer dans le cas des métaux**

Objectif et Questions Soulevées

Déterminer si les profils fonctionnels fongiques sont utilisables pour évaluer l'écotoxicité des métaux

Questions soulevées

1

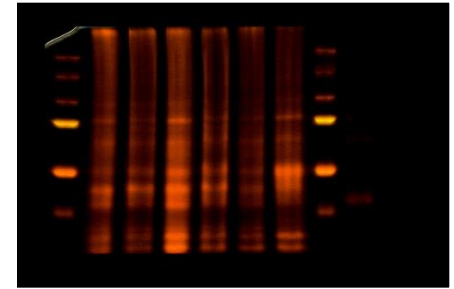
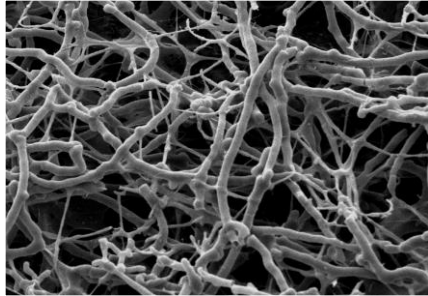
Est-ce qu'une exposition des champignons aux métaux conduit à des modulations d'expression de leur potentiel fonctionnel ?

Action des métaux au niveau enzymatique et protéique ?

2

Est-il possible de relier des réponses fonctionnelles à des formes biodisponibles et actives des métaux ?

Expérimentation au Labo

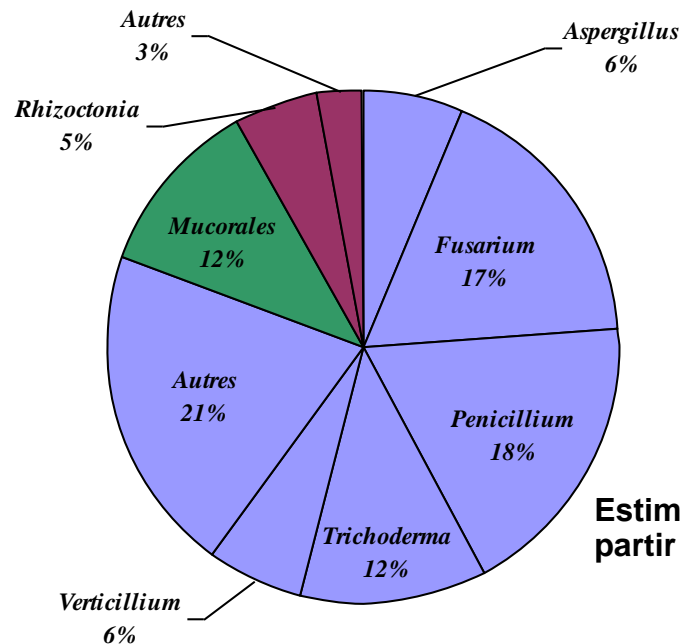


Impact des Métaux sur l'Expression du Potentiel Fonctionnel chez les Champignons

Communauté → Individu

Partie 1

La Communauté Fongique des Sols...



Champignons telluriques

- Ascomycètes
- Basidiomycètes
- Zygomycètes

Estimation de la fréquence d'isolement de souches fongiques à partir de sols (Synthèse d'une dizaine d'études)

Choix : 2 ligninolytiques* et 10 telluriques (collection MIAE ; INRA de Dijon)

