



UNIVERSITE DE ROUEN

**Ecole Doctorale Normande de
Biologie Intégrative, Santé et
Environnement**



THESE

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN SCIENCES

**Discipline : Biochimie
Spécialité : Ecotoxicologie**

Par

Jérémie D. LEBRUN

***Biodiversité fonctionnelle fongique :
Indicateur d'écotoxicité des métaux dans les sols ?***

Soutenue le 28 Janvier 2010 devant le jury composé de :

BARRAY Sylvie, Professeur, Université de Rouen

Président

TOPP Edward, Directeur de Recherche, AAFS London (Canada)

Rapporteur

JOLIVALT Claude, Maître de conférences, ENSC Paris

Rapporteur

MARTIN-LAURENT Fabrice, Directeur de Recherche, INRA Dijon

Examineur

CRIQUET Stéven, Maître de conférences, Université Aix-Marseille III

Examineur

MOUGIN Christian, Directeur de Recherche, INRA Versailles

co-Directeur de thèse

GATTIN Isabelle, Enseignant-Chercheur, ESITPA Mont-St-Aignan

co-Directeur de thèse

Biodiversité fonctionnelle fongique : indicateur d'écotoxicité des métaux dans les sols ?

Résumé – L'objectif principal de ce travail a été d'évaluer le potentiel de la biodiversité fonctionnelle comme indicateur de l'écotoxicité de stressors chimiques (métaux) retrouvés dans les sols. Dans un premier temps, une approche au champ a permis d'étudier la variabilité spatiotemporelle d'activités enzymatiques du sol et leurs réponses à l'introduction de contaminants (Cu) dans différents contextes agricoles (prairies et grandes cultures). Dans un second temps, l'impact de métaux sur les systèmes fonctionnels extracellulaires, i.e. les secrétomes, a été étudié au niveau enzymatique et protéique chez des organismes clés du fonctionnement des sols, les champignons. Plusieurs souches fongiques cultivées en milieux liquides ont été exposées au Cu, Zn, Pb ou Cd. Les études se sont focalisées sur deux familles d'enzymes impliquées dans les cycles biogéochimiques des sols : les hydrolases et les oxydoréductases. A l'échelle de l'écosystème, les résultats ont montré que les activités enzymatiques du sol sont sensibles au travail du sol, malgré leur grande variabilité spatiotemporelle. Toutefois, elles ne semblent pas être des descripteurs d'une contamination métallique. A l'échelle de l'organisme, les cultures fongiques ont permis d'établir des profils de sécrétion caractéristiques d'exposition métallique. La réponse des hydrolases aux métaux présente une grande variabilité intracommunautaire. De par la spécificité, la sensibilité et la généricité de leur réponse, les oxydoréductases fongiques se sont avérées être des biomarqueurs potentiels d'exposition aux métaux. Il est maintenant nécessaire de valider *in situ* ces outils biochimiques pour évaluer l'écotoxicité des métaux dans les sols.

Mots-clés : activités enzymatiques, hydrolases, oxydoréductases, contamination, métaux, champignons, secrétomes, biomarqueurs d'exposition

Functional biodiversity of fungi: indicator of the metal ecotoxicity in soils?

Abstract – The main objective of this research was to assess the potential of functional biodiversity as indicator of the ecotoxicity of chemical stressors (metals) found in soils. In a first step, a field approach allowed to study the spatiotemporal variability of soil enzymatic activities and their responses to a metallic contamination (Cu) in different agricultural contexts (grasslands and cropped soils). In a second step, the impact of metals on the extracellular functional systems, i.e. the secretomes, was studied at the enzymatic and protein level in key-organisms of soil functioning, the fungi. Several fungal strains cultured in liquid media were exposed to Cu, Zn, Pb or Cd. The studies focalized on two families of enzymes involved in the biogeochemical cycles of soils: hydrolases and oxidoreductases. At the ecosystem scale, results showed that the soil enzymatic activities were sensitive to tillage despite their great spatiotemporal variability. But they did not seem to be descriptors of a metallic contamination. At the organism scale, the fungal cultures allowed to establish characteristic secretion profiles of metal exposure. The response of hydrolases to metals had a great intracommunity variability. Because of the specificity, sensitivity and genericity of their response, fungal oxidoreductases could be potential exposure biomarkers to metals. It is now necessary to validate *in situ* these biochemical tools to assess the ecotoxicity of metals in soils.

Keywords: enzymatic activities, hydrolases, oxidoreductases, contamination, metals, fungi, secretomes, exposure biomarkers

Remerciements

3 ans... trop long ! C'est ce k'on peut se dire au début d'une thèse .
3 ans... trop court ! Lorsque l'on réalise et vit quelque chose k'i passionne .
3 ans... un éveil scientifique, un challenge... une expérience unique et enrichissante tant sur le plan professionnel k' relationnel . C'est pourquoi, je tiens à remercier tous ceux avec k'i j'ai partagé un bout de chemin durant ces 3 ans... en espérant... n'avoir oublié personne !

Tout d'abord, je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse, Christian Mougin et Isabelle Gattin de m'avoir guidé et accompagné tout le long de cette belle aventure. Merci pour les riches conversations et les précieux conseils. Merci à Christian de m'avoir offert, il y a de cela 4 ans, l'opportunité de m'engager sur cette grande voie k'est la recherche !

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à Olivier Le Gall (Directeur du département SPE de l'Inra) de m'avoir offert la possibilité de rédiger ma thèse en toute sérénité.

Je tiens à remercier mon encadrante Nathalie Demont-Caullet (Université Paris 7 / Inra Versailles) de m'avoir enseigné la rigueur de la Biochimie à la "pouillasse", (après avoir suivi ses enseignements sur les bancs de la Fac lorsk j'étais encore un jeune étudiant). Merci pour le suivi attentif et l'investissement dans la réalisation de mes travaux sur ce petit monde k'constituent les protéines !

J'adresse mes remerciements à Karine Laval pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour ses suggestions constructives apportées tout au long de ma thèse. J'en profite pour remercier tous les membres de l'équipe BioSol pour le contexte favorable qui a permis, entre autres, la réalisation des travaux de "plein air" au beau milieu de la Normandie !

Je remercie aussi tous mes collègues de l'unité PESSAC qui ont participé au bon déroulement de ma thèse : les gestionnaires, documentalistes, techniciens et scientifiques. Merci à Isabelle Lamy pour m'avoir fait profiter de son expérience et ses connaissances en Chimie. Merci à Laure Mamy pour sa disponibilité et ses conseils amicaux durant mon parcours. Une bonne ambiance au sein d'une équipe crée certaines affinités, voire une sympathique camaraderie. Un clin d'œil du P'ti à Gigi (et ses tablettes de chocolat), à Papi (et ses tartes aux pommes), à Mami (et ses revers fulgurants au tennis) et à Tati (ki s'est envolé vers d'autres horizons ... le pays des Kangourous).

Il y a toujours un début ... Merci à Isabelle Taton et à Walter A. Kollmann de m'avoir initié aux joies "d'apprenti-sorcier". Les Hgcètes, un règne fascinant!

Je remercie également les personnes ki ont collaboré avec intérêt à ce travail : François Perreau (Inra Versailles) en spectrométrie de masse, Nelly Wolff (Inra Versailles) en microscopie électronique, Nathalie Cheviron et Martine Gonneau (Inra Versailles) pour leur "savoir-faire" en Biochimie, Christian Steinberg et Cécile Héraud (Inra Dijon) pour les précieuses informations sur leur mycothèque.

Finalement, je remercie chaleureusement mes proches qui m'ont soutenu dans les moments des plus délicats et ki ont, à leur façon, contribué à ce travail :

- Mes amis "Québécois" de Fac (Dr Bouafali, Alex, Clairette, Delph ... bientôt, à votre tour!) et mes amis de Brie, la 77-Family (Nono, Elo, Maru, Cécile, Valou et Anne); un concentré de bonheur et de délires!
- Mes parents et mon frère pour leur soutien inconditionnel!
- Et à ma précieuse Marine ...

Table des Matières

INTRODUCTION GENERALE : Des nouveaux enjeux de l'agriculture à l'écotoxicologie	
• Dimension socio-économique	1
• L'écotoxicologie, un challenge pluridisciplinaire	2
• Objectif de la thèse et démarche scientifique	3
• Organisation du mémoire	4
CHAPITRE I : Eléments d'écologie microbienne et d'écotoxicologie	
1. Les sols cultivés, des écosystèmes menacés	5
1.1. Fonctionnement des écosystèmes terrestres	5
1.1.1. Le sol et ses fonctions : un système complexe et vivant	5
1.1.2. Rôle et composition de la biocénose tellurique	6
1.1.3. Microorganismes du sol, acteurs des processus environnementaux	7
1.2. Menaces anthropiques sur les sols cultivés	9
1.2.1. Usages et pratiques agricoles	9
1.2.2. Contamination des sols cultivés	10
1.2.3. Cas des éléments traces métalliques	11
1.3. Conséquences de la contamination des sols cultivés	13
1.3.1. Santé humaine	13
1.3.2. Effets des contaminants sur les écosystèmes terrestres	14
2. Evaluer l'écotoxicité dans les sols	16
2.1. L'écotoxicologie, des approches multiples à différentes échelles	16
2.1.1. Limites des approches physico-chimiques	17
2.1.2. Développement d'outils biologiques	18
2.1.3. Difficultés rencontrées en écotoxicologie des sols	19
2.2. Apport de l'écologie microbienne à l'écotoxicologie	20
2.2.1. Les outils moléculaires, accès à la diversité structurelle	20
2.2.2. Vers la diversité fonctionnelle	22
CHAPITRE II : Biodiversité fonctionnelle comme indicateur d'écotoxicité dans les sols	
1. Enzymes du sol, indicateurs fonctionnels de son état de santé ?	25
1.1. Acteurs des processus biochimiques des sols	25
1.2. Origine et localisation des enzymes dans les sols	26
1.3. Variabilité des activités enzymatiques	28
1.4. Activités enzymatiques et perturbations anthropiques	29
2. Enzymes fongiques, biomarqueurs d'exposition aux métaux ?	31
2.1. Les champignons du sol	31
2.1.1. Rôle écologique	32
2.1.2. Taxonomie	32
2.1.3. Diversité fonctionnelle	34
2.2. Traits fongiques comme biomarqueurs d'exposition aux contaminants	36
2.2.1. Interactions des métaux avec les champignons	36
2.2.2. Impacts des métaux sur les traits fongiques	38
2.2.3. Réponses des enzymes fongiques aux contaminants	39

RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE A - A l'échelle de l'écosystème et des communautés 41

CHAPITRE III : Activités enzymatiques globales du sol, reflet des pratiques anthropiques ?

Article 1 - Copper impact on soil enzymatic activities is lower than their natural spatiotemporal variability at the plot scale 43

1. Introduction 45
2. Material et Methods 47
3. Results 51
4. Discussion 58
5. Conclusion 61

PARTIE B - A l'échelle de l'individu, *Trametes versicolor* 63

CHAPITRE IV : Bases physiologiques de la sécrétion du système fonctionnel fongique

Article 2 - Insights into the development of fungal biomarkers for metal ecotoxicity assessment: case of *Trametes versicolor* exposed to copper 65

1. Introduction 67
2. Material et Methods 69
3. Results 71
4. Discussion 77

CHAPITRE V : Impact des métaux sur les profils fonctionnels fongiques

Article 3 - Secretion profiles of fungi as affected by metals: a study of extracellular system in *Trametes versicolor* 81

1. Introduction 83
2. Material et Methods 85
3. Results 88
4. Discussion 94

PARTIE C - Oxydoréductases fongiques, biomarqueurs d'exposition aux métaux ? 97

CHAPITRE VI : Généricité des réponses enzymatiques aux métaux chez les champignons

Article 4 - Study of functional system in soil fungi: extracellular profiles as tools for metal ecotoxicity assessment 99

1. Introduction 101
2. Material et Methods 103
3. Results 105
4. Discussion 110

CHAPITRE VII : Sensibilité et spécificité de la réponse des oxydoréductases aux métaux

Article 5 - Fungal oxidases as exposure biomarkers to metals: influence of metal speciation on functional responses in *Trametes versicolor* 113

1. Introduction 115
2. Material et Methods 117
3. Results 121
4. Discussion 128
5. Conclusion 131

DISCUSSION GENERALE

• De la parcelle à l'Erlenmeyer : vers des descripteurs d'une contamination métallique 133

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

• Pertinence de l'utilisation de biomarqueurs fongiques *in situ* ? 141

BIBLIOGRAPHIE

• Références citées 143

ANNEXES

• Participations et productions scientifiques 163

Liste des abréviations

ADEME	Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l' Energie
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique m essenger
C	Carbone
Cd	Cadmium
CTO	Composé Trace O rganique
Cu	Cuivre
DDT	D ichloro D iphényl T richloroéthane
EDTA	<i>Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid</i> (Acide éthylène diamine tétra-acétique)
ETM	Elément Trace M étallique
HAP	H ydrocarbures A romatiques P olycycliques
Hg	Mercure
Mn	Manganèse
MRE	<i>Metal Responsive Elements</i> (Eléments sensibles aux métaux)
N	Azote
P	Phosphore
Pb	Plomb
PCB	P oly C hloro B iphényles
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Amplification en chaîne par polymérase)
ppm	partie p ar m illion
REACH	en R egistrement, E valuation et A utorisation des substances C Himiques
S	Souffre
Zn	Zinc

INTRODUCTION GENERALE

Des nouveaux enjeux de l'agriculture à l'écotoxicologie

La connaissance et la préservation des sols sont des réels enjeux pour le 21^{ème} siècle, ne serait-ce que pour nourrir correctement 11 milliards d'humains d'ici 2050. Cependant, la contamination croissante des sols due à la révolution industrielle et agricole a engendré de nombreuses perturbations écologiques. Forts de ces constats, les nouveaux enjeux de l'agriculture sont de promouvoir une gestion durable des sols tout en répondant à l'urgence et la sécurité alimentaires ainsi qu'aux exigences écologiques. Partie d'une ère productiviste, l'agriculture s'oriente maintenant vers une ère de préservation de l'environnement, soucieuse des préoccupations des sociétés modernes. En effet, la santé environnementale et humaine est actuellement au coeur des préoccupations citoyennes, politiques et réglementaires.

La préoccupation des citoyens vis-à-vis de la préservation de l'environnement entraîne une prise de conscience par les pouvoirs publics. Par exemple, cette prise de conscience a conduit à l'élaboration par la Commission Européenne de directives pour une stratégie commune de protection et d'utilisation durable des sols (European Commission, 2002 et 2006 ; Morvan et al., 2008). En Europe, le règlement REACH (enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques), entré en vigueur le 1^{er} Juin 2007, impose aux industries chimiques de fournir les données de sûreté sanitaire et environnementale pour les substances qu'elles mettent sur le marché. Par ailleurs, la directive 91/414 fournit les bases de l'homologation des produits phytosanitaires (Guidance document, 2002).

En France, le Grenelle de l'Environnement qui s'est tenu en Octobre 2007 engage les pouvoirs publics autour de 4 enjeux majeurs : lutter contre le réchauffement climatique, **préserver et gérer la biodiversité** et les milieux naturels, **préserver la santé et l'environnement** tout en stimulant l'économie et instaurer une démocratie écologique. Le comité opérationnel « Recherche » du Grenelle a structuré ses activités autour de cinq groupes, dont « Agriculture, milieux, eaux et biodiversité » et « Santé et Environnement » (ComOp, 2008). Concernant l'agriculture, les milieux, l'eau et la biodiversité, le comité a souligné l'importance de préserver la biodiversité et les services rendus par les écosystèmes, et de mieux comprendre le fonctionnement des sols. Pour ce, il est question **de renforcer la recherche sur la biodiversité des sols et son importance fonctionnelle**. Concernant le lien santé/environnement, les pollutions de l'environnement peuvent avoir des conséquences

sérieuses et constatées sur la santé de l'homme. Il est donc important **d'améliorer les connaissances sur les risques sanitaires et environnementaux de substances potentiellement toxiques afin d'élaborer des normes**. Au-delà de l'analyse et de la compréhension des processus, le Grenelle propose un plan d'action pour concevoir une agriculture à haute valeur environnementale en développant la recherche tout en intégrant les connaissances de l'écotoxicologie des sols.

Dans ce contexte socio-économique, de vastes programmes scientifiques sont lancés à de grandes échelles. Par exemple, l'ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) a lancé en 2004 un projet national sur plusieurs années nommé « Bioindicateurs de qualité des sols » afin de développer des indicateurs biologiques de l'état de santé des sols (Bispo et al., 2009). Par ailleurs, la recherche agronomique est fortement sollicitée pour répondre aux attentes du Grenelle de l'Environnement et aux nouveaux enjeux de l'agriculture, **où l'écotoxicologie constitue un champ en pleine expansion**.

L'écotoxicologie, un challenge pluridisciplinaire

L'écotoxicologie définie en 1969 par René Truhaut (Truhaut, 1977), est une discipline multidisciplinaire combinant l'écologie, la toxicologie, la biologie et la chimie de l'environnement. Elle étudie les perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, le devenir des contaminants dans les milieux naturels et leurs conséquences écologiques à des échelles spatiales et temporelles importantes (Ramade, 2007^a).

L'écotoxicologie doit répondre à différents objectifs d'ordre scientifique, méthodologique et réglementaire. Sur le plan scientifique, l'écotoxicologie doit permettre d'identifier, de comprendre les mécanismes, d'évaluer et de prévoir les perturbations physiques ou chimiques subies par les écosystèmes. Sur le plan méthodologique, les objectifs sont de développer des outils destinés à la surveillance biologique ou « biomonitoring » de l'état de santé des écosystèmes. L'expérimentation permet ainsi d'acquérir des données et de comprendre les processus, et se situe en amont de l'élaboration de modèles mathématiques de prévision, et de toute proposition d'actions. En effet, un domaine de cette discipline est d'évaluer les risques écotoxicologiques des perturbations sur les écosystèmes afin d'élaborer des normes et de répondre aux exigences réglementaires. Sur un plan finalisé, des outils d'aide à la décision

doivent être fournis aux pouvoirs publics, aux agronomes et aux instances chargées de la protection environnementale pour une gestion durable des sols, qui représentent un patrimoine non renouvelable à l'échelle humaine.

Objectif de la thèse et démarche scientifique

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer le potentiel de la biodiversité fonctionnelle en tant qu'indicateur de l'écotoxicité de composés chimiques dans les sols. Pour ce faire, il est nécessaire de comprendre les bases environnementales et physiologiques de la régulation et de la sécrétion des systèmes fonctionnels chez les organismes des sols, et de définir les impacts d'agents de stress sur ces systèmes. Nous nous sommes focalisés sur deux grandes familles d'enzymes: les hydrolases, communément utilisées pour mesurer le fonctionnement des sols et les oxydoréductases de type ligninolytique, plutôt spécifiques aux communautés fongiques.

