

Etude de la sécrétion d'enzymes fongiques dans les sols Application au développement de biomarqueurs d'écotoxicité des sols et déchets

Achref Aloui¹, Nathalie Cheviron¹, Didier Chevret² et Christian Mougin¹
¹Unité Physico-chimie et Ecotoxicologie des Soils d'Agrosystèmes Contaminés, INRA, Versailles
²Plateforme PAPPSO, Unité MICALIS, INRA, Jouy en Josas

INTRODUCTION

Les activités anthropiques conduisent à une contamination de l'environnement par des composés chimiques potentiellement toxiques, susceptibles de perturber le fonctionnement des sols cultivés. L'évaluation du risque écotoxicologique associé à ces contaminations nécessite le développement d'outils sensibles et sélectifs pour évaluer d'éventuels effets néfastes. Dans ce contexte, les champignons filamenteux présentent de nombreux atouts dans la mesure où ils produisent des systèmes enzymatiques variés dont l'activité et la production peuvent être affectées à la suite de leur exposition à des contaminants chimiques. Les profils d'expression enzymatiques pourraient être utilisés comme des biomarqueurs d'écotoxicité pertinents.

OBJECTIFS

Notre objectif est d'étudier les profils de sécrétion des protéines exocellulaires par le champignon filamenteux *Trametes versicolor* exposé à un contaminant organique, la 2,5-diméthylaniline (xylidine) et à un contaminant métallique, le cuivre (Cu), dans des cultures liquides. L'approche protéomique est privilégiée, en complément d'approches transcriptomiques ou fonctionnelles déjà réalisées (Mougin et al., 2002; Lebrun et al., 2010).

CULTURES

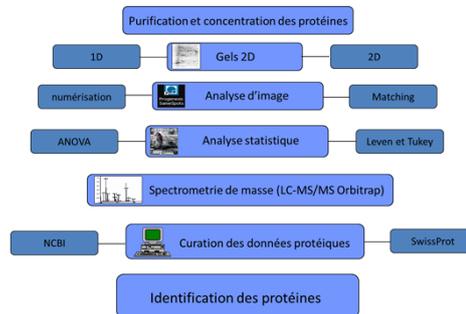


- Le basidiomycète *T. versicolor* ATCC 32745 est cultivé selon Lebrun et al. (2010, 2011). Après 3 jours d'équilibration à 28°C, 3 conditions sont testées en parallèle :
 - témoin non traité,
 - essai traité avec la xylidine à 0,3 mM,
 - essai traité avec le cuivre à 20 ppm.

Après 7 jours d'exposition, le milieu de cultures est récupéré, centrifugé à 4000 g pendant 10 min. Les protéines sont concentrées pour disposer de 100 µg par gel 2D, puis filtrées à 0,2 µm, et un cocktail d'antiprotéases est ajouté à la solution.

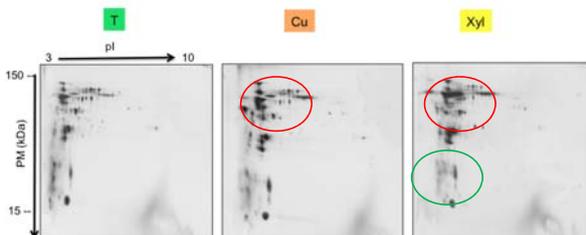
La première dimension électrophorétique est obtenue par isofocalisation (IEF) sur des strips de 18 cm (IPG strips) dans une gamme de pH allant de 3 et 10 unités; la seconde dimension est réalisée sur gel (1mm, 19 cm, 24cm) SDS-PAGE à 12% de polyacrylamide.

ANALYSE PROTEOMIQUE



RESULTATS

1 - GELS 2D



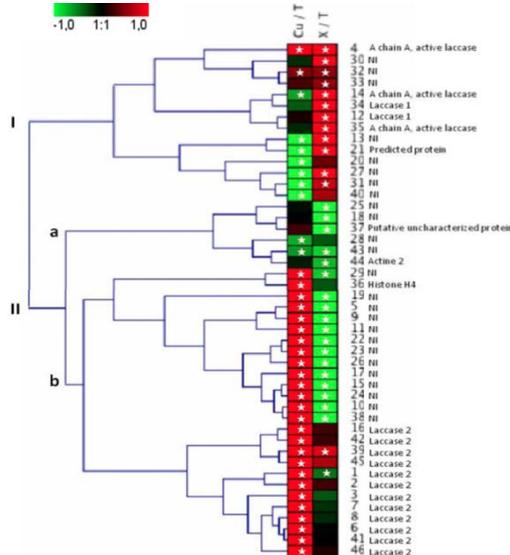
Les gels traduisent l'évolution de l'expression des protéines en réponse à l'exposition de *T. versicolor* au Cu ou à la xylidine. Cette évolution est surtout marquée dans la zone acide du gel, où sont localisées les laccases.