BASIDIOMYCETES

Thanatephorus cucumeris
Stereum rugosum

* *Irpex lacteus*

* *Trametes versicolor*

ASCOMYCETES

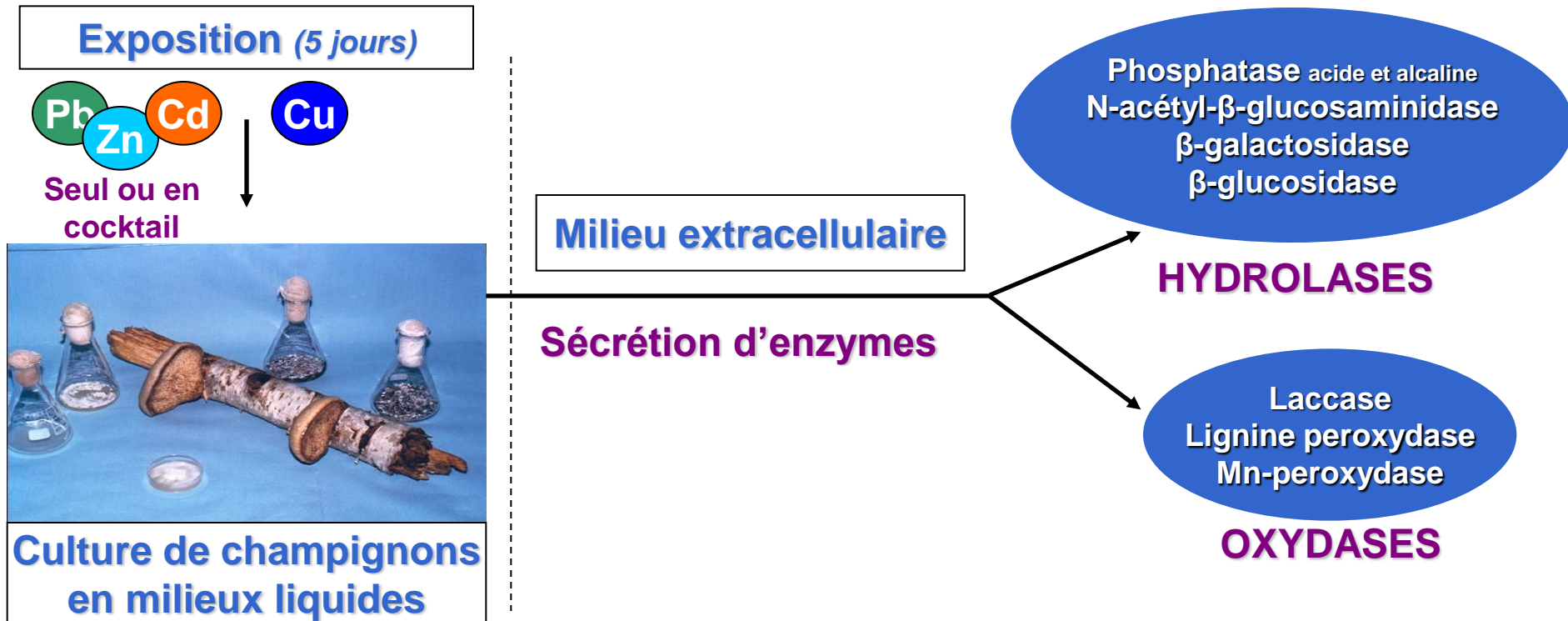
Fusarium solani
Fusarium oxysporum
Penicillium brevicompactum
Trichoderma atroviride
Verticillium albo-atrum

ZYGOMYCETES

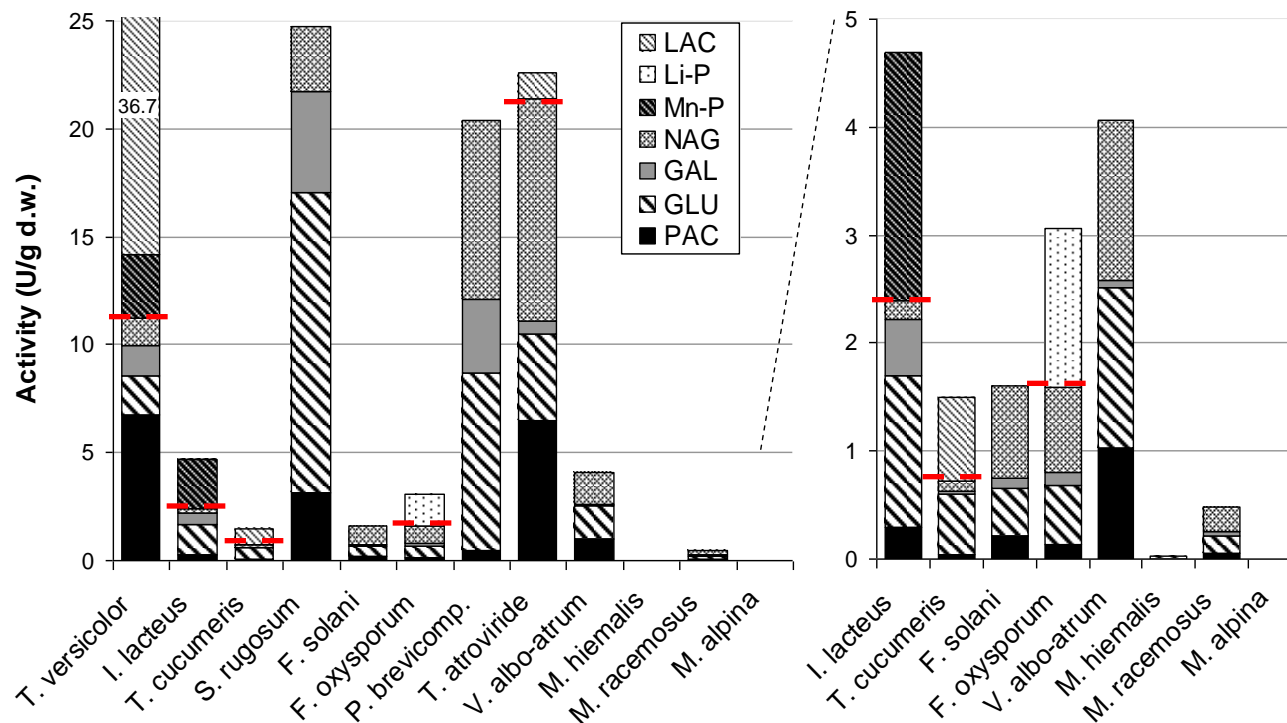
Mucor hemialis
Mucor racemosus
Mortiellera alpina

Démarche Scientifique

Pour s'affranchir de la complexité de la matrice sol...