Dans un premier temps, une approche au champ a permis d'étudier la variabilité spatiotemporelle d'activités enzymatiques globales du sol, ainsi que leurs réponses à l'introduction de contaminants (le cuivre) dans différents contextes agricoles (grandes cultures et prairies). Dans un second temps, nous avons précisé les mécanismes mis en jeu lors de la réponse des systèmes enzymatiques à des contaminants métalliques chez les champignons filamenteux, acteurs clés du fonctionnement des sols. Différentes activités hydrolases et oxydoréductases ont été mesurées à partir de cultures liquides de souches pures. Cette étude a été couplée à une approche protéomique prenant en compte l'impact du contaminant sur les pools protéiques, tels que les sécrétomes. La détermination de la spécificité, de la sensibilité et de la généricité des réponses a permis ainsi l'établissement de profils fonctionnels caractéristiques d'une exposition métallique. Sur le plan finalisé, les connaissances acquises au cours de ces travaux permettront de préciser si les profils enzymatiques fongiques sont utilisables pour évaluer l'écotoxicité de contaminants dans les sols, et constituent de ce fait des outils pertinents.

Organisation du mémoire

Ce mémoire est structuré en sept chapitres. Les chapitres I et II constituent une synthèse des connaissances et des informations accessibles dans la littérature sur l'écologie microbienne, l'écotoxicologie et la biodiversité fonctionnelle. Les pressions anthropiques subies par les sols cultivés, l'évaluation de leur état de santé et la potentialité d'utiliser les enzymes comme indicateur d'écotoxicité dans les sols, y sont discutés. Les cinq chapitres suivants concernent les résultats obtenus au cours de ma thèse et sont regroupés dans trois parties : Partie A (Chapitre III), Partie B (Chapitres III et IV) et Partie C (Chapitres V et VI).

La Partie A concerne les expérimentations réalisées à l'échelle de l'écosystème et des communautés microbiennes. L'effet de perturbations anthropiques telles que le travail du sol ou la contamination métallique, a été évalué sur des activités enzymatiques globales du sol (Chapitre III). La Partie B concerne l'acquisition de connaissances physiologiques sur la régulation de la sécrétion des systèmes enzymatiques (Chapitre IV) et l'impact de métaux sur ces systèmes (Chapitre VI) chez le champignon filamenteux. Dans l'objectif d'identifier de potentiels biomarqueurs d'exposition, cette partie expérimentale a été réalisée sur le modèle fongique *Trametes versicolor*. La Partie C a pour but de déterminer si les oxydoréductases fongiques répondent aux critères attendus de biomarqueurs d'exposition. La généricité de la réponse des oxydoréductases aux métaux a été étudiée chez une dizaine de souches telluriques fréquemment isolées de sols cultivés (Chapitre VI) et la sensibilité de cette réponse a été évaluée en prenant en compte la biodisponibilité des métaux (Chapitre VII), facteur déterminant dans des conditions environnementales.

L'ensemble des résultats obtenus de la parcelle à l'Erlenmeyer, a été confronté dans la partie « Discussion générale ». La faisabilité de l'utilisation des enzymes fongiques comme biomarqueurs d'exposition au métaux *in situ* est abordée dans la partie « Conclusion et perspectives ».

CHAPITRE I

Éléments d'écologie microbienne et d'écotoxicologie

1. Les sols cultivés, des écosystèmes menacés

Les sols assurent de nombreuses fonctions essentielles pour les écosystèmes et les sociétés humaines. Comme supports de la croissance des végétaux, ils fournissent aux êtres vivants, y compris l'homme, la plus grande partie de leur alimentation. Toutefois, les sols agricoles sont des écosystèmes fortement soumis aux pressions anthropiques qui altèrent leur fonctionnement et leur qualité. Par ailleurs, les sols sont également des réservoirs de biodiversité et le siège de nombreux cycles biogéochimiques, et notamment de flux de contaminants. L'étude de la contamination des sols par des composés chimiques et leurs conséquences sur le maintien des fonctions au sein de ces écosystèmes est d'une importance capitale pour la préservation de ce patrimoine non renouvelable à l'échelle humaine.

1.1. Fonctionnement des écosystèmes terrestres

Comme tout écosystème, les écosystèmes terrestres sont formés d'un ensemble d'organismes vivants, la biocénose et d'un milieu, le biotope. Ces deux composantes forment un complexe dynamique permettant ainsi le maintien et le développement de la vie.

1.1.1. Le sol et ses fonctions : un système complexe et vivant

Le sol représente la couche superficielle de la croûte terrestre, meuble, composée de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes vivants. Il résulte de la transformation de la roche mère sous-jacente en minéraux (silicates, oxyhydroxydes, argiles...) par des processus climatiques, physico-chimiques et biologiques. La fraction minérale du sol est enrichie par des apports organiques issus de la décomposition de végétaux et d'animaux, formant l'humus (Calvert, 2003^a ; Gobat et al., 2004^a). Bien que le terme « sol » soit utilisé de façon générique, il existe une grande diversité de sols de par leur composition, leur pédogenèse, leur recouvrement végétal ou leur utilisation par les sociétés humaines.

A l'interface entre la biosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et l'atmosphère, le sol assure différentes fonctions essentielles pour l'environnement, les écosystèmes et les sociétés humaines (Calvert, 2003^b ; Blum et al., 2004 ; Morvan et al., 2008). Il constitue une source de matériaux, un réceptacle pour les déchets et un support mécanique pour les constructions, les infrastructures et les cultures des sociétés humaines. Outre ces fonctions technologiques, il assure différentes fonctions d'ordre écologique. Le sol joue le rôle de :

- réservoir en éléments nécessaires à la vie, y compris l'eau et l'air, permettant la production de biomasse
- réacteur biologique intervenant dans la minéralisation de la matière organique et dans les recyclages des éléments impliqués dans les cycles biogéochimiques
- déterminant dans la qualité de l'environnement en intervenant dans la qualité chimique de l'air (fixation ou rejet de CO₂, N₂...), de l'eau (transport, filtration...) et en épurant les contaminants organiques ou inorganiques
- habitat de la biodiversité (réservoir de gènes) en offrant une grande variété de niches écologiques pour les organismes vivants.

Bien que le sol soit un système hétérogène et discontinu, il dispose d'une structure caractéristique jouant un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres, la porosité. Cette porosité, en général proche des 50 %, permet la circulation de fluides gazeux et liquides. Ainsi, ce système complexe constitue un milieu de vie exceptionnel pour la flore, la faune et les microorganismes (Calvert, 2003^a ; Gobat et al., 2004^b ; Voroney, 2007).

1.1.2. Rôle et composition de la biocénose tellurique

La biocénose est en interaction avec les composantes physiques et chimiques des sols et permet la dynamique de la matière organique, de l'eau, de l'air et le recyclage des nutriments. Ainsi, l'ensemble des fonctions assurées par la biocénose conditionne le fonctionnement biologique des sols, encore mal connu de par sa complexité écologique (Gobat et al., 2004^a ; Morris & Blackwood, 2007). En effet, la biocénose est extraordinairement diversifiée et est représentée par l'ensemble des règnes : les végétaux, les animaux, les bactéries, les champignons et les protistes.

La biocénose tellurique est plus abondante en surface et diminue en profondeur. Cette abondance est notamment liée à la présence du carbone mais dépend également d'autres

facteurs : paramètres physico-chimiques et structuraux des sols, pressions environnementales (climat, humidité...) et anthropiques comme la pollution (Frey, 2007). La **Figure I.1** représente l'estimation de la répartition des organismes dans la couche supérieure des sols pour l'ensemble des continents. Après les racines souterraines, les microorganismes (42%) constituent la principale biomasse à la surface des sols. Dans un gramme de sol, 10^7 bactéries cultivables, 10^5 champignons et 10^5 protozoaires sont trouvés bien qu'ils représentent à peine 2 % du carbone total (Robert & Chenu, 1992).

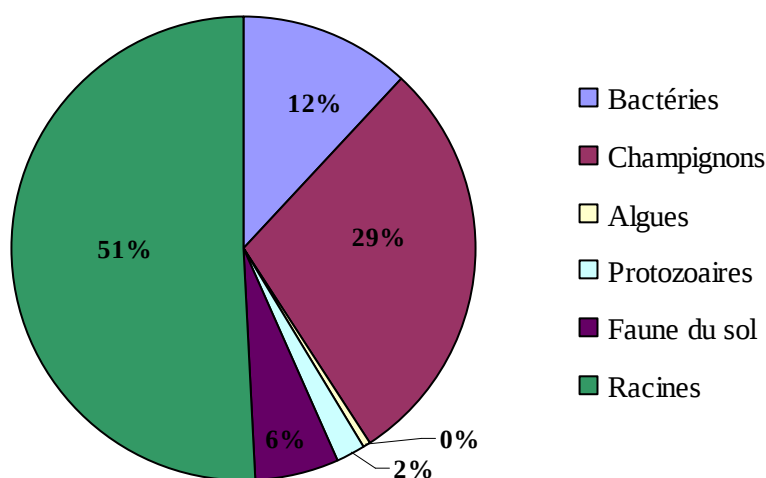


Figure I.1. Abondance relative des organismes vivants dans une couche de sol de 20 cm d'épaisseur contenant une biomasse totale de 12000 kg/ha (reproduit d'après Calvet, 2003^a)

1.1.3. Microorganismes du sol, acteurs des processus environnementaux

Grâce à leur capacité à coloniser divers milieux y compris extrêmes, les microorganismes sont un maillon indispensable et vital pour tous les écosystèmes. Ils sont représentés par des champignons, des bactéries et des algues disposant d'une grande diversité taxonomique, physiologique et métabolique. De par leur rapport surface/volume élevé, ils ont une grande capacité d'échanges avec l'environnement et sont étroitement impliqués dans le fonctionnement des sols (Gobat, 2004^a). La structure poreuse des sols constitue des microhabitats pour les microorganismes, sièges de nombreux processus biologiques et biochimiques. Nannipieri et al. (2003) ont estimé que 80-90% de ces processus seraient assurés par les microorganismes. En effet, ils sont capables de minéraliser la matière organique tels que les polymères végétaux (environ 90% des apports organiques des sols) et

de la rendre disponible à d'autres organismes. Ils sont de ce fait à la base de nombreuses chaînes trophiques.

Les microorganismes sont également impliqués dans les cycles biogéochimiques d'éléments inorganiques tels que le phosphore, le soufre ou l'azote des écosystèmes terrestres (Plante, 2007 ; van der Heijden et al., 2008). En étroite relation avec les systèmes racinaires (symbiose), ils participent à la croissance des plantes. Par ailleurs, ils jouent un rôle important dans la structure et la pédogenèse des sols et dans les échanges d'énergie avec les autres compartiments de l'environnement (**Figure I.2**).

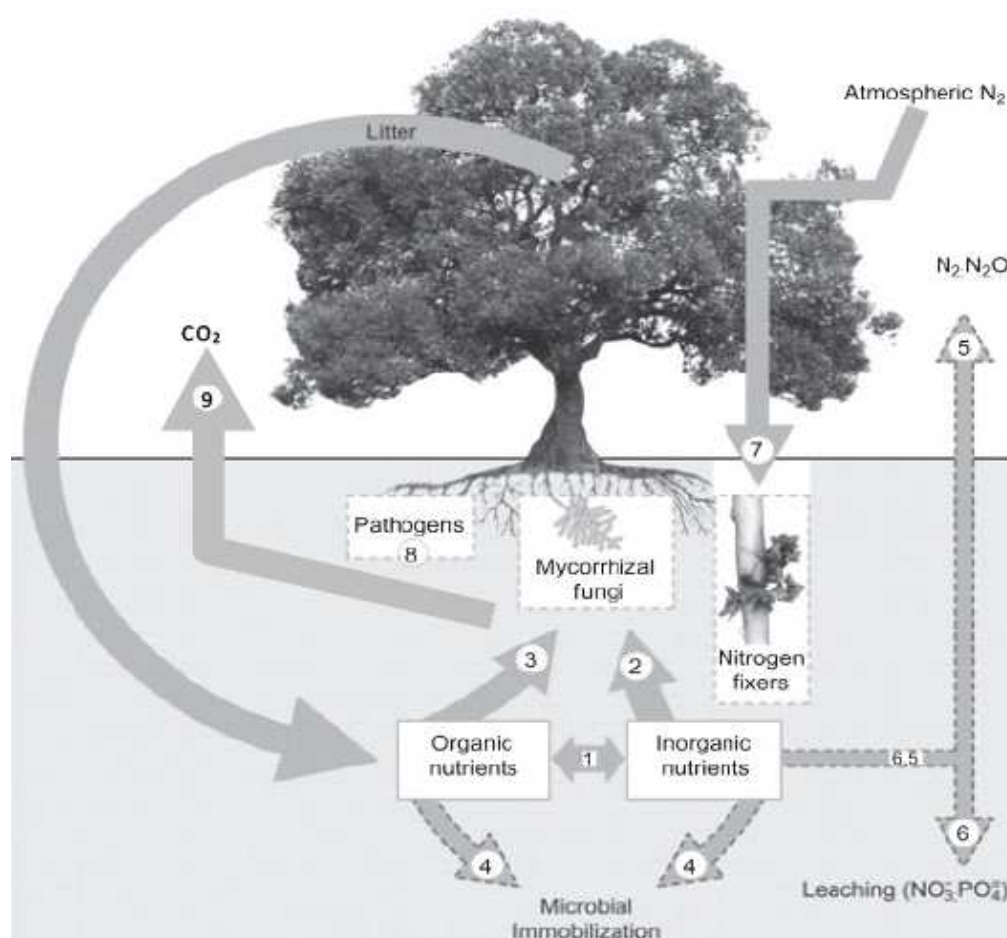


Figure I.2. Représentation schématique du rôle des microorganismes dans les sols (issu de van der Heijden et al., 2008) :

- 1) Décomposition et transformation de la matière organique et des nutriments
- 2, 3) Réallocation positive des ressources vers les plantes
- 4) Séquestration négative des ressources dans la biomasse ou la matière organique récalcitrante
- 5, 6) Diminution des ressources par volatilisation ou par lessivage (transformation de l'azote)
- 7) Fixation de l'azote atmosphérique par des microorganismes
- 8) Diminution de la productivité des plantes par des agents pathogènes
- 9) Emission de CO₂ due à la respiration des microorganismes

1.2. Menaces anthropiques sur les sols cultivés

Les sols subissent plusieurs menaces (tassement, érosion, perte de matière organique...) dues à des stress physiques, chimiques et biologiques, qui modifient alors leurs structures et leurs fonctionnements (Lal, 1997). Outre ces dégradations d'origine naturelle, les sols sont directement menacés par les activités anthropiques : surexploitations agricoles, amendements de déchets, apports de composés chimiques, pollutions... Les sols agricoles et notamment les sols cultivés, sont par conséquent les écosystèmes terrestres les plus soumis aux pressions anthropiques.

1.2.1. Usages et pratiques agricoles

En France, la surface agricole utile occupe près de 30 millions d'hectares, soit près de 50% du territoire. L'agriculture conditionne donc amplement le cycle des ressources naturelles, la biodiversité et le paysage. L'usage intensif et les pratiques agricoles accélèrent fortement les processus de dégradation des sols (Pierce & Larson, 1993 ; Gianfreda & Bollag, 1996 ; Smith & Collins, 2007 ; Morvan et al., 2008) :

- Le remplacement d'une végétation primitive par des monocultures conduit à des modifications de l'humus et de la formation des sols
- Les surexploitations contribuent à diminuer les teneurs en matière organique et en nutriments
- L'apport de composés chimiques peut engendrer des acidifications ou salinisations des sols
- Le travail excessif (labour) déstructure les sols et favorise leur érosion hydrique et/ou éolienne
- Le surpâturage, l'utilisation d'engins et les amendements excessifs participent activement au tassement des sols (compaction) en diminuant notamment leur porosité.

Ainsi, ces pratiques modifient les propriétés physico-chimiques et structurales intrinsèques des sols et par conséquent, la composition de la biocénose, moteur de leur fonctionnement biologique. L'impact de ces pratiques sur la qualité des sols se traduit généralement par une diminution de la biodiversité, de la productivité et de la fertilité. Heureusement, cette dégradation d'origine anthropique n'est pas irréversible. L'apport de

fumier ou de compost limite la diminution de la matière organique, élément important dans la durabilité des sols. Les rotations de cultures favorisent le maintien de la biodiversité (Smith & Collins, 2007). Cependant, la compaction est un phénomène plus problématique. En effet, elle a un impact négatif direct et durable sur les caractéristiques hydrologiques (imperméabilisation des sols) et sur l'activité biologique due à une asphyxie des organismes vivants.

Outre ces menaces identifiées par la Commission Européenne (European Commission, 2002 et 2006 ; Morvan et al., 2008), la contamination des sols agricoles constitue également une préoccupation récente et croissante qui se traduit par des impacts économiques, sanitaires et environnementaux négatifs.

1.2.2. Contamination des sols cultivés

Contaminant et polluant sont couramment employés pour désigner une accumulation anormale de composés dans l'environnement suite à des apports anthropiques. La contamination se définit par une augmentation de teneurs totales en composés sans préjuger d'une évolution négative sur la qualité du sol. En revanche, le terme de pollution est utilisé lorsque les composés s'accumulent à des quantités délétères pour les organismes vivants ou affectant la qualité du sol (Chassin et al., 1996). Le terme xénobiotique est parfois utilisé à la place de celui de polluant, lorsque la substance est étrangère au monde du vivant.

Une grande variété de contaminants organiques, regroupée sous le terme de composés traces organiques ou CTO, est retrouvée dans les sols (Jacobsen et al., 2005 ; Ramade, 2007^b ; Topp et al., 2008 ; Xu et al., 2008) :

- Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)
- Polychlorobiphényles (PCB)
- Pesticides
- Dioxines
- Dérivés de détergent (nonyphénol,...)
- Plastifiants (phtalates)
- Produits pharmaceutiques (hormones, antibiotiques,...)

Les sols sont contaminés par des CTO mais aussi par des métaux via différentes voies liées aux activités anthropiques. Les pratiques agricoles constituent une source majeure de contamination directe et diffuse des sols lors d'apports d'engrais, d'utilisation de pesticides ou bien d'amendement de déchets organiques (Ramade, 2007^b). Ainsi, les boues d'épuration étant issues des eaux usées (industries, hôpitaux, domestiques) concentrent différents contaminants métalliques (Cd, Pb, Hg...) et organiques comme les pesticides (atrazine, glyphosate, diuron...) ou les produits pharmaceutiques (Gaultier et al., 2003 ; Topp et al., 2005 ; Ghanem et al., 2007). Actuellement, des seuils d'épandage imposent des limites de teneur en contaminants. Par ailleurs, l'irrigation par des eaux usées peut être une source potentielle de contamination. Les composés émis par les industries, les métallurgies, les combustions fossiles... atteignent les sols agricoles par retombées atmosphériques (Ramade, 2007^b). Par exemple, certains contaminants organiques sont ainsi incriminés tels que les composés volatils : les HAP, les dioxines...

