HAL
open science

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

Achref A. Aloui, Nathalie N. Cheviron, Didier D. Chevret, Christian Mougin

To cite this version:

Achref A. Aloui, Nathalie N. Cheviron, Didier D. Chevret, Christian Mougin. Etude de la sécrétion d'enzymes fongiques dans les sols. Application au développement de biomarqueurs d'écotoxicité des sols et déchets. Journée des doctorants et post-doctorants du DIM ASTREA, Mar 2011, Paris, France. 2011. hal-01004304

HAL Id: hal-01004304

https://hal.science/hal-01004304v1

Submitted on 2 Apr 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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

Achref Aloui[1], Nathalie Cheviron[1], Didier Chevret[2] et Christian Mougin[1]

[1]Unité Physico-chimie et Ecotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés, INRA, Versailles

[2]Plateforme 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 écotoxique 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 utilisées 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).

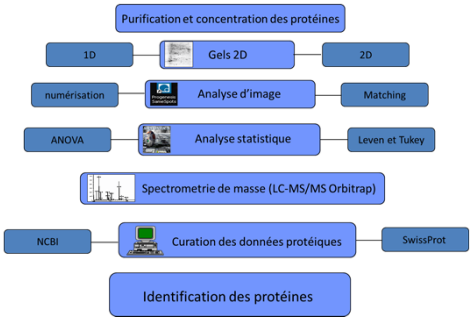
CULTURES

● 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.

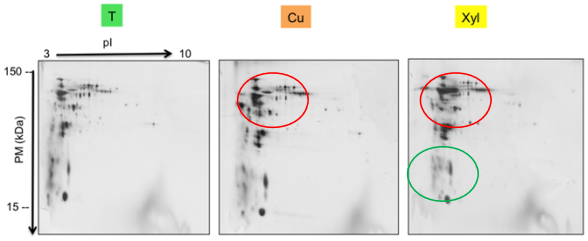
● La première dimension électrophorétique est obtenue par isofocalisation (IEF) sur des strips de 18 cm (IPG strips) dans une gamme de pH allant de 3 et 10 unités; la seconde dimension est réalisée sur gel (1mm, 19 cm, 24cm) SDS-PAGE à 12% de polyacrylamide.

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

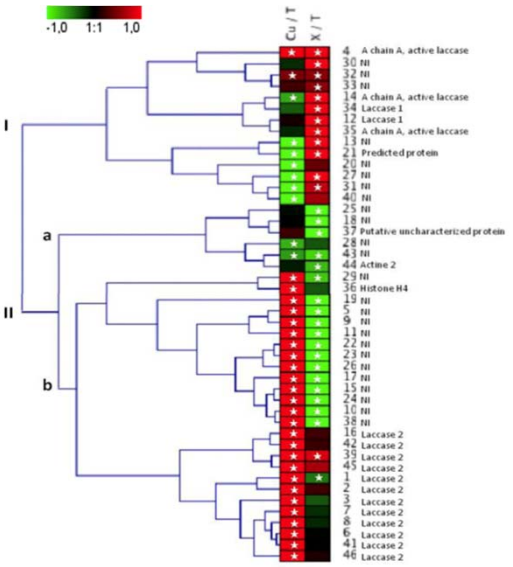
n°	Nom de la protéine	Numéro d'accès[a]	Peptide[b]	pI_{exp}[c]	PM_{exp}[c]	Fonction possible
1	laccase 2	Q12718	6	6,5	60	Oxydoréduction et dégradation de la lignine
2	laccase 2	Q12718	7	6,5	60	
3	laccase 2	Q12718	15	6,5	60	
4	A chain A, active laccase	21730578	14	6,2	26	Oxydoréduction et complexion avec les métaux
5	NI			7,3	17	Oxydoréduction 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	
9	NI			7,3	17,8	
10	NI			7,2	48	
11	NI			7,8	17,3	
12	laccase 1	Q99044	13	3,2	60	Oxydoréduction et dégradation de la lignine
13	NI			5,4	83	
14	A chain A, active laccase	21730578	10	5,7	26	Oxydoréduction et complexion avec les métaux
15	NI			5,8	34	Oxydoréduction et dégradation de la lignine
16	laccase 2	Q12718	7	6,5	60	
17	NI			7,3	33	
18	NI			7,1	49	
19	NI			7,2	23,5	
20	NI			6,9	27	
21	Predicted protein	A6R705		5,6	83	Constituants structurels des pores nucléaires
22	NI			7,5	20,5	
23	NI			6,4	37	
24	NI			6,9	25,3	
25	NI			6,5	38	
26	NI			7,2	25,3	
27	NI			6,5	34,5	
34	laccase 1	Q99044	12	9,6	60	Oxydoréduction et dégradation de la lignine
35	A chain A, active laccase	21730578	15	5,4	26	Oxydoréduction et complexion avec les métaux
36	Histone H4	Q9HDF5	4	5	17,5	Régulation et réparation de l'ADN
37	Putative uncharacterized protein	B8PEY4		7,4	25,4	hydrolase, glycosidase, complexion de cation, processus métabolique des carbohydrates
38	NI			6,4	35	Oxydoréduction et dégradation de la lignine
39	laccase 2	Q12718	9	6,5	60	
40	NI			8,5	27,8	
41	laccase 2	Q12718	10	6,5	60	Oxydoréduction et dégradation de la lignine
42	laccase 2	Q12718	10	6,5	60	
43	NI			8,5	27	
44	actine 2	Q9Y707	8	7	27,4	Complexion avec les protéines et l'ATP
45	laccase 2	Q12718	7	6,5	60	Oxydoréduction et dégradation de la lignine
46	laccase 2	Q12718	8	6,5	60	

a) Numéro d'accès extraits à partir d'"uniprot" (http://www.uniprot.org/), sauf pour les spots 4, 14, 35 qui ont été identifiés par recherche "DENOVO" à "NCBI" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).
b) Numéros de peptides retenus "matched peptides".
c) Exp: valeurs expérimentales pour le point isoélectrique (pI) et le poids moléculaire (PM) de chaque protéine.

● 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 Jolivalt 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.