Evaluation du Potentiel Fonctionnel des Champignons

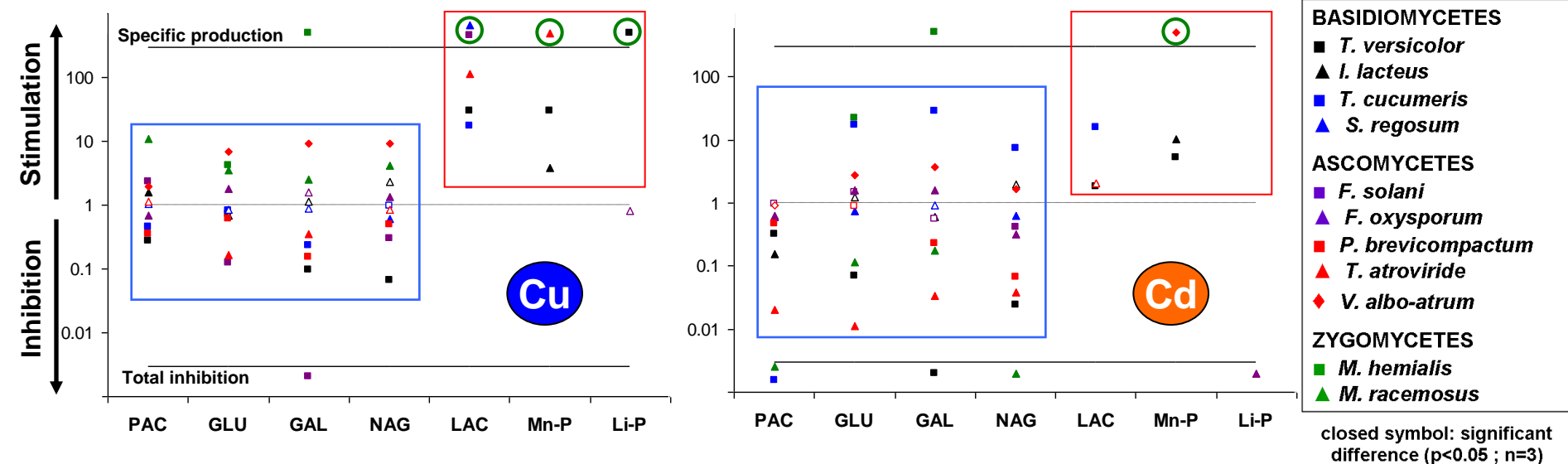


Mesures d'activités enzymatiques extracellulaires

- Tous les champignons sécrètent les hydrolases testées (sauf *M. Alpina*)
- 50% des champignons disposent d'un système oxydatif partiel - -

→ Grande diversité fonctionnelle chez les champignons

Impact des Métaux sur l'Expression du Potentiel Fonctionnel



En présence de Cu ou de Cd (1mM)

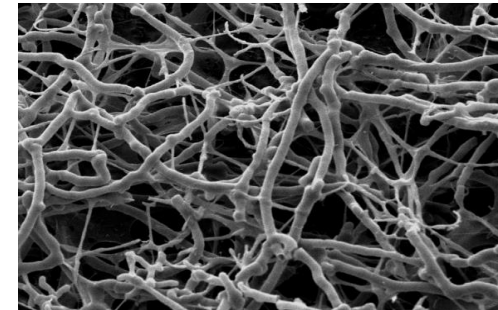
- Variabilité de la réponse des hydrolases □
- Stimulation des activités oxydases quelque soit la souche □
- Chez certaines souches, les oxydases sont spécifiquement produites ○

→ L'exposition des champignons aux métaux module les profils fonctionnels

Trametes versicolor, un modèle d'étude



Communauté fongique



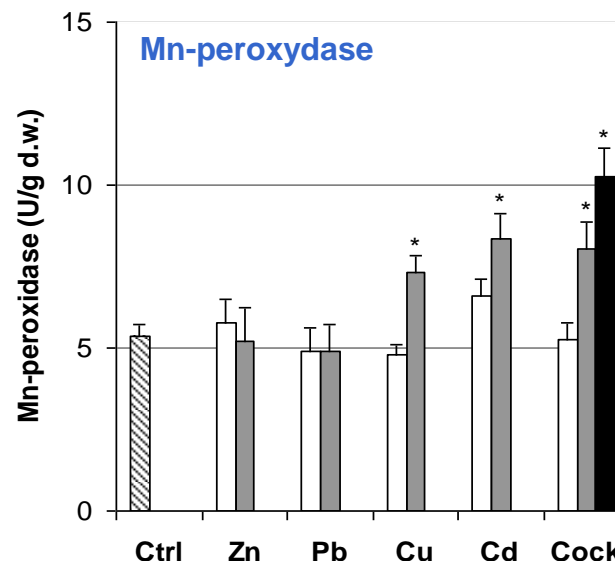
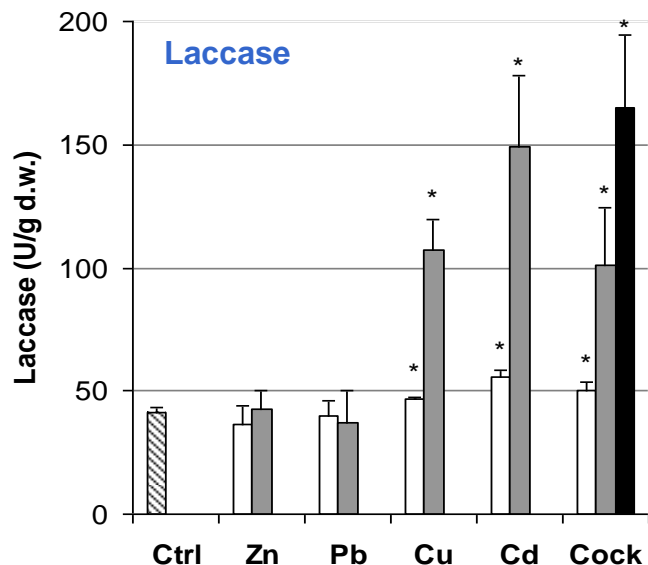
Individu