Fort heureusement, une grande partie des CTO est potentiellement dégradable par des facteurs abiotiques (UV, température,...). En outre, la plupart d'entre eux est dégradée par les microorganismes du sol (Mougin, 2002 ; Gianfreda & Bollag, 2002 ; Bouseba et al., 2009 ; Uhnakova et al., 2009). Ainsi, leurs concentrations dans l'environnement tendent à décliner dans le temps. En revanche, les métaux sont plus problématiques. Contrairement aux contaminants organiques, les métaux ne sont pas biodégradables et sont susceptibles de s'accumuler dans les horizons de surface (Chassin et al., 1996 ; van Gestel, 2008).

1.2.3. Cas des éléments traces métalliques

Les éléments traces métalliques ou ETM sont libérés naturellement à partir des fonds géochimiques à de faibles quantités dans l'environnement. Cependant, les activités anthropiques et notamment les procédés industriels et agricoles sont à l'origine d'une surproduction de métaux, d'un changement de leur spéciation (i.e. transformation en formes chimiques plus mobilisables) et de leur répartition. Ainsi, ces activités conduisent à une contamination diffuse et irréversible à long terme, risquant de compromettre la fertilité et la qualité des sols agricoles (Chassin et al., 1996 ; Ramade, 2007^b). Outre ces contaminations diffuses peut s'ajouter un apport de proximité par les exploitations industrielles, les métallurgies ... menant à des contaminations locales, voire à d'importantes pollutions (cas de Métaleurop au nord de la France dont le site est considéré comme le plus pollué d'Europe).

Dans ce mémoire, nous nous intéresserons plus particulièrement au Cu, Zn, Pb et Cd, qui sont les principaux métaux retrouvés dans les sols d'agrosystèmes (Ramade, 2007^c ; Zheljazkov et al., 2008). Le Cu et le Zn sont des oligo-éléments et donc nécessaires aux réactions enzymatiques à l'origine des fonctions biologiques des organismes vivants (Tyler, 1981). A l'inverse, leur apport excessif a des effets toxiques sur les organismes du sol. Les déchets agricoles et urbains, et la protection des cultures constituent des sources majeures de contamination des sols par ces éléments essentiels. C'est le cas du Cu qui est utilisé depuis plusieurs dizaines d'années dans la bouillie bordelaise pour lutter contre les parasites ou le « mildiou » (**Figure I.3**). Ainsi les sols de vignobles, soit près d'un million d'hectare en France, ont des teneurs élevées en Cu (au delà de 500 ppm ou mg/kg de sol), limitant dans certains cas l'activité microbienne et diminuant alors la fertilité du sol pour toute autre culture.

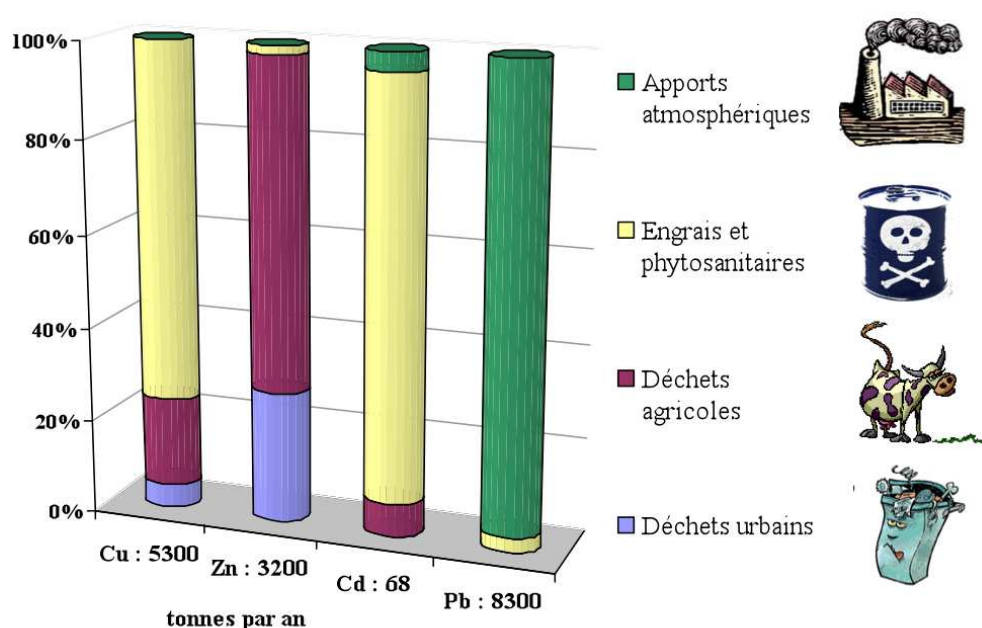


Figure I.3. Estimation des apports annuels des principaux métaux sur les sols agricoles en France (reproduit d'après Ramade, 2007^c)

Le Pb et le Cd n'ont pas de rôle biologique connu. Considérés comme néfastes, ils entraînent des effets biologiques délétères à de faibles concentrations (Tyler, 1981). Le Pb contamine les sols principalement par retombées atmosphériques dues aux combustions. L'utilisation de fertilisants, comme les engrais phosphorés, contiennent des teneurs non négligeables en métaux (**Figure I.3**). Elle constitue d'ailleurs un intrant majeur pour le Cd (Nziguheba & Smolders, 2008).

Il faut souligner que la dynamique des ETM dans l'environnement dépend de leur spéciation (i.e. de leur forme chimique) et des caractéristiques intrinsèques des sols. La matière organique du sol est connue pour sa réactivité vis-à-vis des métaux, tels que le Cu et le Pb. Les ETM peuvent également être complexés avec l'argile et/ou adsorbés avec les hydroxydes de fer, comme le Zn (Tyler, 1981 ; Labanowski et al., 2007 et 2008). Les quantités de métaux transférées verticalement vers les eaux souterraines, ou lixiviées, sont par conséquent très faibles dans la plupart des sols (Chassin et al., 1996). Ainsi, les métaux sont surtout abondants dans les horizons de surface riches en biomasse.

1.3. Conséquences de la contamination des sols cultivés

Selon Crosby (1982), 90% des contaminants seraient actuellement localisés dans les sols. En effet, les CTO tels que les pesticides, généralement hydrophobes, ont tendance à se fixer à la matière organique et/ou interagir avec la biomasse du sol (Loiseau & Barriuso, 2002 ; Kollmann et al., 2003). De plus, les fractions organiques et minérales du sol sont connues pour complexer les ETM (Labanowski et al., 2007 et 2008). Le sol constitue donc un accumulateur de contaminants et de ce fait participe à leur dissémination passive dans les autres compartiments de l'environnement : la biosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère.

1.3.1. Santé humaine

La contamination des sols n'est pas sans risque pour la santé humaine (Abrahams, 2002). Un transfert de contaminants peut se faire par contact direct avec le sol ou par ingestion (agriculteurs, enfants,...). Elle est rare mais surtout vraie pour les composés organiques très lipophiles capables de traverser la peau. Suite à des phénomènes de ruissellement ou de lixiviation, les eaux souterraines et de surface destinées à la consommation peuvent être contaminées. La culture de végétaux sur un sol pollué conduit à leur contamination. En effet, en étroite liaison avec les microorganismes du sol, les plantes absorbent certains CTO (PCB, dioxines,...) et les ETM (Gobat et al., 2003^c ; van Gestel 2008). Le Cd et le Pb sont alors retrouvés à des teneurs élevées dans les céréales cultivées sur des sols contaminés (Chassin et al., 1996). Cette bioabsorption concourt à un phénomène de bioaccumulation dans les réseaux trophiques. En entrant dans sa chaîne alimentaire, l'homme peut alors incorporer des toxiques à des concentrations non négligeables. De même, ce phénomène est retrouvé pour les pâturages ou les élevages consommant des plantes, des

céréales ou des foins contaminés, contribuant à un transfert animal/homme. Les enjeux sanitaires sont alors ceux d'une alimentation en eau potable et en aliments « sains ».

Bien que la contamination des sols ne semble pas avoir d'effets toxiques aigus chez l'homme, elle contribue à une exposition chronique à certains contaminants. Généralement, de faibles expositions à des xénobiotiques, à long terme, induisent des effets cancérogènes, voire tératogènes. Ces risques sanitaires sont d'autant plus vrais pour les CTO persistants ou les contaminants non dégradables comme les ETM. Le Pb est connu pour être neurotoxique chez l'homme (saturnisme). Le Cd entraîne une néphrotoxicité et est également suspecté d'être un perturbateur endocrinien chez l'homme. De nombreux pesticides sont pareillement incriminés pour avoir des effets reprotoxiques (les organochlorés,...). Par exemple, le DDT est dosable dans l'ensemble des populations occidentales bien qu'il soit interdit depuis 1971 (Ramade, 2007^d).

1.3.2. Effets des contaminants sur les écosystèmes terrestres

L'accumulation de contaminants dans les horizons de surface des sols est susceptible de perturber la biocénose et par conséquent le fonctionnement biologique des sols. De façon générale, la réponse de la biocénose à un stress chimique se traduit par (Ramade, 2007^e) :

- une diminution de l'abondance des espèces
- une diminution de la biodiversité
- un raccourcissement des chaînes trophiques
- une diminution de l'efficacité de l'utilisation des ressources

Ainsi, ces phénomènes concourent à une diminution de la productivité des écosystèmes terrestres et à des perturbations des cycles biogéochimiques.

La spéciation des métaux conditionne leur mobilité et par conséquent, leur biodisponibilité (i.e. leur accessibilité aux organismes vivants). Dans les sols, cette biodisponibilité dépend de paramètres physico-chimiques (pH, matière organique, température,...) et biologiques. En effet, la réactivité des organismes vis-à-vis des métaux diffère d'une espèce à une autre (Sun et al., 2006 ; van Gestel, 2008). En général, la forme libre ou ionique est la plus toxique. Ainsi, les métaux associés ou non à des particules et mobilisés dans la solution du sol, sont en contact direct avec les organismes telluriques.

Les microorganismes réagissent vite et avec une grande sensibilité à une exposition métallique de par leur cycle de vie véloce et leur forte activité métabolique au sein des écosystèmes terrestres. Les impacts métalliques peuvent se traduire par une diminution de la biodiversité, de la biomasse et des fonctions microbiennes ce qui affecte les processus environnementaux (Kandeler et al., 1996 ; Lorenz et al., 2006 ; Sun et al., 2006). Par exemple, le Cd et le Pb présentent une forte toxicité pour la biomasse et modifient les activités microbiennes (Vig et al., 2003 ; Tuomela et al., 2005). Laguerre et al. (2006) ont montré que même un stress modéré à un oligo-élément comme le Cu conduit à des effets sur les populations de sols agricoles. Ainsi, l'exposition des microorganismes à des métaux peut déplacer l'équilibre des communautés vers une microflore résistante et donc engendrer des modifications fonctionnelles et structurales des sols, voire *in fine*, de l'écosystème en entier. Cependant, les mécanismes d'actions des métaux sur les microorganismes et leurs effets écotoxicologiques sur le fonctionnement des sols sont encore mal connus.

En résumé : Les sols d'agrosystèmes sont soumis à différents stress physiques (usages et pratiques agricoles) et chimiques (amendements et contaminations). L'impact de ces stress sur la qualité du sol se manifeste par un déclin de la productivité et de la fertilité d'un point de vue agronomique, et par une diminution de la biodiversité et de son implication dans les processus environnementaux d'un point de vue écologique.

2. Evaluer l'écotoxicité dans les sols

Les perturbations liées aux activités agricoles et à la contamination des sols sont maintenant bien connues et induisent des enjeux économiques, environnementaux et sanitaires. Ainsi, la gestion durable et la préservation des fonctions des sols sont devenues des priorités pour de nombreux pays européens (Blum et al., 2004 ; Morvan et al., 2008). De ce fait, il est nécessaire de développer des outils sensibles, rapides et fiables pour évaluer l'impact écotoxicologique des perturbations physiques et chimiques sur les agrosystèmes en se basant sur des critères de qualité utilisables par la réglementation et la législation.

2.1. L'écotoxicologie, des approches multiples à différentes échelles

L'écotoxicologie étudie :

- les émissions et les entrées des contaminants, leur distribution et leur devenir dans l'environnement
- l'entrée et le devenir des contaminants dans le compartiment biologique (bioaccumulation, chaînes trophiques...)
- les effets toxiques (quantitatifs et qualitatifs) de composés chimiques à différents niveaux d'organisation biologique : moléculaire, cellulaire, individu, population, communauté et écosystème (**Figure I.4**).

Les approches en laboratoire (*in vitro*) permettent certes d'avoir une grande répliquabilité et de renseigner sur la toxicité des substances chimiques, mais sont généralement peu significatives sur leur impact écologique à des niveaux d'organisation biologique supérieurs. Les approches dans des conditions naturelles (*in situ*) sont bien plus réalistes, mais la répliquabilité est faible de par la complexité des niveaux d'organisation écologique et par la multitude d'échelles spatiotemporelles. Ainsi, l'effet potentiel de tout stress chimique ou physique sur un écosystème est souvent difficile à évaluer (Ramade, 2007^a).

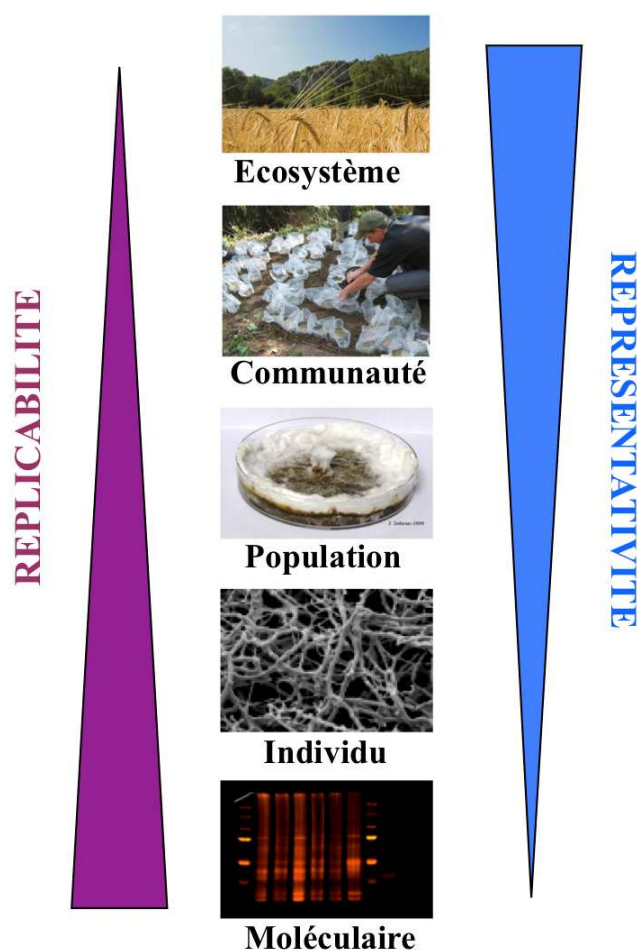


Figure I.4. Les différents niveaux de complexité biologique concernant les approches expérimentales en écotoxicologie.

2.1.1. Limites des approches physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques (pH, salinité, texture, composition, porosité...) sont indispensables pour caractériser le milieu terrestre et font partie intégrante des programmes de biosurveillance de l'état des sols. Par exemple, la détermination de la matière organique (d'un point de vue quantitatif et qualitatif) dans les sols est importante car elle conditionne la durabilité des écosystèmes et contribue au maintien de la qualité des agrosystèmes (Lagomarsino et al., 2009). De la même manière, le dosage du carbone et de l'azote total reflète la richesse nutritive des sols. Par ailleurs, ces approches permettent également de déterminer le niveau de contamination des sols (Morvan et al., 2008). Cependant, elles renseignent le plus souvent sur des teneurs totales en contaminants et ne permettent pas d'évaluer l'impact réel des formes actives et biodisponibles sur les organismes vivants (Sun et al., 2006 ; van Gestel, 2008).

Il est également possible de doser le carbone extrait de la biomasse microbienne (Wu et al., 1990). Des variations du taux de carbone microbien ont été observées suite à des changements de systèmes culturaux, à des fertilisations ou à des pollutions (Harden et al., 1993 ; Ritz et al., 1997 ; McCarty & Meisinger, 1997). Dans le cas d'une contamination métallique, le ratio du carbone microbien sur le carbone total du sol est un index plus fiable que ces deux paramètres pris indépendamment pour évaluer l'effet des métaux (Kandeler et al., 1996). Cette approche facilement utilisable en routine et sensible à des stressors physiques et chimiques est alors très utilisée comme indicateur de biosurveillance de la qualité des sols dans de nombreux programmes européens (Winding et al., 2005).

Cependant, les approches physico-chimiques ne permettent pas d'apporter d'informations sur la biodiversité (composition et abondance des différentes communautés telluriques) ni d'établir la « qualité biologique » des sols. Pour appréhender ces aspects il est préférable d'étudier le compartiment biocénotique (Morvan et al., 2008 ; Laval et al., 2009).

2.1.2. Développement d'outils biologiques

Ces dernières années, l'écotoxicologie connaît un essor qui conduit au développement accru d'outils biologiques pour évaluer l'état de santé de l'environnement. Ces outils s'appuient sur les niveaux d'organisation biologique (**Figure I.5**).