2 - IDENTIFICATION DES PROTEINES

n°	Nom de la protéine	Numéro d'accès ^{a)}	Peptide ^{b)}	pI ^{c)}	pM ^{c)}	Fonction possible
11	laccase 2	Q12718	6	6,5	60	Oxydation et dégradation de la lignine
2	laccase 2	Q12718	7	6,5	60	
3	laccase 2	Q12718	15	6,5	60	
4	A chain A, active laccase	21730578	14	6,2	76	Oxydation et complexation avec les métaux
5	NI		11	7,3	17	Oxydation et dégradation de la lignine
6	laccase 2	Q12718	11	6,5	60	
7	laccase 2	Q12718	12	6,5	60	
8	laccase 2	Q12718	13	6,5	60	Oxydation et dégradation de la lignine
9	NI		7,3	17,8		
10	NI		7,2	48		
11	NI		7,8	17,9	Oxydation et dégradation de la lignine	
12	laccase 1	Q99044	13	3,2		60
13	NI		5,4	83		
14	A chain A, active laccase	21730578	10	5,7	76	Oxydation et complexation avec les métaux
15	NI		7	5,8	34	Oxydation et dégradation de la lignine
16	laccase 2	Q12718	7	6,5	60	
17	NI		7,3	33		
18	NI		7,1	49	Constituants structurels des pores nucléaires	
19	NI		7,2	23,5		
20	NI		6,9	27		
21	Predicted protein	A6R705	5,6	83	Oxydation et dégradation de la lignine	
22	NI		7,5	20,5		
23	NI		6,4	37		
24	NI		6,0	25,3	Oxydation et dégradation de la lignine	
25	NI		6,5	38		
26	NI		7,2	25,3		
27	NI		6,5	35,5	Oxydation et dégradation de la lignine	
28	laccase 1	Q99044	12	5,6		60
29	A chain A, active laccase	21730578	15	5,4		76
30	Histone H4	Q95753	4	11,2	5	Régulation et séparation de l'ADN
31	Putative uncharacterized protein	B8P5V4	7,4	25,4	Hydrolase, glycosidase, complexon de cation, processus métabolique des carbohydrates	
38	NI		6,4	35	Oxydation et dégradation de la lignine	
39	laccase 2	Q12718	9	6,5		60
40	NI		6,5	27,8		
41	laccase 2	Q12718	10	6,5	60	Oxydation et dégradation de la lignine
42	laccase 2	Q12718	10	6,5	60	
43	NI		6,5	27		
44	actine 2	Q9V707	8	7	27,4	Complexon avec les protéines et l'ATP
45	laccase 2	Q12718	7	6,5	60	Oxydation et dégradation de la lignine
46	laccase 2	Q12718	8	6,5	60	

- Le tableau rapporte la liste des protéines du secrétome fongique (identifiées par spectrométrie de masse LC-MS/MS Orbitrap), dont les volumes sont modifiés en réponse à l'exposition au cuivre ou à la xylidine (NI : non identifiées)
- Peu de séquences protéiques sont répertoriées dans les bases de données. Seules des laccases ont été majoritairement identifiées

3 - ANALYSE COMPARATIVE



- L'analyse comparative des données révèle 3 groupes de protéines :
 - le groupe I caractérisé par des spots protéiques augmentés en présence de xylidine,
 - le groupe IIa comprend les spots réprimés en présence de l'un ou l'autre des effecteurs,
 - le groupe IIb comprend les spots augmentés en présence de Cu.

CONCLUSIONS

- Nos résultats montrent la pertinence de la démarche mise en place,
- Le manque d'informations, dans les bases de données, sur les séquences protéiques fongiques, limite l'utilisation des profils de sécrétion comme biomarqueurs,
- Ces résultats à l'échelle protéique confirment ceux obtenus précédemment au niveau transcriptomique ou fonctionnel,
- Il reste nécessaire de développer les protocoles d'extraction des protéines à partir des sols agricoles contaminés.

Références

Mougin C., Kollmann A. and Jolivald C. 2002. Biotechnol. Letters 24:139-142
 Lebrun J.D., Trinsoutrot-Gattin I., Laval K. and Mougin C. 2010. Environ Toxicol Chem 29:902-908
 Lebrun J.D., Demont-Caulet N., Cheviron N., Laval K., Trinsoutrot-Gattin I., Mougin C. 2011. Chemosphere 82:340-345

Remerciements

Les auteurs remercient la Région Ile de France et le DIM Astrea pour l'allocation post-doctorale dont a bénéficié Achref Aloui.
 Ils remercient également L. Rajou (Plateforme de Biochimie des Protéines, IJBP, INRA Versailles, pour l'aide apportée à la réalisation des gels 2D.