**Caractérisation des réponses fonctionnelles aux métaux
chez *Trametes versicolor***

→ Plus grand producteur d'enzymes extracellulaires

Réponse des Oxydases aux Métaux

Mesures d'activités extracellulaires après exposition (5 jours)



□ 0.25 mM; ■ 1 mM ; ■ 4 mM

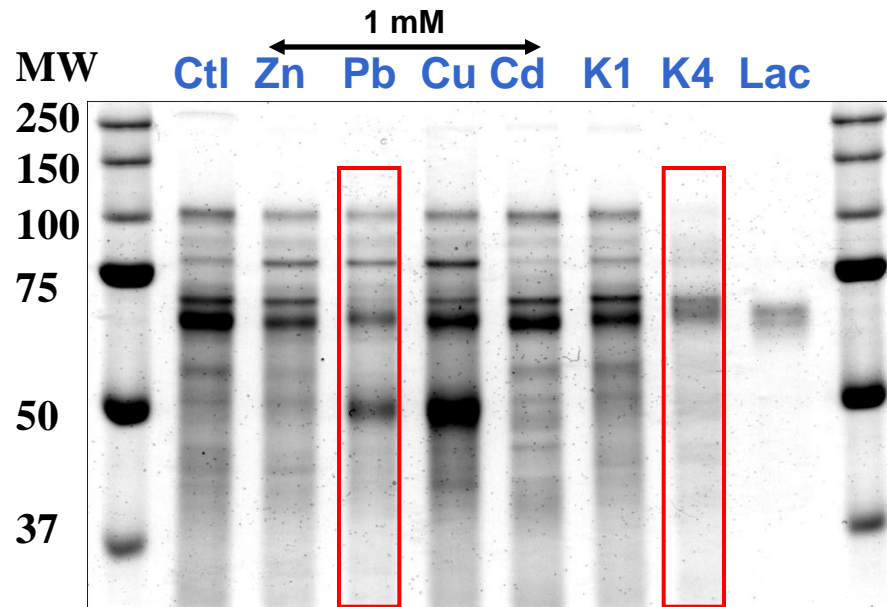
Les activités oxydases

- Sont stimulées uniquement par le Cu, Cd et les cocktails

→ Réponse des oxydases sélective à certains métaux

Action des Métaux au Niveau Protéique ?

Analyse comparative en électrophorèse des sécrétomes



Sécrétomes de *T. versicolor* exposé aux métaux

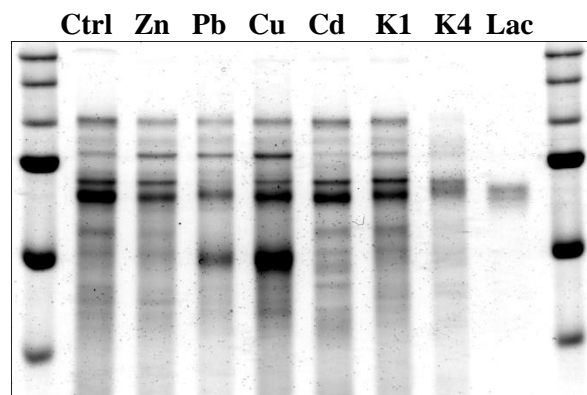
- Cocktail à 1 mM (K1) et à 4 mM (K4)
- Laccases purifiées (Lac) à 60 kDa

Les expositions métalliques

- modifient les profils électrophorétiques
- diminuent la diversité des protéines sécrétées (disparition de bandes)

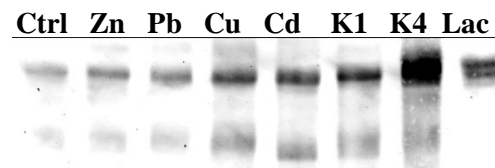
→ La présence de métaux modifie les quantités de protéines exprimées