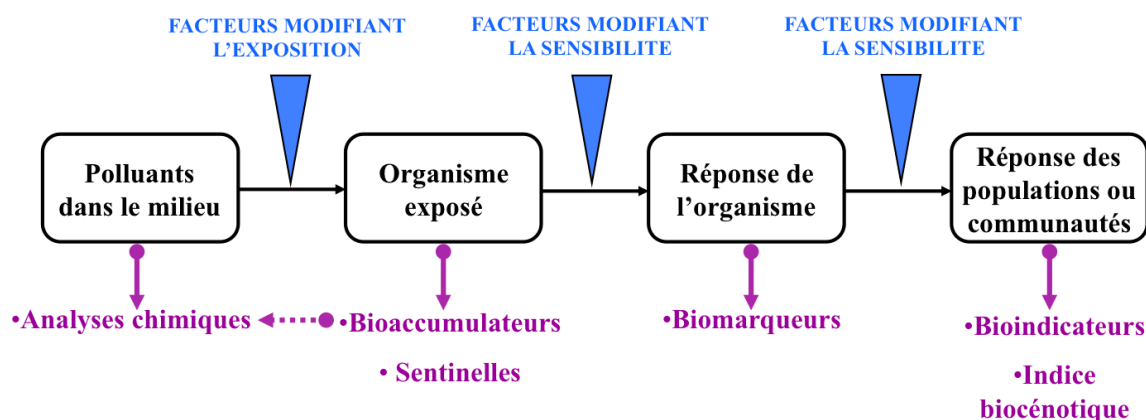


Figure I.5. Méthodologies d'évaluation des événements écotoxicologiques (reproduit d'après Ramade, 2007^f)

Les indices biocénotiques, surtout utilisés en milieu aquatique, renseignent sur la diversité des populations et des communautés. Le déplacement de l'équilibre communautaire

témoigne alors d'un évènement écotoxicologique. Dans les sols, les populations de lombrics sont parfois utilisées comme indice global de la qualité des sols. Par ailleurs, certaines espèces sont utilisées comme bioindicateurs et donnent des informations sur les conditions environnementales. Ainsi, les lichens étant fortement sensibles aux teneurs de SO₂ sont de bons bioindicateurs de la pollution atmosphérique. De même, les mousses sont des bioindicateurs des contaminations métalliques (Cd, Pb...). Les bioaccumulateurs capables d'accumuler des composés chimiques dans leur matière vivante permettent de suivre la contamination environnementale. Par exemple, les mollusques bivalves tels que les huîtres ou les moules, accumulent des ETM et des CTO en filtrant l'eau. Finalement, l'exposition des organismes à un ou plusieurs contaminants conduit à des réponses physiologiques, biochimiques ou comportementales, lesquelles sont parfois utilisées comme biomarqueurs d'exposition. Ces biomarqueurs sont des systèmes d'alarme précoces. L'hypersécrétion ou l'inhibition de molécules de défense comme les cytochromes P450 sont souvent utilisées pour évaluer le degré d'exposition des peuplements aquatiques à divers contaminants (Ramade, 2007^f).

Actuellement, ces outils biologiques sont essentiellement développés pour les écosystèmes aquatiques. De ce fait, et contrairement aux compartiments aquatiques et aériens, il existe peu de méthodes disponibles pour évaluer l'état de santé des sols. C'est notamment le cas des méthodes normalisées utilisables par les entreprises (bureaux d'étude...) et les pouvoirs publics (consultation de la base de données de l'ISO ; Morvan et al., 2008).

2.1.3. Difficultés rencontrées en écotoxicologie des sols

Dans les sols, l'écotoxicologie se heurte à différents problèmes :

- i) Le sol est un milieu poreux triphasique et une matrice bien plus complexe et hétérogène que l'air ou l'eau. L'incorporation de contaminants dans les sols met en jeu un ensemble de mécanismes et de processus encore mal appréciés : distribution, accumulation, migration, fraction biodisponible et toxique des contaminants... ce qui limite la capacité de prédire leurs devenir et leurs impacts écotoxicologiques.
- ii) L'évaluation des impacts écotoxicologiques est bien souvent réalisée en laboratoire avec des sols artificiels (milieux homogènes) ne reflétant pas la variabilité spatiotemporelle des paramètres biogéochimiques ni la structuration des sols à l'échelle de la parcelle.

- iii) Il existe des facteurs de confusion agissant sur le fonctionnement des sols comme leur usage. De plus, les sols agricoles sont soumis à une contamination multiple à faibles doses, mais aussi à des contraintes culturales. Les pratiques culturales et l'usage des sols peuvent modifier les propriétés intrinsèques de l'habitat des organismes vivants, et par conséquent leur réponse aux contaminants.
- iv) De par les connaissances limitées sur la biodiversité des sols, le choix des modèles biologiques reste à être démontré tant pour leurs pertinences écologiques que pour leurs réponses aux contaminants.

2.2. Apport de l'écologie microbienne à l'écotoxicologie

De par sa grande sensibilité aux perturbations et par son implication dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres, le compartiment microbien constitue un compartiment de choix dans le développement d'outils pour évaluer l'état de santé des sols (Joergensen & Emmerling, 2006 ; Kandeler, 2007 ; Laval et al., 2009). Les caractéristiques microbiennes mesurables sont alors souvent utilisées comme des indicateurs potentiels de la qualité des sols, même si cette qualité dépend d'un ensemble de propriétés physiques, chimiques et biologiques. En ce sens, la connaissance de la diversité structurelle et des fonctions assurées par les communautés telluriques (synthèse et sécrétion de protéines) permettent d'accéder à la qualité biologique des sols et aux propriétés résultantes : fertilité, stabilité de la structure, dynamique des éléments nutritifs...

2.2.1. Les outils moléculaires, accès à la diversité structurelle

Traditionnellement, la diversité microbienne était appréhendée par l'isolement et le dénombrement de souches cultivables (Nannipieri et al., 2003). Cependant, plus de 90% des souches telluriques ne sont pas cultivables. De plus, cette technique est sélective, ce qui conduit à l'isolement de souches non représentatives de la diversité microbienne. L'essor des outils moléculaires au cours de ces dernières décennies a permis le développement de nouvelles stratégies basées sur l'analyse des ARN ou ADN issus d'échantillons de sol, contribuant ainsi à améliorer nos connaissances en écologie microbienne (**Figure I.6**). Ces avancées en biologie moléculaire permettent de s'affranchir de la sélectivité engendrée par l'isolement de souches cultivables et ainsi, d'accéder à une plus grande fraction des communautés microbiennes.

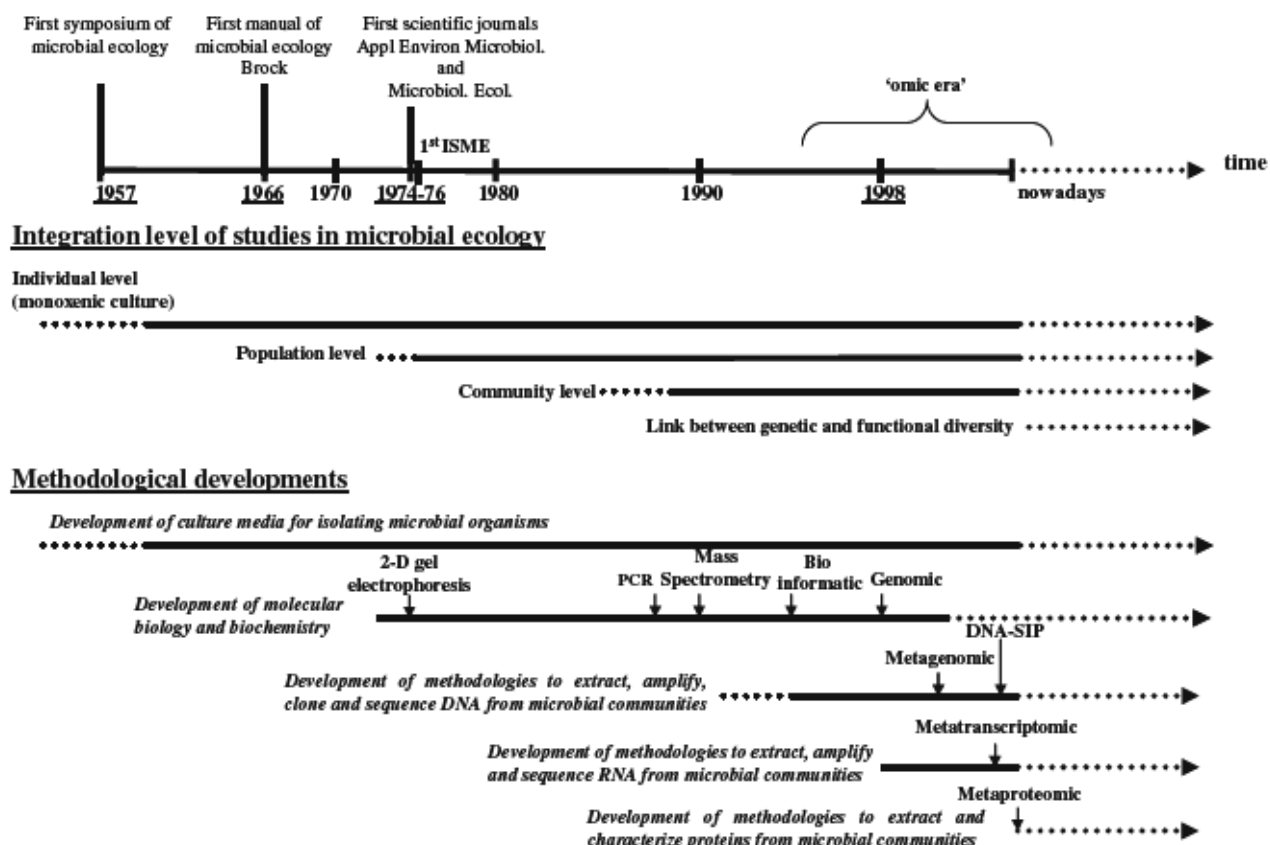


Figure I.6. Evolution historique de l'écologie microbienne (issu de Maron et al., 2007^a)

Après extraction de l'ADN du sol et amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de séquences cibles d'intérêt, les fragments amplifiés sont séparés selon leur taille ou leur composition en bases (Ranjard et al., 2000). Les empreintes génétiques électrophorétiques ainsi obtenus, renseignent sur la structure et la diversité génétique des communautés microbiennes (Nannipieri et al., 2003 ; Rodriguez-Valera, 2004). Par ailleurs, l'analyse des métagénomomes ou des métatranscriptomes permettent de suivre l'impact de contaminants sur la biodiversité génétique et d'identifier des populations préférentiellement associées à des perturbations environnementales (Ranjard et al., 2000 ; Martin-Laurent et al., 2003 ; Maron et al., 2007^a ; Anderson et al., 2008). Toutefois, elle ne donne pas de notion de richesse ni d'abondance des communautés. Ces approches moléculaires possèdent également des limites liées à la difficulté d'extraire de façon exhaustive l'ADN du sol et à l'amplification des séquences choisies.

2.2.2. Vers la diversité fonctionnelle

Les techniques moléculaires apportent des informations sur un potentiel génétique mais ne permettent pas d'évaluer l'expression du potentiel fonctionnel. En effet, elles ont permis d'identifier de nombreux gènes microbiens, mais l'importance écologique de ces gènes reste encore largement inconnu. Par ailleurs, il est difficile de quantifier l'expression de ces gènes par les microorganismes dans les sols. Zhou & Thompson (2002) ont montré qu'il n'y avait aucune corrélation entre les niveaux d'ARN produits et les protéines synthétisées.

Actuellement, un intérêt particulier est apporté à la compréhension de la relation entre la diversité génétique microbienne et leurs fonctions (**Figure I.7**). Comme les protéines et plus précisément les enzymes sont impliquées dans les processus de biotransformation, elles constituent une voie précieuse pour caractériser les dynamiques des fonctions microbiennes. Ainsi, l'écologie microbienne s'oriente vers des approches fonctionnelles par analyse des métaprotéomes ou des métabolomes (Rodriguez-Valera, 2004 ; Maron et al., 2007^a).

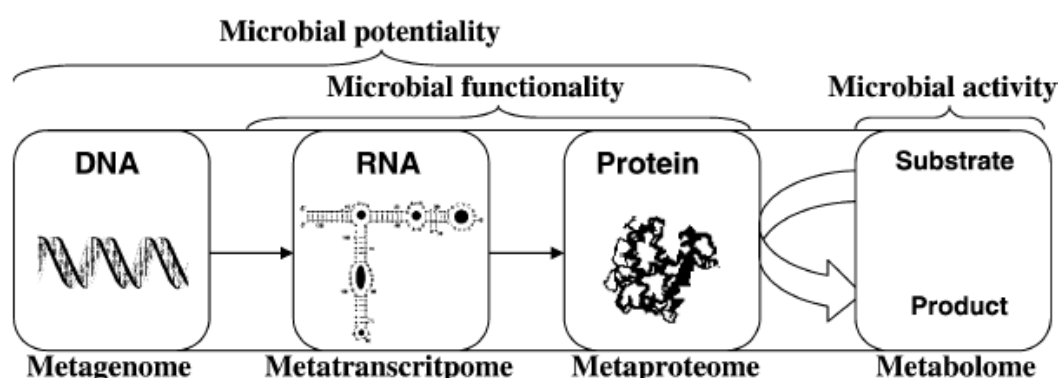


Figure I.7. Représentation schématique des différents niveaux d'étude dans l'écologie des communautés microbiennes (issu de Maron et al., 2007^a).

Maron et al. (2007^a) suggère que les approches protéomiques pourraient être utilisées pour accéder à la diversité fonctionnelle des communautés telluriques dans différentes situations environnementales. Selon la stratégie expérimentale proposée en **Figure I.8**, elles devraient permettre :

- i) d'identifier de nouveaux gènes fonctionnels et voies métaboliques
- ii) d'identifier des protéines préférentiellement associées à des stress spécifiques.

L'étape la plus cruciale est l'extraction qualitative et quantitative des protéines à partir d'échantillons environnementaux. Cependant, il est connu que les protéines sont étroitement liées aux colloïdes du sol. A ce jour, aucune méthode ne permet d'extraire efficacement les protéines et d'obtenir des échantillons représentatifs des pools protéiques présents dans les sols. Une stratégie alternative et indirecte est envisageable en analysant les pools protéiques à partir d'organismes isolés de la matrice environnementale. Ainsi, Maron et al. (2007^b) montrent que la pollution de l'eau par le Cd et le Hg modifie les pools protéiques de bactéries indigènes, et donc leur diversité fonctionnelle.

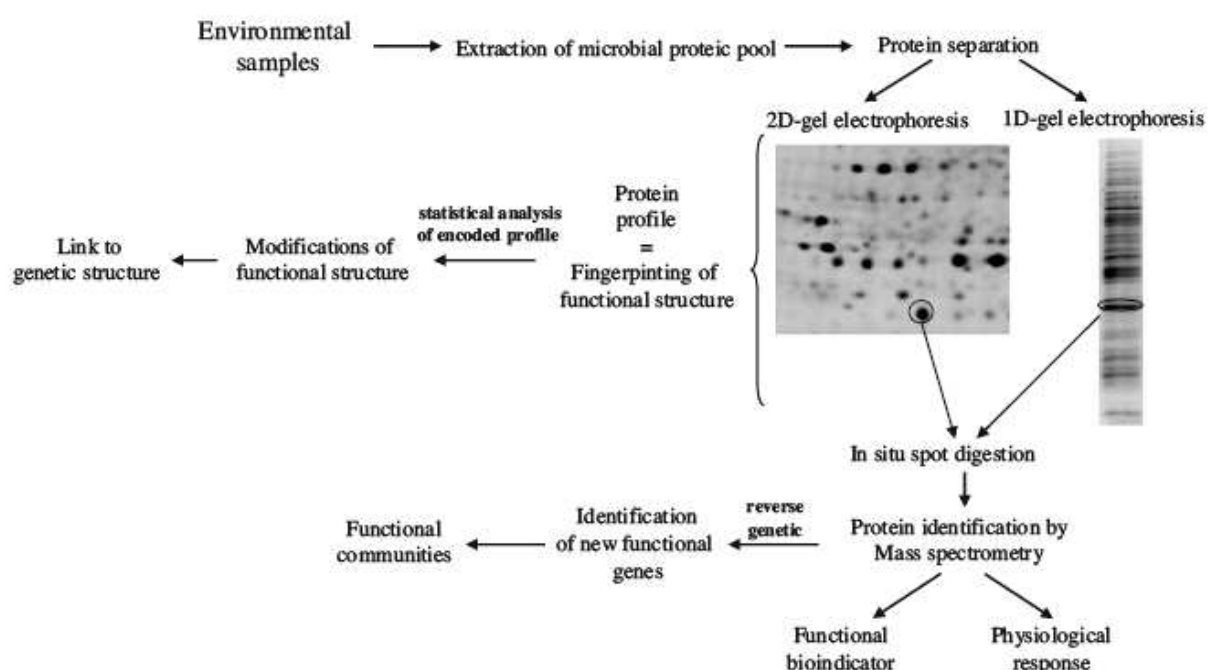


Figure I.8. Stratégie expérimentale et sorties possibles de la caractérisation du métaprotéome (issu de Maron et al., 2007^a)

En résumé : Contrairement à l'eau et à l'air, l'écotoxicologie est en peine dans l'élaboration d'outils, notamment biologiques, pour évaluer l'état de santé des sols. L'appréhension de la diversité fonctionnelle des microorganismes devrait contribuer à améliorer nos connaissances sur leur implication dans les processus environnementaux et pourrait être un indicateur d'écotoxicité dans les sols.

CHAPITRE II

Biodiversité fonctionnelle comme indicateur d'écotoxicité dans les sols

1. Enzymes du sol, indicateurs fonctionnels de son état de santé ?

Tous les systèmes vivants renferment une grande variété d'enzymes intervenant dans des réseaux complexes de réactions chimiques à la base de la vie, les métabolismes. Il existe une grande similitude entre les enzymes retrouvées dans les sols et celles des autres systèmes vivants, jusqu'aux plus complexes tels que l'homme. Ainsi, le sol doit être considéré comme un « tissu vivant ».

Les activités enzymatiques jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des sols et dans la transformation de l'énergie. Impliquées dans les processus biochimiques d'intérêt agronomique, les enzymes sont souvent utilisées pour estimer la qualité et la fertilité des sols. Il a été montré que ces activités fournissent des réponses rapides aux perturbations naturelles et anthropiques (Gianfreda & Bollag, 1996 ; Nannipieri et al., 2002 ; Gianfreda et al., 2005). Puisque les enzymes reflètent la structure et les fonctions des communautés microbiennes, elles pourraient être considérées comme un outil intégratif pour évaluer l'état de santé ainsi que les impacts anthropiques sur le fonctionnement biologique des sols (Dick et al., 1996 ; Nannipieri et al., 2003 ; Laval et al., 2009).

1.1. Acteurs des processus biochimiques des sols

Les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions chimiques spécifiques. Elles interviennent par exemple dans la minéralisation de différents polymères d'origine végétale (cellulose, lignine...) ou animale (chitine), le processus d'humification, la respiration et sont étroitement impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du phosphore ou du soufre. De ce fait, elles sont des acteurs clés dans les processus biochimiques des écosystèmes terrestres (Tabatabaï & Dick, 2002). Outre ces aspects fonctionnels, certaines activités enzymatiques sont également à la base de la transformation de contaminants organiques, participant ainsi à la diminution de la contamination terrestre (Gianfreda & Bollag, 2002).

Approximativement, une centaine d'activités enzymatiques a été identifiée dans les sols (Tabatabaï & Dick, 2002). Cependant, il est vraisemblable que la connaissance de cette diversité fonctionnelle est encore limitée en vue de la diversité génétique de la biocénose tellurique et des connaissances actuelles en enzymologie du sol. Quatre familles d'enzymes sont distinguées selon la spécificité du type de réaction qu'elles catalysent : les oxydoréductases (E.C.1), les transférases (E.C.2), les hydrolases (E.C.3) et les lyases (E.C.4). D'après la littérature, les activités les plus communément mesurées dans les sols sont généralement des hydrolases.

Tableau II.1. Exemples d'hydrolases impliquées dans les cycles biogéochimiques des sols

Elément	Enzyme	E.C.*	Fonction	Référence
Carbone	β -glucosidase	3.2.1.21	Hydrolyse de la cellobiose	Eivazi & Tabatabaï (1988)
	β -galactosidase	3.2.1.23	Hydrolyse de disaccharides	Eivazi & Tabatabaï (1988)
	N-acétyl- β -glucosaminidase	3.2.1.30	Hydrolyse de la chitobiose	Schaefer (1963)
Phosphore	Phosphatase acide	3.1.3.2	Hydrolyse des phosphoesters	Tabatabaï & Bremner (1969)
	Phosphatase alcaline	3.1.3.1	Hydrolyse des phosphoesters	Tabatabaï & Bremner (1969)
Azote	Uréease	3.5.1.5	Hydrolyse de l'urée	Kandeler & Gebber (1988)
Soufre	Aryl-sulfatase	3.1.6.1	Hydrolyse des sulfoesters	Tabatabaï & Bremner (1970)

E.C. (Enzyme commission) : Nomenclature des enzymes de l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire

Les activités hydrolases que nous avons considéré dans nos études, sont présentées dans le **Tableau II.1** (Laval et al., 2009 ; **Chapitre III**). L'activité déshydrogénase (E.C.1.1) est souvent utilisée comme indicateur global de l'activité microbienne intervenant dans l'oxydation de la matière organique et dans le métabolisme respiratoire des microorganismes (Schaefer, 1963 ; Trevors, 1984).

1.2. Origine et localisation des enzymes dans les sols

Les enzymes du sol sont d'origine animale, végétale ou microbienne. Il faut distinguer deux catégories d'enzymes : les enzymes intracellulaires et extracellulaires. Les enzymes intracellulaires sont localisées dans le compartiment cellulaire des organismes vivants et sont impliquées dans leurs métabolismes intracellulaires. Les enzymes extracellulaires sont activement sécrétées dans l'environnement (Tabatabaï & Dick, 2002 ; Nannipieri et al., 2003). Bien que certaines enzymes soient sécrétées par les systèmes racinaires des plantes, elles sont essentiellement d'origine bactérienne et fongique. Les enzymes extracellulaires sont indispensables à la survie de ces organismes en hydrolysant des polymères et des substrats

« inaccessibles », i.e. piégés dans les micropores des sols. Ces composés sont alors transformés en substrats simples (oligomères, monomères,...) et sont transportés à travers les membranes (Quiquampoix et al., 2002 ; Seiboth et al., 2005). Par ailleurs, cette digestion extracellulaire microbienne rend la matière organique et les nutriments accessibles à d'autres organismes comme les plantes, et contribue à la productivité primaire des écosystèmes terrestres (van der Heijden et al., 2008).

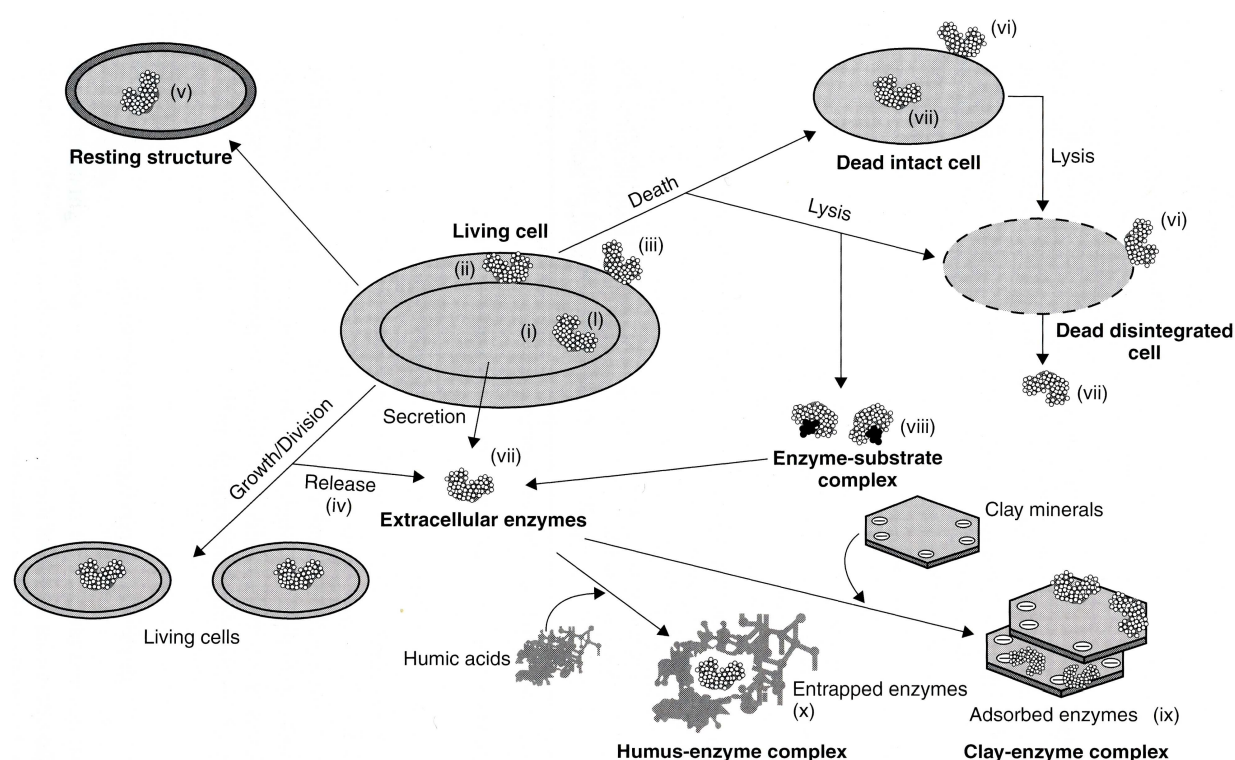


Figure II.1. Localisation des enzymes dans les sols (issu de Kandeler et al., 2007) :

- i. Enzymes intracellulaires
- ii. Enzymes membranaires
- iii. Enzymes attachées à la surface des membranes cellulaires
- iv. Enzymes relarguées au cours de la croissance et de la division cellulaire
- v. Enzymes retrouvées dans les spores ou graines
- vi. Enzymes attachées aux cellules mortes ou débris cellulaires
- vii. Enzymes extracellulaires sécrétées ou libérées lors de la lyse cellulaire
- viii. Enzymes complexées à leurs substrats
- ix. Enzymes adsorbées aux argiles ou aux colloïdes minéraux
- x. Enzymes complexées avec les colloïdes humiques

Il est à noter que les enzymes retrouvées dans l'environnement sont généralement associées aux colloïdes argileux et humiques ce qui leur confère une résistance aux facteurs abiotiques et biotiques (**Figure II.1**). Cette association évite leur dénaturation sous l'action des variations physico-chimiques des sols (pH, température,...) et prolonge leur temps de

demi-vie. De même, les enzymes sont moins exposées à l'action des protéases des sols. Cependant, cette étroite association des enzymes avec les colloïdes rend très difficile leur extraction et leur purification à partir d'échantillons de sol. En effet, d'autres phénomènes sont mis en jeu que de simples liaisons hydrogènes ou ioniques, comme des liaisons covalentes ou des séquestrations dans des agrégats particuliers (Gianfreda & Bollag, 1996 ; Nannipieri et al., 2002 ; Huang et al., 2005).

1.3. Variabilité des activités enzymatiques

Bien que la complexation des enzymes avec les colloïdes du sol favorisent leur stabilité et leur persistance, elle engendre des changements conformationnels des protéines et modifie leurs activités spécifiques (Ahn et al., 2000 ; Quiquampoix et al., 2002). Par ailleurs, il est connu que les niveaux d'activités enzymatiques dépendent des variations d'expression de gènes et sont affectées par des facteurs environnementaux (Nannipieri et al., 2002 ; Kandeler, 2007).

Les activités enzymatiques sont maximales dans les horizons de surface où la présence de la matière organique est la plus abondante. Ceci est à corrélérer avec la densité et la diversité des microorganismes (Eivazi & Tabatabaï, 1990 ; Frey, 2007). Par ailleurs, la distribution des enzymes est liée à la structure hétérogène et poreuse des sols. Cette structure constitue des niches écologiques ou microhabitats pour les microorganismes sécrétant alors une grande variété d'enzymes (Nannipieri et al., 2003). Outre ces fluctuations d'activités dans l'espace, les activités enzymatiques sont également sensibles aux variations temporelles et climatiques. Elles sont en effet affectées par l'humidité et la température, et par conséquent fluctuent en fonction des cycles saisonniers (Gianfreda & Bollag, 1996 ; Criquet et al., 2002). La sécrétion des enzymes par les microorganismes, eux-mêmes sensibles aux variations climatiques, dépend de l'expression de gènes. Cette régulation est bien souvent liée aux besoins des microorganismes et à la disponibilité des éléments nutritifs, lesquels agissent sur l'induction et la répression de gènes (**Figure II.2**).

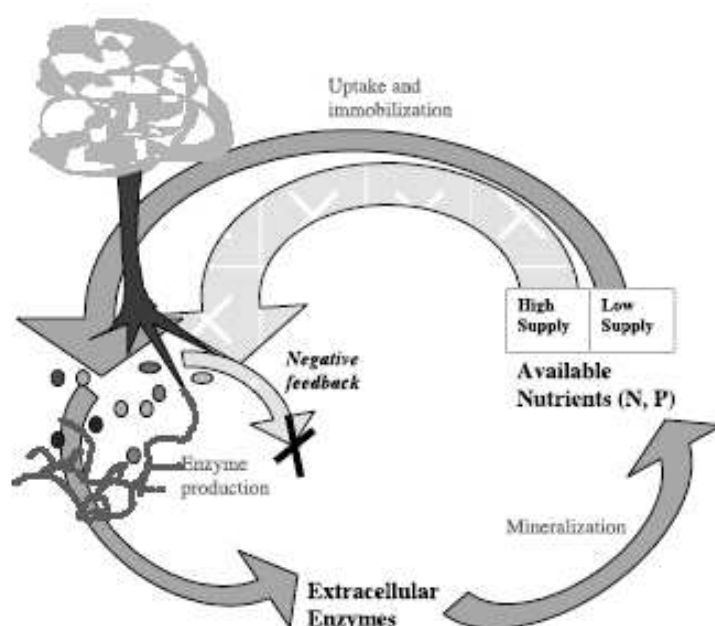


Figure II.2. Régulation des activités enzymatiques par les stocks de nutriments (issu de Olander & Vitousek, 2000) :

- Lorsque les stocks sont faibles, il y a une induction de la production des enzymes impliquées dans la minéralisation des nutriments
- Lorsque les stocks sont élevés, il y a un feedback négatif conduisant à la suppression de la production enzymatique

1.4. Activités enzymatiques et perturbations anthropiques

Actuellement, il n'existe aucune méthode permettant d'extraire efficacement l'ensemble des enzymes du sol sous forme de pools protéiques. De ce fait, les activités enzymatiques sont mesurées directement à partir d'échantillons de sols. Les protocoles de mesures mettant en œuvre des méthodes spectrophotométriques ou de fluorescence, sont généralement simples et sensible, mais fastidieux à réaliser sur de grandes séries d'échantillons de sols (Tabatabaï & Dick, 2002 ; Kandeler, 2007).

Les mesures d'activités enzymatiques sont aussi utilisées pour évaluer les impacts anthropiques sur les sols d'agrosystèmes. Des études ont montré que l'utilisation des sols (prairie, grandes cultures,...), les pratiques culturales (amendements, fertilisations,...) et les pollutions peuvent modifier les activités enzymatiques (Nannipieri et al., 2002 ; Gianfreda et al., 2005). Dans le cas d'une contamination métallique, il est généralement observé une diminution des activités hydrolases (Eivazi & Tabatabaï, 1990 ; Kandeler, 1996). Cependant, la diversité des méthodes utilisées (échantillons de sols, cosmes de sols tamisés ou non...) et

des contextes dans lesquels ont été réalisées ces études d'impact sur les sols, rend difficile l'interprétation des résultats en vue de l'établissement d'un référentiel de qualité des sols (Kennedy & Gewin, 1997 ; Laval et al., 2009).

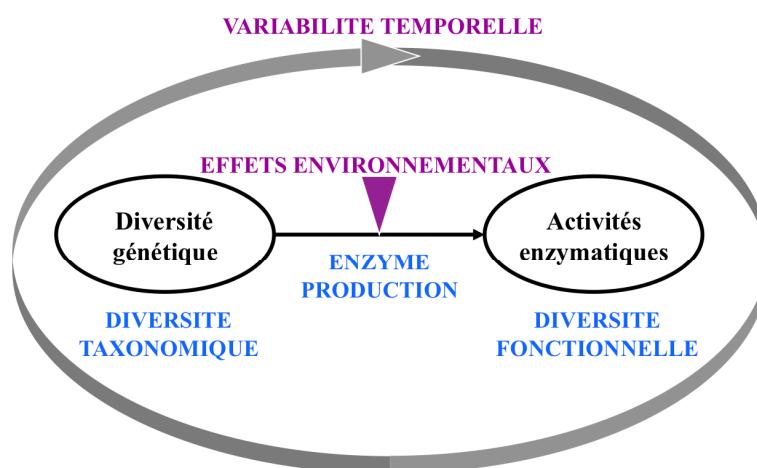


Figure II.3. Relation schématique entre la diversité génétique et les activités enzymatiques sous l'influence de différents facteurs (adapté d'après Nannipieri et al., 2002)

En résumé : Les activités enzymatiques semblent être des indicateurs fonctionnels de la qualité et de l'impact de perturbations physiques et chimiques sur les sols. Il est indispensable de prendre en considération leurs variations spatiotemporelles et l'effet de facteurs environnementaux sur ces activités, lesquels pourraient masquer l'impact réel des impacts anthropiques. Cependant, les enzymes du sol permettent d'appréhender des processus métaboliques dans leur ensemble sans donner d'informations sur les espèces activement impliquées. De ce fait, la relation entre la diversité microbienne et l'expression de ses fonctions reste encore très mal connue (Figure II.3).

2. Enzymes fongiques, biomarqueurs d'exposition aux métaux ?

Parmi les microorganismes telluriques, les champignons filamenteux représentent la principale biomasse et sont ubiquistes dans les sols. Il est estimé que la biomasse fongique dans les sols excède la biomasse de tous les organismes telluriques combinés, excepté les racines (**Figure I.1** ; Thorn & Lynch, 2007). Par ailleurs, ce sont des organismes très résistants aux stress environnementaux (pH, température, pollution,...). Ce sont donc des modèles biologiques intéressants dans le développement d'outils pour évaluer l'écotoxicité de contaminants dans les sols.

Contrairement à celle des bactéries, la diversité fonctionnelle fongique a été peu étudiée. Pourtant, ces organismes disposent d'un vaste système enzymatique extracellulaire (Kjoller & Struwe, 2002). Par ailleurs, les mécanismes de régulation de la sécrétion du système enzymatique, qui peuvent être sensibles à l'action de contaminants, sont peu documentés. L'amélioration de nos connaissances concernant la diversité fonctionnelle fongique devrait contribuer à une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes terrestres. Par ailleurs, l'étude de la réponse des sécrétomes fongiques (i.e. de l'ensemble des protéines sécrétées) aux contaminants pourrait fournir des biomarqueurs d'exposition (Maron et al., 2007^a).

2.1. Les champignons du sol

Les champignons sont des organismes eucaryotes hétérotrophes, dépourvus de chlorophylles et constituent un règne propre. Les champignons peuvent disposer d'une partie aérienne appelée sporophore mais ils se caractérisent surtout par une importante partie végétative souterraine, le mycélium. Celui-ci est composé d'un ensemble de cellules filamenteuses plus ou moins ramifiées, les hyphes. Ces cellules expansives et flexibles permettent aux champignons d'explorer l'environnement pour se nourrir ou accéder à d'autres ressources. En effet, les hyphes ont la capacité de pénétrer différents solides comme les cellules vivantes, les litières, les bois ou les sols. Ils sont le siège d'une activité métabolique importante et assurent des fonctions vitales à la croissance fongique : sécrétion d'enzymes et absorption de nutriments. Grâce à leur grande capacité de biosynthèse et de biocatalyse, les champignons sont alors des colonisateurs clés de niches écologiques terrestres (Baldrian, 2003 ; Thorn & Lynch, 2007).

2.1.1. Rôle écologique

Les champignons jouent un rôle central dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote car ils sont capables de dégrader des substrats complexes essentiellement issus des plantes (Kjoller & Struwe, 2002 ; Thorn & Lynch, 2007). Ce sont des décomposeurs de la matière organique tout comme les bactéries. Cependant, contrairement à ces dernières, ils interviennent dans les étapes initiales de la dégradation de polymères bruts. Ainsi, les champignons sont les meilleurs dégradeurs potentiels de la cellulose, polymère le plus abondant sur terre (Baldrian & Valaskova, 2008). Grâce à leur système enzymatique oxydatif, ce sont les décomposeurs prédominants de la lignine, polymère récalcitrant dans l'environnement (Baldrian, 2003 ; Bouws et al., 2008). De par leur fonctionnalité, les champignons sont alors à la base de nombreux réseaux trophiques dans les écosystèmes terrestres. Par ailleurs, ils participent à la décontamination des sols grâce à leur capacité à dégrader certains contaminants organiques (Gianfreda & Bollag, 2002 ; Mougin, 2002).

Etant hétérotrophes, les champignons doivent trouver le carbone nécessaire à leur développement. Ils sont ainsi distingués selon trois modes de nutrition :

- **Saprophytisme** : les champignons se nourrissent de la matière organique morte ou en décomposition (feuilles mortes, débris végétaux ou animaux,...)
- **Symbiose** : les champignons vivent avec des organismes autotrophes comme les algues pour former les lichens, ou bien les plantes. Cette symbiose avec le système racinaire des plantes est appelée mycorhize et permet alors des échanges de nutriments et d'énergie bénéfiques pour les deux organismes. Ils jouent donc un rôle important dans la croissance des plantes.
- **Parasitisme** : ces champignons colonisent et exploitent la matière vivante. Ainsi, ils sont souvent pathogènes pour leurs hôtes.

2.1.2. Taxonomie

Le règne des mycètes appelés plus communément champignons, est représenté par cinq divisions : les Chytridiomycètes, les Glomeromycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes. Cette classification est basée essentiellement sur leur cycle biologique et notamment sur leur mode de sporulation (Lutzoni et al., 2004 ; Thorn & Lynch, 2007).