Caractérisation de la Réponse des Laccases



Analyse comparative des sécrétomes en électrophorèse

Caractérisation
des laccases

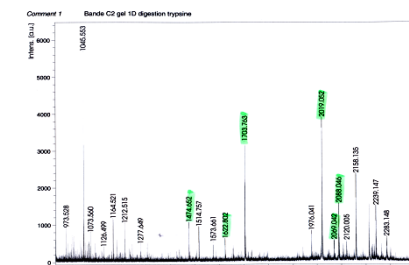


Western Blot anti-laccases

LacA (59 kDa)

LacB (50 kDa)

Identification des
isoenzymes de laccase



Analyse en spectrométrie de masse

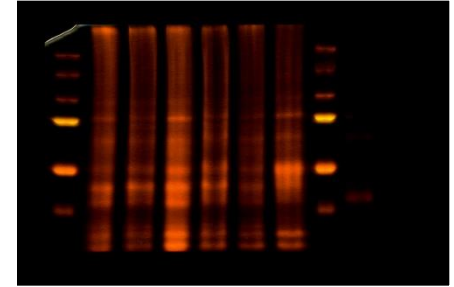
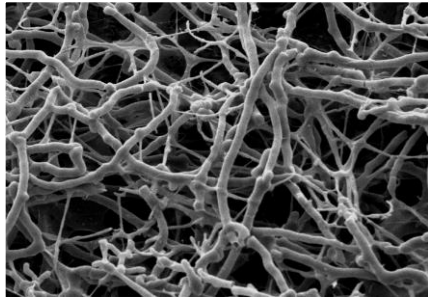
En présence de Cu, Cd et des cocktails

- Surproduction des isoenzymes : LacA (AF414109) et LacB (U44430)
- Corrélée à la stimulation de l'activité ($R^2 > 0.89$)

→ Confirmer chez d'autres champignons que *T. versicolor*

→ Réponse adaptative des champignons aux métaux

Expérimentation au Labo



Influence de la Spéciation des Métaux sur la Réponse des Oxydases Fongiques

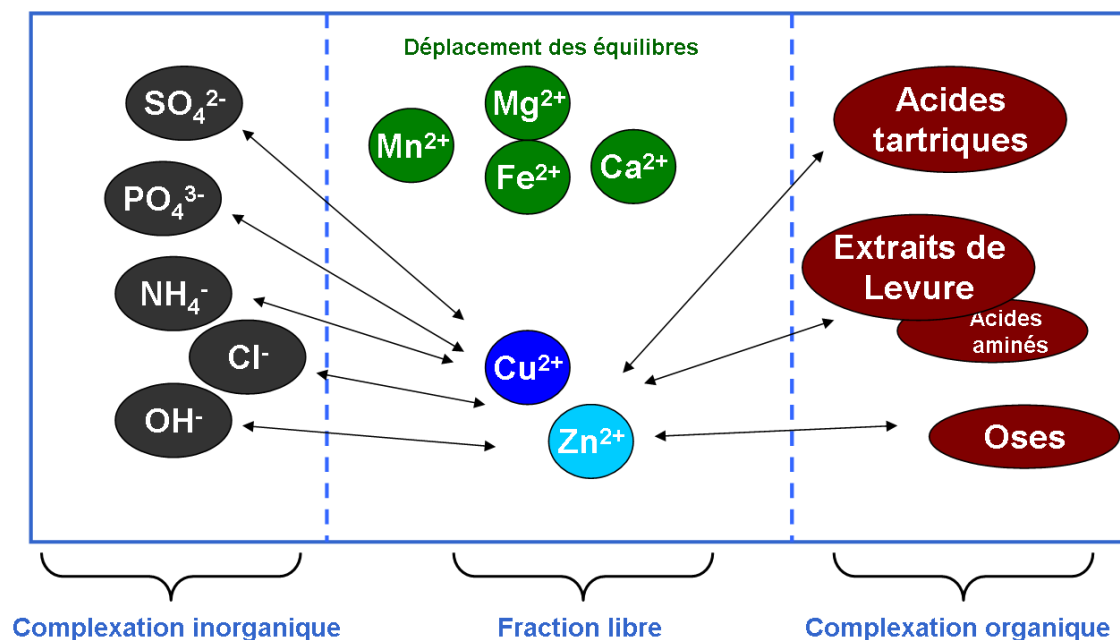
Chez Trametes versicolor

Partie 2

Les Formes Chimiques des Métaux...

Cultures de *T. versicolor* dans des milieux liquides présentant des niveaux de complexation différents vis-à-vis des métaux