Les Chytridiomycètes, champignons unicellulaires et généralement aquatiques, produisent des spores flagellées et peuvent être retrouvées dans les sols. Ils sont considérés comme les ancêtres de tous les champignons. Classés auparavant chez les Zygomycètes, les Glomeromycètes constituent maintenant une division à part. Ce sont des champignons mychoriziens, vivant en symbiose avec les racines d'un grand nombre de plantes. Malgré leur grand intérêt écologique, uniquement une centaine d'espèces est décrite à ce jour. Les Zygomycètes essentiellement représentés par les Mucorales produisent des spores non flagellées appelées les zygospores. Les Basidiomycètes regroupant environ plus de 30 000 espèces connues se caractérisent par leurs cellules spécialisées, les basides, où se développent les spores. Les Ascomycètes comportent le plus grand nombre d'espèces connues. Ils expulsent des asques qui sont des sacs renfermant des spores. La plupart des levures connues appartiennent à cette division.

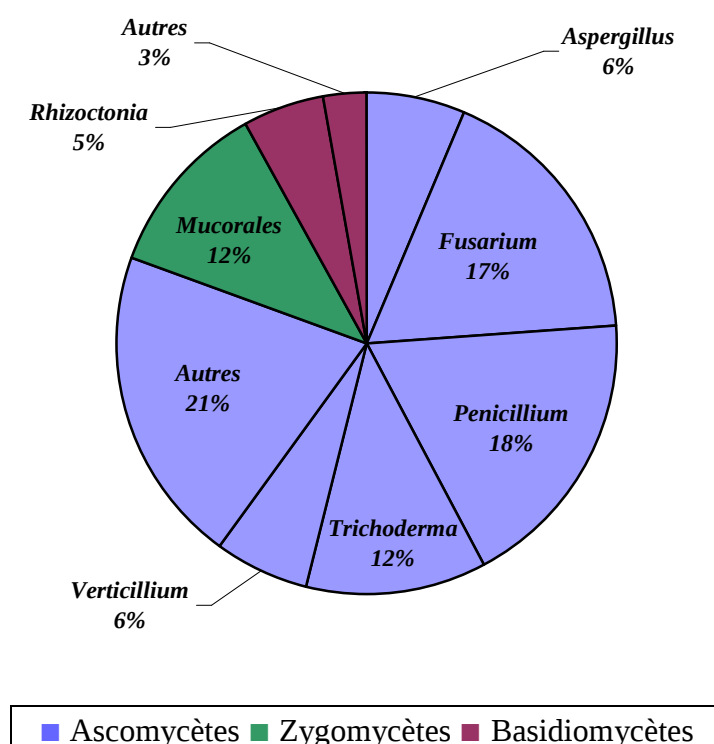


Figure II.4. Estimation de la fréquence d'isolement de souches fongiques à partir de sols. (Viaud et al., 2000 ; van Elsas et al., 2000 ; Kwasna et al., 2000 ; Peculyte, 2001 ; Kjoller & Struwe, 2002 ; Deacon et al., 2006 ; Lynch & Thorn, 2007 ; Wu et al., 2008 ; Zinger et al., 2008 ; Collection MIAE de l'INRA de Dijon)

La synthèse de plusieurs études d'isolement de souches fongiques à partir de sols cultivés combinée à la mycothèque élaborée par l'INRA de Dijon a permis d'estimer les souches les plus fréquemment isolées des sols (**Figure II.4**). Les champignons telluriques

sont représentés en grande partie par les Ascomycètes (80 %). Les principaux genres retrouvés sont :

- les *Fusarium*, les *Verticillium* et les *Trichoderma* dont certaines espèces sont connues comme phytopathogènes
- les *Aspergillus* et les *Penicillium* dont certaines espèces sont très utilisées à des fins industrielles et pharmaceutiques (synthèse d'enzymes, d'antibiotiques,...).

Les Zygomycètes isolés des sols sont essentiellement représentés par l'ordre des Mucorales avec les principaux genres suivants : les *Mucors*, les *Rhizopus*, les *Mortierella*,... Ces saprophytes très répandus ont une croissance très rapide et une grande capacité à sporuler. Ils sont de ce fait considérés comme faisant parti des champignons les plus efficaces de la biosphère. Finalement, les Basidiomycètes les plus fréquemment isolés des sols cultivés sont du genre *Rhizoctonia*, appelé aussi *Thanatephorus* selon le stade de reproduction. Certaines espèces sont bien connues dans les mycorhizes et sont des phytopathogènes opportunistes (Lutzoni et al., 2004 ; Thorn & Lynch, 2007).

2.1.3. Diversité fonctionnelle

Grâce à leur capacité à s'adapter à différentes sources de carbone et d'azote, les champignons sécrètent un vaste équipement enzymatique capable de mobiliser et de minéraliser différents polymères naturels et d'autres composés tels que des contaminants organiques (Kjoller & Struwe, 2002 ; Bouws et al., 2008). Lors de cultures liquides, les champignons ont notamment été étudiés pour leur activité ligninocellulolytique. Ainsi, des activités β -glucosidases ou cellulases impliquées dans la dégradation de la cellulose ont été mesurées chez des Ascomycètes tel qu'*Aspergillus oryzae* ou chez des Basidiomycètes tels que *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporum*, *Irpex lacteus* ou *Trametes versicolor* (Di Nardo et al., 2004 ; Baldrian et al., 2006 ; Fragoeiro & Magan, 2005 ; Oda et al., 2006). Ces basidiomycètes ont notamment été très étudiés pour leur capacité à synthétiser des oxydoréductases de type ligninolytique, telles que les laccases (E.C. 1.10.3.2), les lignine-peroxydases (E.C. 1.11.1.14) ou les Mn-peroxydases (E.C. 1.11.1.13). Les lignin- et Mn-peroxydases sont des enzymes contenant un hème avec un atome de Fe et sont H₂O₂-dépendantes. Le Mn joue un rôle de cofacteur pour les Mn-peroxydases. Les laccases dont la structure a été caractérisée par cristallographie chez *T. versicolor* (Bertrand et al., 2002^a), sont des enzymes dont le pouvoir catalytique est médié par des atomes de Cu (**Figure II.5**).

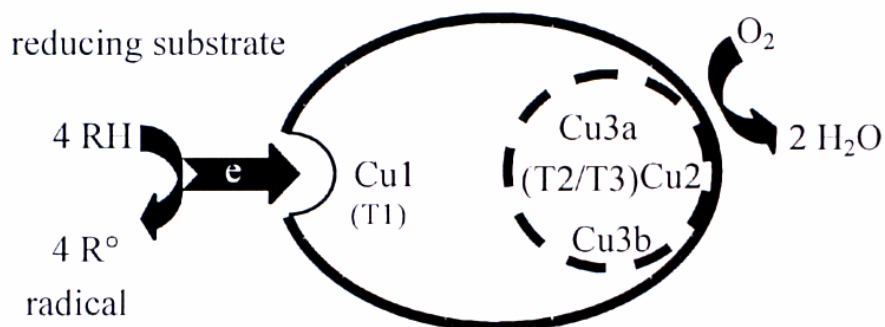


Figure II.5. Mécanisme d'action des laccases fongiques : T correspond à un site contenant un ou deux atomes de Cu. T1 extrait un électron du substrat réduit et T2/T3 forme un centre trinucléaire où l' O_2 est réduit (issu de Bertrand et al., 2002^a).

Bien que le rôle premier de ces oxydoréductases soit de dégrader les matériaux ligninocellulosiques, ce set enzymatique présente des intérêts industriels et environnementaux. Pour leur propriété oxydante, les oxydoréductases sont très utilisées en industries (papier, textile,...). Par ailleurs, ces enzymes peu spécifiques dégradent une grande variété de contaminants organiques : bromophénols, HAP, arylamines... (Mougins et al., 2002 ; Cajthaml et al., 2008 ; Uhnakova et al., 2009). Grâce à ces propriétés de biotransformation, les oxydoréductases ont été suggérées comme des outils potentiels de bioremédiation des eaux et des sols. Cependant, les enzymes doivent être fixées à un support afin d'améliorer leur stabilité et donc leur activité enzymatique (Ahn et al., 2000 ; Mougins et al., 2003 ; Ikehata et al., 2004).

Depuis une dizaine d'année, les avancées méthodologiques en électrophorèse et en spectrométrie de masse ont permis l'émergence de l'étude de la composition des sécrétomes fongiques (Kim et al., 2007). Ces études protéomiques donnent accès à des profils d'expression fonctionnelle dans différentes conditions. Ainsi, il a été montré que la sécrétion fongique varie selon le type de substrat (liquide ou solide), la source de carbone ou lors de stress salins (Oda et al., 2006 ; Gori et al., 2006 ; Liang et al., 2007 Sato et al., 2007). Par ailleurs, bien qu'un grand nombre de protéines extracellulaires restent à être identifiées, cette approche a permis de caractériser différentes hydrolases impliquées dans la dégradation de la cellulose ou la chitine, protéases et peptidases, métalloprotéines, estérases, lipases et oxydoréductases ligninolytiques (Bouws et al., 2008).

Ainsi, ces outils protéomiques contribuent à améliorer nos connaissances sur le système enzymatique extracellulaire des champignons et sur ses implications dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres. Malgré ces investigations, la diversité fonctionnelle et sa régulation dans des conditions naturelles ou de stress chimiques restent encore limitées chez les champignons telluriques.

2.2. Traits fongiques comme biomarqueurs d'exposition aux contaminants

Un trait est une caractéristique morphologique, biochimique ou physiologique mesurable au niveau de l'individu sans référence à l'environnement ou un autre niveau d'organisation (Violle et al., 2007). Chez les champignons, les traits physiologiques les plus étudiés sont la croissance, la survie, la sporulation, la production enzymatique,... L'effet de contaminants sur ces traits peut conduire à des réponses caractéristiques et de ce fait, faire l'objet de développement de biomarqueurs d'exposition.

Récemment, la volonté de développer des méthodes plus sensibles et plus rapides que les tests classiques de mortalité ou de reproduction a permis la mise en oeuvre du concept de biomarqueurs (Forbes et al., 2006). Selon van Gestel & van Brummelen (1996), un biomarqueur est un changement moléculaire, biochimique, physiologique ou morphologique spécifique constaté au niveau de l'individu. Cette réponse biologique indique un changement par rapport à l'état normal et n'est pas détectée chez un individu « sain ». Un biomarqueur représente donc une signature biologique d'une exposition persistante ou passée de l'organisme à un xénobiotique.

2.2.1. Interactions des métaux avec les champignons

Dans l'environnement, les champignons participent à la dynamique des ETM et modifient leur biodisponibilité en les piégeant ou en les solubilisant (Fomina et al., 2005^{a,b}). Ils sont également connus pour concentrer les métaux dans leurs mycéliums ce qui peut ralentir leur colonisation dans les sols et leur métabolisme (Gobat, 2003^c ; Baldrian, 2003 ; Tuomela et al., 2005). Les métaux essentiels (Cu, Zn, Fe,...) sont généralement absorbés par des transporteurs membranaires. Du fait de la faible spécificité de ces transporteurs, les métaux non essentiels (Cd, Pb,...) empruntent ces mêmes voies d'absorption. Par ailleurs, les

métaux peuvent s'adsorber sur les membranes. Chez les champignons, le stress métallique se manifeste par des altérations physiologiques, métaboliques et morphologiques (**Figure II.6**).

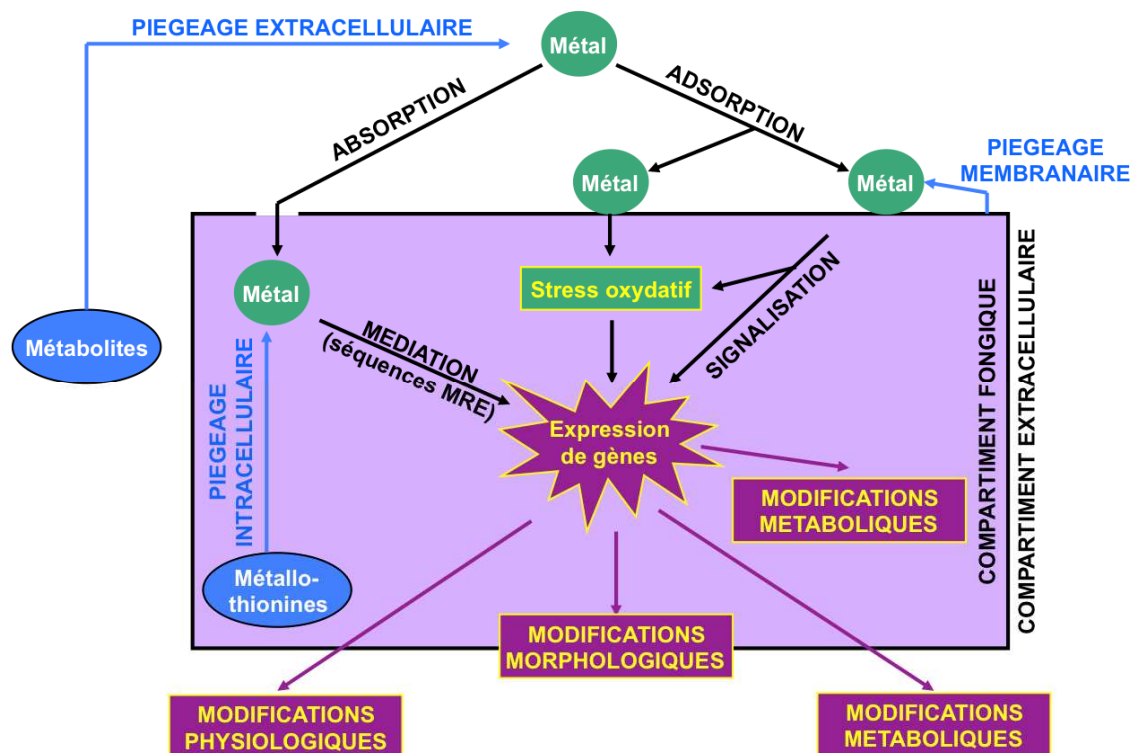


Figure II.6. Représentation schématique des différentes interactions entre les métaux et le compartiment fongique

Néanmoins, les champignons sont des organismes très résistants aux stress chimiques, disposant de différentes stratégies morphologiques (sclérotas, unification des filaments mycéliens,...) et de mécanismes de défense (Crowe & Olsson, 2001; Lundy et al., 2001 ; Fomina et al., 2005^{a,b}). Cette réponse adaptative s'exprime généralement par des modulations d'expression de gènes. Les mécanismes de tolérance fongique aux métaux sont souvent basés sur leur immobilisation par la synthèse de chélateurs, ce qui diminue leur biodisponibilité (Gadd, 1993 ; Jarocz-Wilkolazka et al., 2006). Ces mécanismes sont :

- La complexation intracellulaire par des métallothionines
- Le piégeage par des composés membranaires
- Le piégeage par la matrice extracellulaire de polysaccharides
- La chélation ou la précipitation extracellulaire par des métabolites sécrétés tels que des acides organiques (oxalates,...).

Bien que les mécanismes d'action ne soient pas bien connus, certaines réponses fongiques aux métaux ont été décrites dans la littérature (**Figure II.6**). Crowe et al. (2001) ont montré qu'un stress oxydatif s'accompagne d'une diminution de la biomasse fongique et déclenche différentes voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, cette signalisation conduit à une sclérotisation des filaments et une induction de laccases chez *Rhizoctonia solani*. Par ailleurs, il existe des séquences sensibles aux métaux, Metal Responsive Elements (ou MRE), qui agissent sur la régulation transcriptionnelle de gènes. De telles séquences sur des gènes codant pour des oxydoréductases ont ainsi été identifiées chez différents champignons comme *T. versicolor* ou *Pleurotus ostreatus* (Johansson & Nyman, 1996 ; Giardina et al., 1999).

2.2.2. Impacts des métaux sur les traits fongiques

Au niveau morphologique, les métaux provoquent bien souvent une perméabilisation et des changements dans la composition et la pigmentation membranaire (Baldrian, 2003). Il a été montré que le Cd provoque de sévères altérations morphologiques du mycélium contrairement au Cu lors de cultures liquides de *T. versicolor* (**Figure II.7**). Une altération de la structure du mycélium par le Cd a également été observée en microscopie chez *Daedalea quercina* (Gabriel et al., 1996). Cependant, ces observations qualitatives sont difficilement quantifiables, notamment dans des milieux complexes comme les sols.

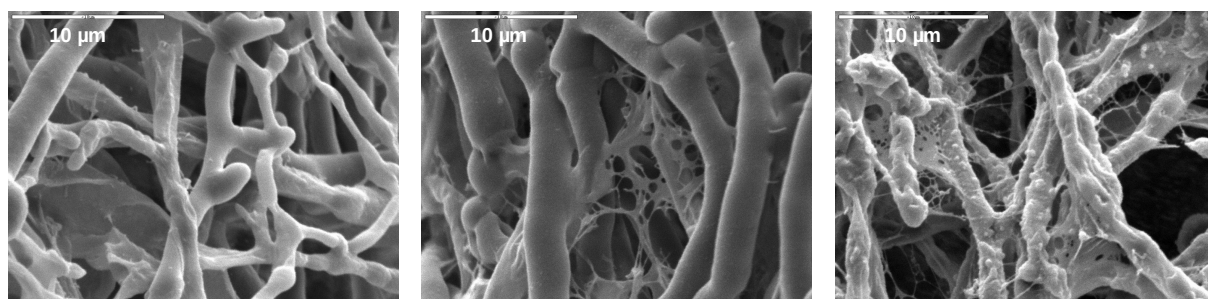


Figure II.7. Observations en microscopie électronique à balayage (X5000) du mycélium de *Trametes versicolor* exposé à 1 mM de Cu ou de Cd (Lebrun et al., 2007)

Au niveau physiologique, les métaux peuvent affecter la reproduction (maturation des spores, germination,...) et la croissance des champignons (Baldrian, 2003). Dans la littérature, ce dernier trait est souvent utilisé pour appréhender la toxicité des métaux. En effet, les métaux, en inhibant la croissance fongique, induisent une diminution de la production de biomasse. Ainsi, le Hg et le Cd sont généralement les plus toxiques. Bien que le Cu et le Zn soient des oligoéléments, le Cu présente des effets délétères à de bien plus faibles

concentrations que le Zn. Par ailleurs, la toxicité des métaux dépend également de leur spéciation et de la fenêtre d'exposition du champignon, i.e. sa phase de développement (Forbes et al., 2006 ; Sun et al., 2006 ; van Gestel, 2008).