→ Variations des quantités de ligands

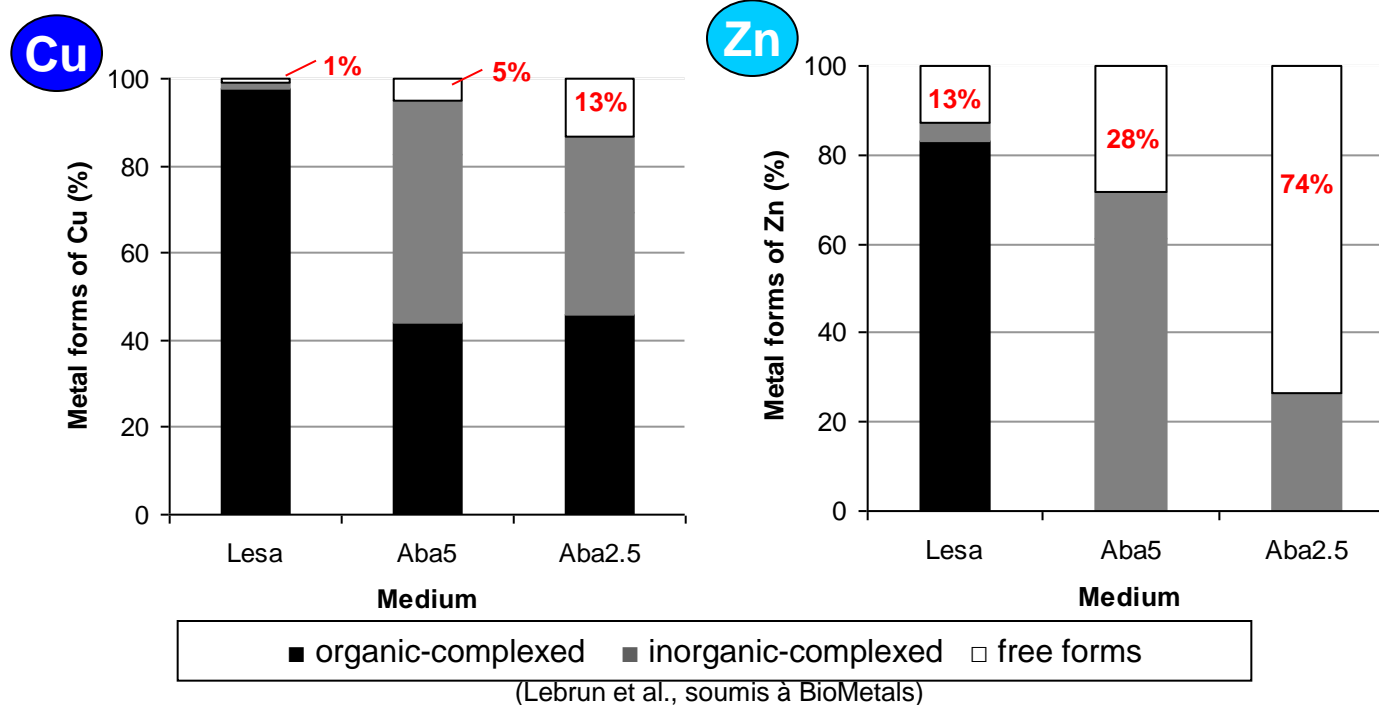


- **Détermination de la spéciation**
 - Théoriquement (Programme Géochimique)
 - Expérimentalement (Électrode Sélective au Cu^{2+})

Spéciation des Métaux dans les Milieux de Culture

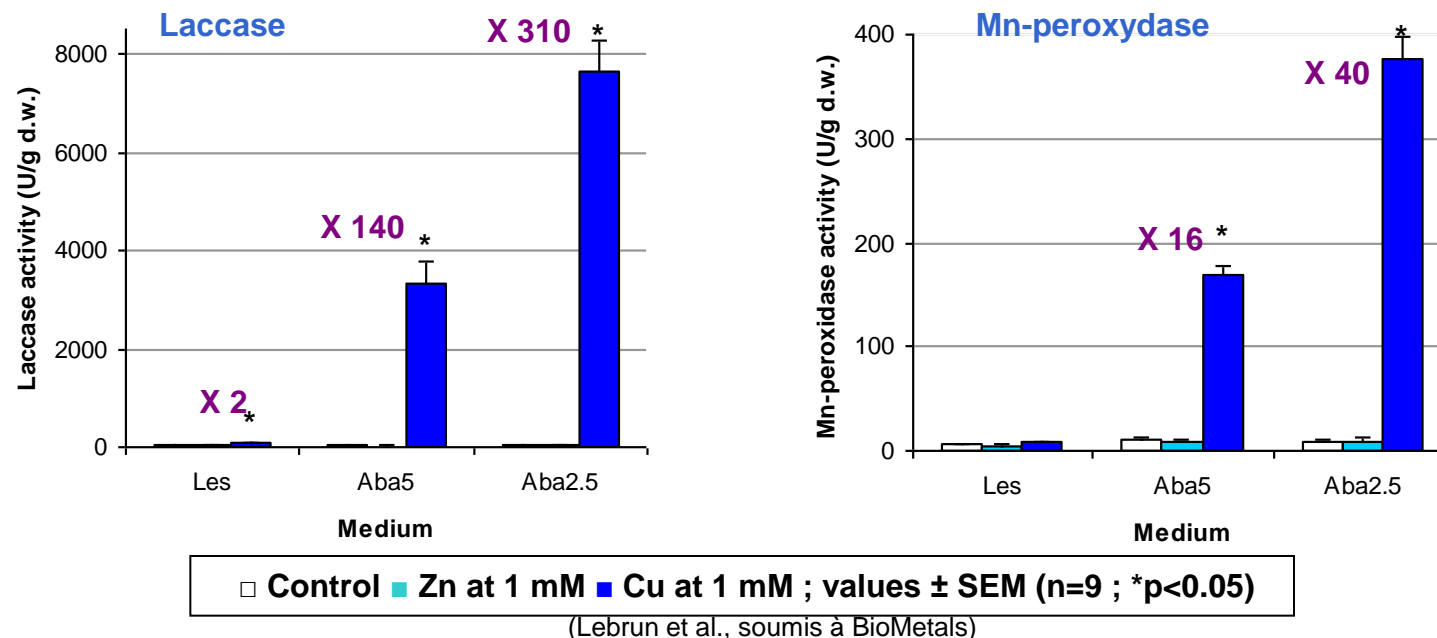
- **Contenus en ligands organiques dans les milieux :
Lesa (notamment acides tartriques) >> Aba5 > Aba2.5**