Au niveau métabolique, les métaux peuvent affecter les activités et la production des enzymes intracellulaires et extracellulaires (Baldrian, 2003). Les métaux sont en général des inhibiteurs de réactions enzymatiques. En effet, en se fixant aux groupements thiols des protéines, ils répriment l'activité enzymatique. Par ailleurs, le Cu et le Cd sont connus pour leur capacité à se lier aux acides aminés aromatiques ce qui conduit alors à une oxydation des protéines. Les métaux peuvent également moduler la production des enzymes en agissant au niveau transcriptionnel (Collins & Dobson, 1997 ; Baldrian, 2003).

Il est clair que les interférences des ETM sur les processus physiologiques, enzymatiques et reproductifs des champignons ont des conséquences écologiques. La limitation de croissance ou de reproduction en présence de métaux conduit à des changements de communautés. Les effets métalliques sur les activités enzymatiques influencent les flux d'énergie dans les écosystèmes terrestres.

2.2.3. Réponses des enzymes fongiques aux contaminants

En raison du rôle important joué par les champignons filamenteux dans le fonctionnement du sol et de leur capacité à sécréter des enzymes extracellulaires, la connaissance de leurs réponses enzymatiques aux contaminants est une étape clé vers le développement de nouveaux biomarqueurs d'écotoxicité dans les sols.

Les ETM peuvent affecter les activités extracellulaires de type cellulolytique et ligninolytique lors de cultures de souches pures. Baldrian et al. (2005) ont montré que les hydrolases telles que la glucanase, la xylanase, la cellulase ou la β -glucosidase ont tendance à être inhibées par le Fe, Cu, Mn, Pb et Zn chez *Pleurotus ostreatus*. A l'inverse, certains de ces métaux stimulent l'activité laccase. La réponse des oxydoréductases aux métaux a été notamment étudiée chez les Basidiomycètes (Baldrian, 2003). Par exemple, le Mn joue un rôle important dans la régulation de l'expression des oxydoréductases de type ligninolytique chez *Phanerochaete chrysosporium* et le Cu dans l'expression des laccases chez *T. versicolor* ou *Rhizoctonia solani*. L'action du métal au niveau transcriptionnel s'explique par la présence

de séquences MRE. En effet, de telles séquences ont été identifiées sur un gène codant pour une laccase chez *Pleurotus ostreatus* et sur un cluster de gènes codant pour des Mn- et lignine peroxydases chez *T. versicolor* (Giardina et al., 1999 ; Johansson & Nyman, 1996). Ainsi, la stimulation de l'activité laccase par le Cu s'accompagne d'une augmentation de son ARNm chez *T. versicolor* (Collins & Dobson, 1997). Par ailleurs, il a été montré que certains CTO tels que des pesticides, des composés industriels et domestiques (nonylphénol, aniline, phtalates, organochlorés, HAP...) augmente la production de laccases extracellulaires chez *T. versicolor* (Mougin et al., 2002). Cela a été observé chez d'autres champignons filamenteux comme *Pleurotus eryngii* ou *Rhizoctonia solani* (Munoz et al., 1997 ; Crowe et al., 2001).

Les oxydoréductases fongiques sont parfois sécrétées sous plusieurs isoenzymes, lesquelles disposent de séquences différentes en acides aminés mais catalysent la même réaction chimique. Ainsi, des isoenzymes de Mn-peroxydases a été observées chez *Quercus ilex* (Di Nardo et al., 2004). De même, il existe quatre groupes phylogénétiques d'isoenzymes de laccases chez *T. versicolor* (Necochea et al., 2005). Les deux isoenzymes de laccases les plus connues et abondantes chez ce champignon sont dites de type A et de type B (Cassland & Jönsson, 1999). Lors d'exposition à des contaminants, il peut y avoir une stimulation préférentielle d'une isoenzyme donnée. Par exemple, la production de l'isoenzyme de type A ou LacA, est stimulée par la xylydine (une arylamine) chez *T. versicolor*. Par ailleurs, en présence de ce xénobiotique, cinq isoformes glycosylées de LacA ont été observées. Cette isoenzyme qui a été cristallisée présente en effet six sites de N-glycosylation possibles (Bertrand et al., 2002^a). La glycosylation est un processus post-traductionnel favorisant la stabilité et la résistance des protéines à la protéolyse. Cependant, de telles modifications post-traductionnelles restent à être démontrées dans le cas des métaux.

En résumé : La présence d'ETM dans l'environnement affecte le métabolisme extracellulaire des champignons. Il existe une réponse adaptative des enzymes fongiques à une exposition aux contaminants : modulations d'activités et d'expression de gènes, de production d'isoenzymes et d'isoformes glycosylées. Puisque les contaminants conduisent à des modifications fonctionnelles et post-traductionnelles, ces enzymes pourraient être utilisées comme biomarqueurs d'exposition pour évaluer l'état de santé des sols. En effet, des profils enzymatiques extracellulaires caractéristiques ou des formes particulières d'enzymes pourraient être reliés à une exposition à un métal ou à une famille de métaux.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE A : A l'échelle de l'écosystème et des communautés

La partie A concerne les expérimentations réalisées à l'échelle de l'écosystème et des communautés microbiennes. Les travaux présentés s'inscrivent dans un programme de recherche initié par l'ADEME en 2004 et nommé « Bioindicateurs de qualité des sols ». Afin d'identifier et de quantifier les perturbations, les transformations du sol et les impacts anthropiques sur les écosystèmes, ce programme vise à développer les recherches sur la composante biologique des sols pour compléter les outils physico-chimiques déjà disponibles (Bispo et al., 2009 ; Laval et al., 2009). Ainsi, divers indicateurs biologiques ont été évalués par plusieurs équipes au niveau national : diversité microbienne, composition des communautés, absorption des métaux par les organismes des sols, activités enzymatiques...

Dans les sols, les activités enzymatiques jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques. De ce fait, elles sont souvent utilisées comme indicateurs d'impact de composés chimiques sur les communautés microbiennes au niveau fonctionnel (Chapitre II.1). Néanmoins, ces activités peuvent être également sensibles aux pratiques agricoles, aux propriétés physico-chimiques des sols... (Nannipieri et al., 2002 ; Frey, 2007). Ces facteurs de confusion pourraient alors masquer l'effet réel d'un stress chimique sur les activités enzymatiques.

Ainsi, l'objectif du **Chapitre III** a été de répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'effet des facteurs environnementaux sur les activités enzymatiques globales du sol ?
- Est-ce que l'usage du sol affecte les activités enzymatiques et leur variabilité spatiotemporelle ?
- Est-ce que les activités enzymatiques globales sont des descripteurs d'une contamination métallique des sols ?
- Est-ce que les facteurs environnementaux et le travail du sol affectent la réponse des activités enzymatiques à un stress chimique ?

Nous avons choisi de mesurer un indicateur global de l'activité microbienne, la déshydrogénase (Trevors, 1984), ainsi que cinq activités hydrolases impliquées dans différents cycles biogéochimiques (P, C et N) : les phosphatases acide et alcaline, la N-acétyl- β -glucosaminidase, la β -glucosidase et l'uréase (**Tableau II.1** ; Lagomarsino et al., 2009). Les activités phosphatase acide et β -glucosidase sont souvent utilisées comme indicateurs des changements en qualité et en quantité de la matière organique (Gil-Sotres et al., 2005). L'activité N-acétyl- β -glucosaminidase joue un rôle important dans les cycles du C et du N car elle participe à la dégradation de la chitine en sucres aminés, qui sont une source majeure d'azote minéralisable dans les sols (Ekenler & Tabatabaï, 2002^a). Cette activité est par ailleurs considérée comme un indicateur indirect de la biomasse fongique (Miller et al., 1998).

Une des originalités de cette étude a été d'évaluer dans un premier temps la variabilité spatiotemporelle des activités enzymatiques sur deux sites localisés en Haute-Normandie, soumis à deux usages agricoles contrastés (prairie et grande culture). Dans un second temps, l'impact du Cu sur ces activités a été évalué en mettant en place des cosmes (écosystèmes terrestres miniaturisés) **de sols non déstructurés incubés à l'extérieur**. Ces conditions expérimentales se rapprochant alors des conditions de plein champ, constituent une approche originale par rapport aux études classiquement menées : incubation en laboratoire de cosmes remaniés (de sols tamisés) à température et à humidité contrôlées (Kennedy & Gewin, 1997 ; Taiwo & Oso, 1997 ; Martin-Laurent et al., 2003 ; Laval et al., 2009).

CHAPITRE III

Activités enzymatiques globales du sol, reflet des pratiques anthropiques ?

Article 1

« L'impact du cuivre sur les activités enzymatiques est plus faible que leur variabilité spatiotemporelle naturelle à l'échelle parcellaire »

Article soumis à *Applied Soil Ecology*

Copper impact on soil enzymatic activities is lower than their natural spatiotemporal variability at the plot scale

Authors

Jérémy D. Lebrun^{a,c}, Isabelle Trinsoutrot-Gattin^a, Marthe Vincelas-Akpa^b, Caroline Bailleul^a, Agathe Brault^c, Christian Mougin^c, Karine Laval^a

Affiliations

^a ESITPA, Laboratoire BioSol, 3 rue du Tronquet, BP 40118, 76134 Mont-Saint-Aignan cedex, France

^b Université de Rouen, UFR des Sciences et des Techniques, Laboratoire Ecodiv, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex, France

^c INRA, UPR 251 Physico-chimie et Ecotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés, Route de St Cyr RD 10, 78026 Versailles cedex, France

Corresponding author: Jérémy D. Lebrun
jlebrun@versailles.inra.fr

Résumé - Cette étude a pour but d'évaluer le potentiel des activités enzymatiques comme indicateurs de l'état du sol en vue de l'élaboration d'outils d'aide à la décision agronomique. Dans un premier temps, nous avons mesuré la variabilité spatiotemporelle des activités enzymatiques, qui sont les phosphatases acide et alcaline, la β -glucosidase, la N-acétyl- β -glucosaminidase, l'uréase et la déshydrogénase, au cours d'un cycle cultural. Deux sites (Yvetôt et S^t Georges-sur-Fontaine, localisés dans le nord-ouest de la France) et deux pratiques culturales contrastées (prairie et culture intensive) pour chaque site ont été considérés. Nos résultats ont montré une grande variabilité des activités enzymatiques dans l'espace et le temps, qui est plus élevée dans les prairies que dans les sols cultivés. Dans un second temps, nous avons évalué l'impact du cuivre à l'aide de cosmes incubés au champ pendant 70 jours. Une concentration agronomique (2 ppm) et une concentration correspondant à une forte contamination (100 fois plus élevée) ont été prises en compte. L'addition du cuivre ne cause pas d'impact significatif sur les activités testées par rapport à leur variabilité spatiotemporelle naturelle. Nous avons démontré la nécessité de prendre en compte la variation spatiotemporelle de descripteurs biologiques pour évaluer l'impact réel de contaminants dans des conditions agronomiques réalistes.

Mots-clés : prairie ; culture ; cosmes ; qualité des sols ; indicateurs enzymatiques

Abstract - This study aimed at assessing the potential of soil enzymatic activities to be indicators of soil state, in order to elaborate agronomic decision tools. Firstly, we measured the spatiotemporal variability of enzymatic activities, namely acid and alkaline phosphatases, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, urease and dehydrogenase, during a one year cultural cycle. Two sites (Yvetot and Saint Georges sur Fontaine, located in the north-west of France), and for each of them, two contrasted agricultural practices, were considered (grassland and intensive crop). Our results indicated a great variability of enzymatic activities according to space and time, greater in grassland plots than in cropland plots. Secondly, we assessed the impact of copper in Terrestrial Model Ecosystems (TMEs) incubated at the field during 70 days. Both an agronomic (2 ppm) and worst case (100-fold higher) concentrations of metals were taken into account. Copper addition did not result in a significant impact on enzymatic activities, when compared to their natural spatiotemporal variability. We demonstrated the high requirement to consider the spatiotemporal variation of the biological descriptors to assess the real impact of contaminants in realistic agronomic situations.

Keywords: grassland; crop; TMEs; soil quality; enzymatic indicators

1. Introduction

Soils are currently threatened by different types of degradation linked to agricultural overexploitation, industrial pollution, sewage sludge spreading... (Pierce & Larson, 1993; Gianfreda & Bollag, 1996). Soil use modifies the natural state which originates from the pedogeochemical background. Soils were first of all described by their physical and chemical components but these components are insufficient to learn about soil functioning. Thus, considerable research into soil biological quality has been undertaken in the last decades.

Among soil biological state indicators, enzymatic activities play an essential role in soil functions. Since enzymes reflect structure and function of microbial communities and, are key actors of biogeochemical cycles, they could be considered as an integrative tool. Moreover, it has been shown by different authors that enzymatic activity is able of rapid response to natural or anthropic changes (Nannipieri et al., 2002). Then, they should be of interest to evaluate the ecological functioning of soils and the anthropic impact (van Beelen & Doelman, 1997).

Copper is added to agricultural soil by two main ways. It is widely used in agricultural practices against fungal or bacterial pests. The regulated amount corresponds to 2 ppm for the superficial soil layer (0-10 cm) for one year. The organic waste spreading is also a potential source of metal contamination (Christie & Beattie, 1989; Madejon et al., 2001). Copper can then reach important amounts in agricultural soil, sometimes with values higher than the European limit of 100 ppm (Svenson, 1986; Alloway, 1995; Flores-Vélez et al., 1996).

Enzymatic activities are used to evaluate the impact of pollutants in soil but results are often incompatible with each others (Ranjard et al., 2006). Moreover, studies using soil enzymatic activities as indicators focus mostly on the impact of agricultural practices (Deng & Tabatabaï, 1997) or pollutants (Avidano et al., 2005; Ranjard et al., 2006) on their expression, considering a limited number of samples. Among these studies, few have, up to now, taken into account the spatial and temporal variability of the soil activities. This approach is, however, particularly important in the true evaluation of the impacts observed in the extremely contrasting systems. Furthermore, it is very difficult to compare the results of the studies because of the diversity of approach methods, soil type and experiment conditions. Many studies are carried out in controlled laboratory conditions and can not be extrapolated to

natural plot conditions. Although these studies provide data describing biological indicators, it is important to understand how molecules used in agriculture can affect the functioning of microbial communities in realistic conditions.

The elaboration of a soil biological quality index by statistical analysis needs the acquisition of references at national or international scale when soil properties present great spatial variability and soil research studies are generally carried out on limited area. As seen previously, enzymatic activities are sensible to many kind of stress among which physicochemical parameters of soil play an important role. Then, it is fundamental to know the spatial and temporal variability of enzymatic activities measured in order to identify the effect of trace element or pollutants on these soil activities. The objectives of our study are to (1) assess at the plot scale the spatiotemporal variability of 6 enzymatic activities under two soil practices (grassland and intensive crop) and (2) to measure the impact of two copper concentrations on soil activities: 2 ppm as a standard agricultural dose and 200 ppm corresponding to contaminated soils.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Hach reagents were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (St-Quentin Fallavier, France). Solvents were from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

2.2. Site and Soil characteristics

The field experiments were established in two sites located in the north-west of France, Saint-Georges sur Fontaine and Yvetot.

Soils were luvisols, comprising 18.0% clay, 67.2% silt and 14.8% sand for Saint-Georges, and 18.2% clay, 62.1% silt and 19.7% sand for Yvetot. Their main characteristics (pH, organic C, total N, C/N and CEC) are presented **Table III.1**.

For both sites, we considered two agricultural management practices: permanent grassland and intensive crop. Both permanent grasslands are characterized by permanent cover and no-tillage for more than 25 years. In contrast, intensive crops have a history of long term cropping (wheat, maize, flax or beat crop rotation) with ploughing and fertilization.

Table III.1. Physicochemical characteristics of studied soils

	Saint-Georges sur Fontaine		Yvetot	
	Grassland	Cropland	Grassland	Cropland
Organic Carbon %	3.06	1.34	3.12	1.00
	<i>0.60</i>	<i>0.10</i>	<i>0.53</i>	<i>0.20</i>
Total nitrogen %	0.27	0.15	0.27	0.10
	<i>0.03</i>	<i>0.01</i>	<i>0.03</i>	<i>0.04</i>
C/N ratio	11.17	9.31	11.40	9.90
	<i>0.57</i>	<i>0.14</i>	<i>0.60</i>	<i>0.60</i>
CEC (cmoles+/g dry soil)	6.77	9.45	10.15	7.06
	<i>0.06</i>	<i>0.05</i>	<i>0.01</i>	<i>0.04</i>
pH	4.97	6.82	5.84	6.72
	<i>0.47</i>	<i>0.54</i>	<i>0.40</i>	<i>0.15</i>

Bold number is the average values (n = 20 for each plot sampled in April 2005). Italic number corresponds to the standard deviation.

2.3. Soil sampling

Soil sampling was performed in April, June and October 2005 in the upper sub-layers (0-10 cm). Multiple sampling, 20 replicates as described in **Figure III.1**, were taken from each plot in order to consider the spatial variability of each of the 4 plots. For each replicate, 10 soil cores were collected and mixed to constitute a composite sample. Each composite sample (3-4 kg) was sieved (2 mm screen) and kept field-moist, then stored at 4°C for the measurement of enzyme activities which was performed less than one week after sampling.