Spéciation dans les milieux lors d'un ajout de 1 mM



→ **Formes libres des métaux : Aba2.5 > Aba5 > Lesa**

Réponse des Oxydases...

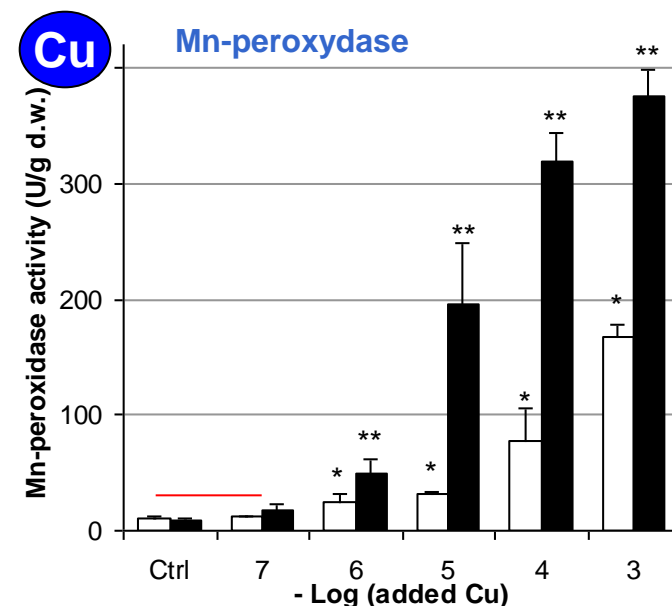
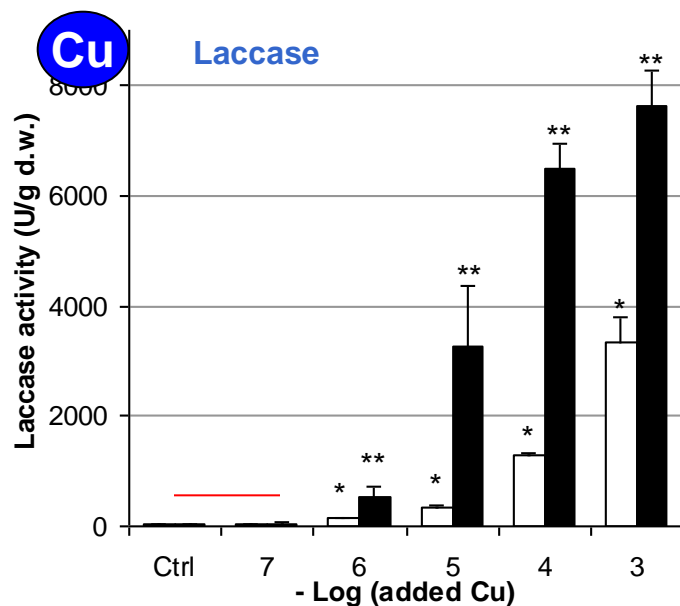


Ajout de métal à 1 mM

- Aucun effet du Zn malgré des $[Zn^{2+}]$ favorisées
- Mn-peroxydase et laccase fortement stimulées par le Cu

→ Confirme la sélectivité de la réponse des oxydases à certains métaux
 → Intensité de la réponse augmentée quand le Cu est plus biodisponible

Sensibilité de la Réponse des Oxydases



Culture of *T. versicolor* in Aba5 □ and Aba2.5 ■ ; values \pm SEM (n=9 ; *p<0.05)

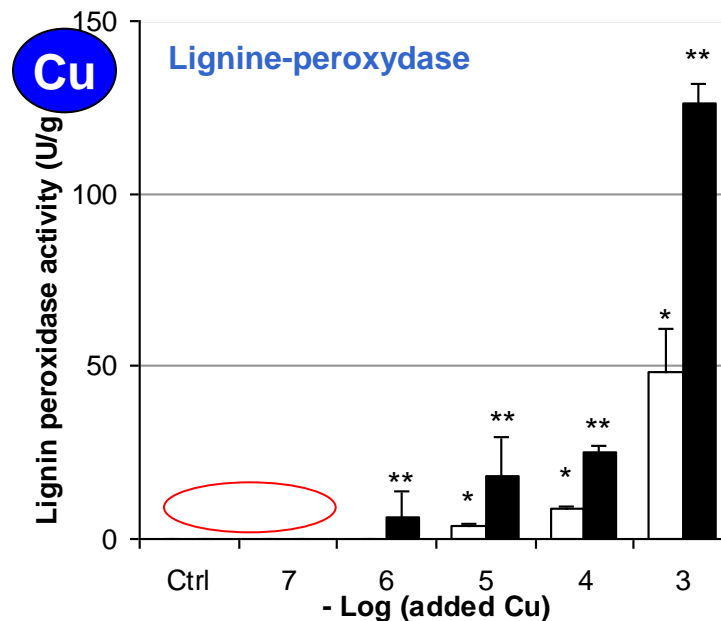
(Lebrun et al., soumis à BioMetals)

Ajout de Cu jusqu'à 1 nM :

- Stimulation de la laccase et de la Mn-peroxydase dès 1 μ M

→ Sensibilité augmentée quand le Cu est plus biodisponible

Cas de la Lignine Peroxydase



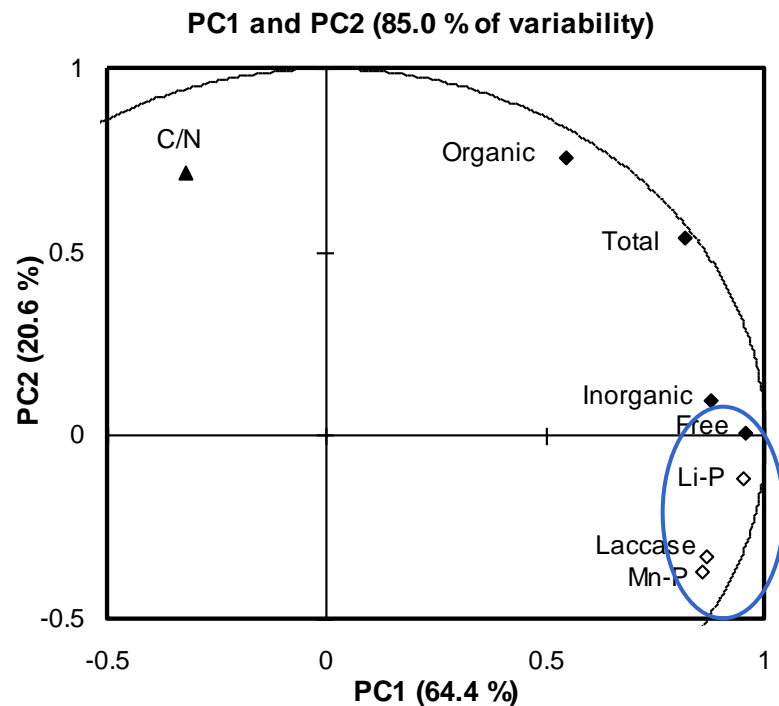
Culture of *T. versicolor* in Aba5 □ and Aba2.5 ■ ; values \pm SEM (n=9 ; *p<0.05)

(Lebrun et al., soumis à BioMetals)

- Productions spécifiques de la lignine-peroxydase dès 1 μ M
- Non rapporté dans la littérature :
 - Exposition à des formes inductives en quantité insuffisante

→ Il existe un seuil de réponse de la lignine-peroxydase au Cu

Pouvoir Inductif des Formes Métalliques sur les Oxydases



Analyse en composantes principales

- Cu_{tot} n'explique pas la stimulation des activités
- Forte corrélation entre $[\text{Cu}^{2+}]$ / intensité de la stimulation
 - $R^2 > 0.77$ pour LAC
 - $R^2 > 0.79$ pour Mn-P
 - $R^2 > 0.98$ pour Li-P

→ Hiérarchisation : libre > inorganique >> organique

Conclusions (1)

L'exposition des champignons aux métaux



- Affecte l'expression du potentiel fonctionnel (les sécrétomes)
- Action du métal au niveau enzymatique et protéique
- **Profils de sécrétion caractéristiques d'une exposition métallique**
- Relier des réponses fonctionnelles à des formes actives et biodisponibles des métaux

Confirme l'hypothèse que les profils fonctionnels fongiques sont utilisables pour évaluer l'écotoxicité des métaux

Conclusions (2)

Réponse des hydrolases aux métaux

- **Grande variabilité intracommunautaire**

Les oxydases répondent à des critères de biomarqueurs

- Réponse sélective : stimulation d'activité (Cu et Cd)
- Généricité intracommunautaire : différents taxons du règne fongique
- Productions spécifiques : lors de stress métalliques
- Réponse adaptative : productions différentielles d'isoenzymes
- Grande sensibilité : niveaux de contamination environnementale (Cu)

Les oxydases fongiques : outils biochimiques pertinents pour évaluer l'écotoxicité des métaux dans les sols

Perspectives

Vers une validation de ces outils à l'échelle de la parcelle (*in situ*)



- Mise en place de microcosmes pour évaluer la réponse des oxydases à l'introduction de contaminants

→ Intégrer l'influence de facteurs biotiques et abiotiques gouvernant l'écologie des communautés microbiennes

Merci pour votre attention !