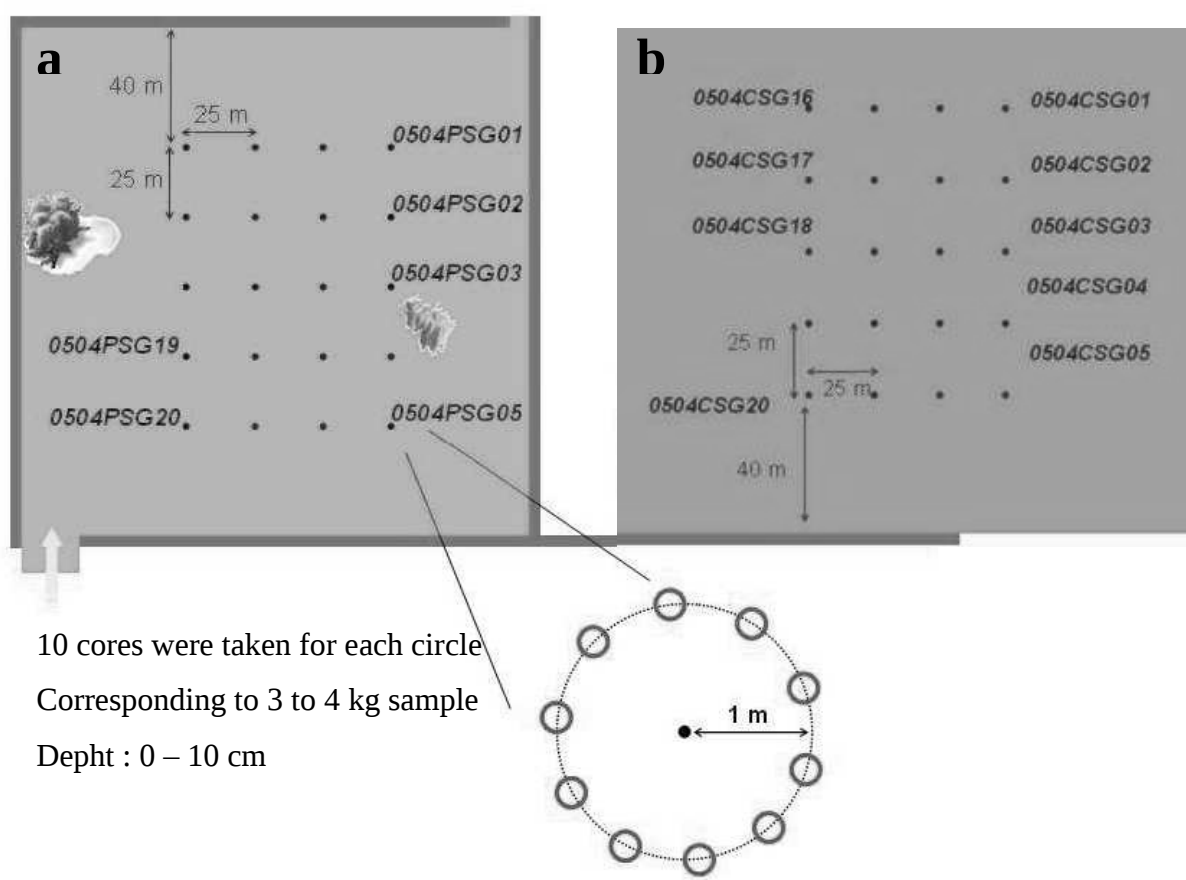


Figure III.1. Sampling design in grassland (a) and crop (b) at Saint-Georges sur Fontaine. The experimental design was similar on the site at Yvetot.

2.4. Enzymatic activities assessment

Measurement of dehydrogenase activity (DH; E.C. 1.1.1.1), indicating the level of global metabolic process in the soil, was adapted from Schaefer (1963). 24 mL distilled water and 1 mL aqueous solution of 5% 1,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) were mixed with

5 g fresh soil in 30-mL centrifuge tubes. Controls were prepared without TTC. Incubation was performed at 25°C for 16 hours. After that period, 20 mL acetone was added to the mixture which was shaken for 5 min in the dark. Subsequently shakings were carried out every hour. Finally, TTC was added to the control and all the mixtures were centrifuged 5 min at 6000 g. The absorbance of the supernatant (red colour in case of formazan formed) was measured at 485 nm. Results were expressed in nmoles TPF per g dry soil for 1 hour.

Acid phosphatase (PAC; E.C. 3.1.3.2), alkaline phosphatase (PAL; E.C. 3.1.3.1), β -glucosidase (GLU; E.C. 3.2.1.21) and N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG; E.C.3.2.1.30) activities were measured according to a method adapted from Dick et al. (1996). 200 μ L of toluene were added to 1 g of sieved soil in order to inhibit microbial activity. Soils were then incubated with 4 mL of buffer at pH 6, except for PAL activity (pH 11). 1 mL of substrate was added before a 2-hour incubation at 25°C. For each sample, a control without substrate was also incubated. At the end of the incubation, 1 mL of CaCl_2 (0.5 M) was added in order to stabilize humic acid, then, 4 mL of NaOH (0.5 M) was used to stop the reaction. At this step, 1 mL of substrate was added to control samples. All samples were centrifuged at 9000 rpm for 3 minutes. The amount of p-nitrophenol (PNP) was obtained by the measurement of the supernatant absorbance at 410 nm. Results were expressed in nmoles PNP per g dry soil for 1 hour.

Urease activity (URE; EC 3.5.1.5) was measured according to Kandeler and Gerber (1988) with slight modification. 50 mL of distilled water were added to 1 g fresh soil and shaken for 10 min. Aliquots of the soil solution (500 μ L) were supplemented with 100 μ L of 0.4 M urea, which was omitted in the controls. The mixtures were shaken vigorously and incubated at 25°C for 4 hours. Subsequently, 100 μ L of a salicylate solution (Hach reagent n°23952-66, 1 bag dissolved in 1 mL water) were added. The mixtures were shaken and the reaction was sustained for 3 min. 100 μ L of a cyanurate solution (Hach reagent n°23954-66, 1 bag dissolved in 1 mL water) were then added. Controls were supplemented with urea. After mixing, the reaction continued a further 30 min. Finally, the mixtures were centrifuged 2 min at 10000 g. The absorbance of the supernatant (blue colour in case of N-NH_4^+ released) was measured at 610 nm. Results were expressed in nmoles N-NH_4^+ per g dry soil for 1 hour.

2.5. Impact of copper on soil enzyme activities

This experiment was started in March 2006. We used Terrestrial Model Ecosystems (TMEs, PVC cylinders of 12.5 cm diameter and 12.5 cm deep) fitted with undisturbed soil columns from 5 representative locations in Yvetot grassland or crop plots. TMEs were incubated in field conditions during a 70-day period, moistened and maintained bare soil.

Three conditions were considered: control without copper, agronomic copper addition (2 ppm) and worst case contamination (200 ppm). TMEs were spiked with 25 mL of the corresponding buffered CuSO_4 solution. Control TMEs received 25 mL water. Copper was well distributed in soils, either in depth or diameter. Five TMEs were analysed before the addition of copper. Then, analyses were performed on 5 TMEs of each treatment after 7, 35 and 70 days of incubation. Soils were sieved at 2 mm before the measurement of enzymatic activities.

The representativeness of the soil TMEs regarding the natural plots was assessed by measuring enzymatic activities (acid and alkaline phosphatases, β -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) simultaneously in both situation, at the beginning and the end of incubation period.

2.6. Statistics

The comparison of soil enzymatic activities in control and contaminated soils has been assumed by Mann Whitney test with a significance level of 5%. Variable component analysis were assessed in order to identify the respective importance of cultural practices, site and date for the first campaign in 2005 and, that of practices, TME establishment, incubation time and presence of copper for the second campaign in 2006.

3. Results

3.1. Enzymatic activities in grasslands and croplands

The mean values of enzymatic activities measured at the three dates are shown in **Table III.2**. The enzymatic activities were generally 2 to 3-fold higher in grassland than crop soils. Only urease activity presented the same activity in both land use types for the two sites. At the Saint-Georges sur Fontaine site, dehydrogenase activity was not significantly different for the two studied cultural practices and alkaline phosphatase showed greater activity in cropland than grassland. The variation coefficients showed that enzymatic activities were highly variable in grassland and cropland of both sites including at the lowest level of activity.

Table III.2. Average values of enzymatic activities in crop and grassland soils

	Saint Georges sur Fontaine		Yvetot	
	Grassland	Crop	Grassland	Crop
Acid Phosphatase (nmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	1201.6	457.3	1509.7	464.8
	<i>644.8</i>	<i>272.4</i>	<i>482.4</i>	<i>217.5</i>
	<i>53.7</i>	<i>59.6</i>	<i>32.0</i>	<i>46.8</i>
Alkaline Phosphatase (nmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	284.9	421.9	619.3	369.4
	<i>180.5</i>	<i>364.4</i>	<i>564.5</i>	<i>300.7</i>
	<i>63.4</i>	<i>86.4</i>	<i>91.2</i>	<i>81.4</i>
β-glucosidase (nmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	365.3	200.7	950.2	293.0
	<i>217.4</i>	<i>116.7</i>	<i>435.7</i>	<i>129.1</i>
	<i>59.5</i>	<i>58.1</i>	<i>45.9</i>	<i>44.1</i>
N-acetyl-β-glucosamin. (nmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	328.0	127.2	243.4	86.4
	<i>224.7</i>	<i>100.6</i>	<i>100.6</i>	<i>55.4</i>
	<i>68.5</i>	<i>79.1</i>	<i>41.3</i>	<i>64.1</i>
Dehydrogenase (nmol TPF g ⁻¹ h ⁻¹)	9.0	7.5	17.8	5.5
	<i>6.8</i>	<i>4.8</i>	<i>16.8</i>	<i>1.6</i>
	<i>75.6</i>	<i>64.0</i>	<i>94.4</i>	<i>29.1</i>
Urease (nmol N-NH ₄ ⁺ g ⁻¹ h ⁻¹)	11.7	10.3	15.1	13.9
	<i>2.7</i>	<i>0.6</i>	<i>5.8</i>	<i>5.8</i>
	<i>23.1</i>	<i>5.8</i>	<i>38.4</i>	<i>41.7</i>

Bold number is the average value including spatiotemporal variability (soils sampled in April, June and October 2005; n = 20 for each activity). Italic number corresponds to the standard deviation. Coefficient of variation (%) is in italic and bold type.

The variation range of enzymatic activities is presented in **Figure III.2**.

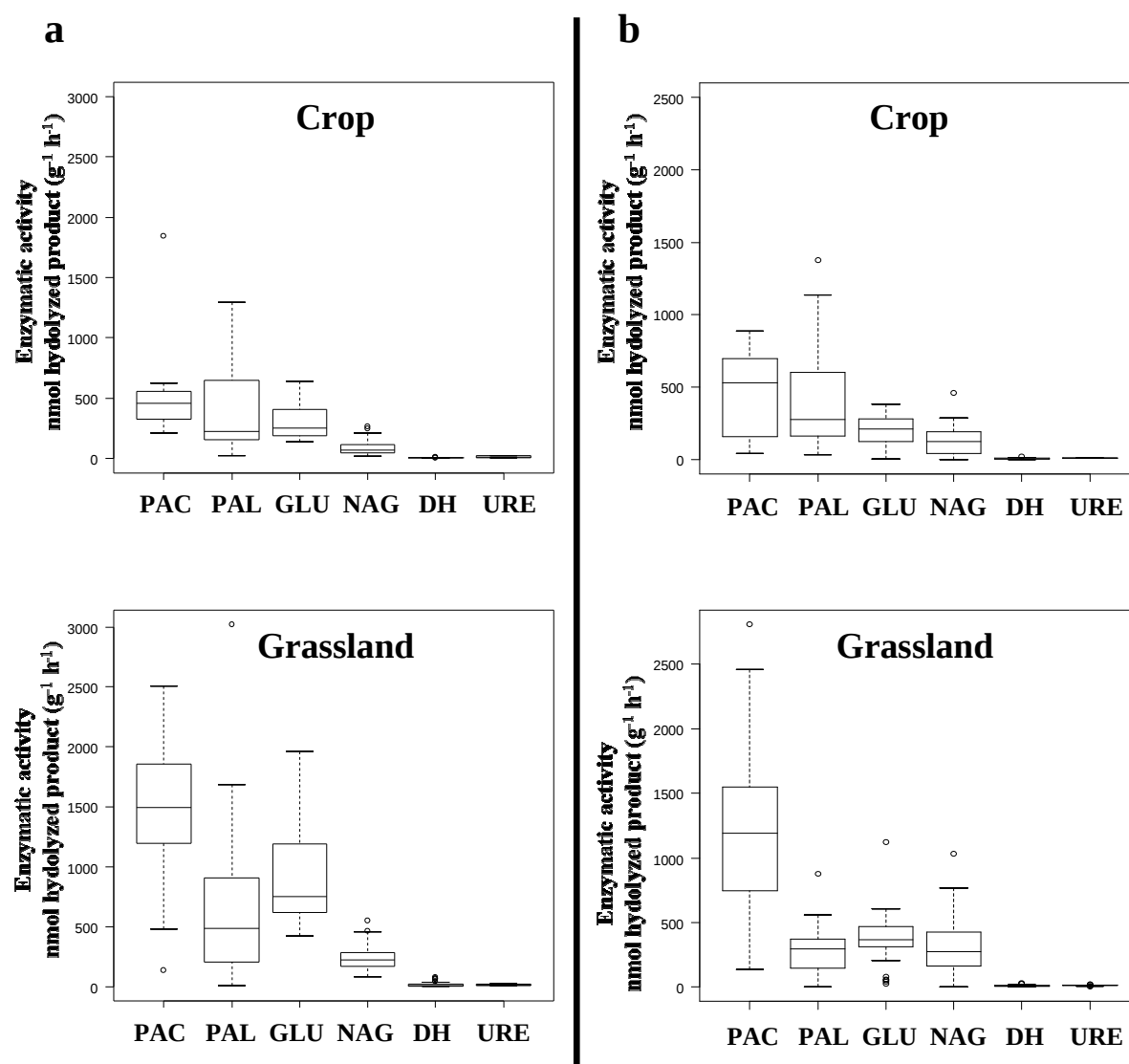


Figure III.2. Spatiotemporal variability in grassland and cropland at Yvetot (a) and at Saint-Georges sur Fontaine (b). For each enzyme, boxes represent the average activity; open circles represent minimal and maximal values.

The enzymes which showed the greatest variation were acid and alkaline phosphatases, and to a lesser extent β -glucosidase. The variation was greater in grassland than cropland. For example at Yvetot (**Fig. III.2a**), acid and alkaline phosphatases and β -glucosidase activities varied respectively from 135 to 2501, 7 to 3022 and 426 to 1960 nmol PNP $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ in grassland soils. For these same activities the range was lower in cropland soils: from 210 to 1842, 24 to 1291 and 136 to 641 nmol PNP $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$. N-acetyl- β -glucosaminidase exhibited less variability in two cultivation practices. The values for grassland were ranged from 86 to 552 nmol PNP $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ and for cropland, 20 to 263 nmol PNP $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$. The variations

of dehydrogenase and urease activities do not appear clearly in the graph because of the weak activity measured. In fact, the levels of activity were recorded between 3 and 80 nmol TPF g⁻¹ h⁻¹ for dehydrogenase and 5 to 25 nmol N-NH₄⁺ g⁻¹ h⁻¹ for urease in grassland and crop together.

For the site at Saint-Georges sur Fontaine (**Fig. III.2b**) the enzymatic activities presented less variability than for the site of Yvetot. Only the acid phosphatase showed a greater range of variability in particular in grassland which varied from 137 to 2808 nmol PNP g⁻¹ h⁻¹. In the soil under crops, alkaline phosphatase showed the greatest variation from 34 to 1376 nmol PNP g⁻¹ h⁻¹. On this site, activities were greater in grassland than in crops except for alkaline phosphatase.

A variation analysis was carried out in order to identify the most important factor affecting the soil enzymatic activities: the cultivation practice, the site or the sampling date (**Table III.3**). The statistical analysis demonstrated clearly an effect of the cultivation practice only on acid phosphatase and N-acetyl-β-glucosaminidase activities. Urease activity was mainly influenced by the sampling date. None of the three factors can explain the variation for the other enzyme activities.

Table III.3. Influence of natural and anthropic factors on soil enzymatic activities in plots as affected by variance analysis (%)

Enzymatic activities	Cultural practices	Site	Date	Residual variability
Acid phosphatase	65.6	0.0	14.7	19.7
Alkaline phosphatase	0.0	0.0	43.4	56.6
β-glucosidase	21.6	31.7	36.7	10.0
N-acetyl-β-glucosaminidase	41.8	0.0	28.3	29.9
Dehydrogenase	14.7	3.2	26.5	55.6
Urease	0.0	0.0	93.7	6.3

(2005-campaign; n = 200)

3.2. Validity of TMEs in relation to the studied plots

Figure III.3 represents the enzymatic activities measured both in the Yvetot plots and the TMEs at the same times: at the beginning and the end of TME incubation in outside conditions. The results showed that no matter which enzymes are considered or cultivation system used, the natural variation of activities was found both in the plots and in the TMEs. For the grassland, no significant difference was observed between the measurements recorded in the TMEs and the plots. For the cropland, significant differences existed for acid and alkaline phosphatase activities. In these cases, the activity measured in the TMEs was higher than that measured in the plot but it remains in the range of variability previously observed for these activities.

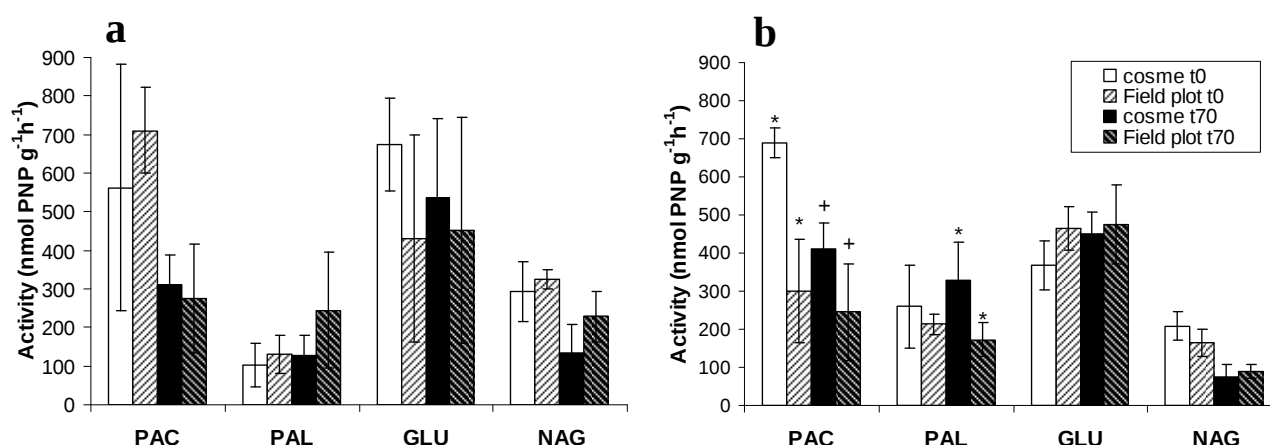


Figure III.3. Comparison of soil enzymatic activities measured both in uncontaminated cosmes incubated for 70 days in outside conditions and in Yvetot field plots (a, grassland; b, crop). Symbols * and + indicate significant differences between cosmes and plots ($p < 0.05$).

3.3. Impact of copper on enzymatic activities

Control and contaminated TMEs were incubated for 70 days in outside conditions. The results of TMEs realized from grassland are shown in **Figure III.4** and from cropland in **Figure III.5**. The activities varied over time for both the control and the contaminated TMEs. In the case of grassland TMEs, copper did not have a significant effect on soil activities compared to the control TMEs, except for acid phosphatase. A significant effect on this activity can be observed in grassland at 7 days for the two levels of copper contamination: 2 and 200 ppm. This effect disappeared for the 2 ppm level of copper whereas it persisted in the TMEs treated with 200 ppm of copper during the incubation period. In the case of cropland

TMEs, two enzymatic activities were affected significantly by the presence of 200 ppm of copper after 70 days of incubation: dehydrogenase and N-acetyl- β -glucosaminidase. Dehydrogenase activity was inhibited by the metal whereas that of N-acetyl- β -glucosaminidase was increased. It is important to note that the significant variations observed for enzymatic activities remains in the range of spatiotemporal variability already established.

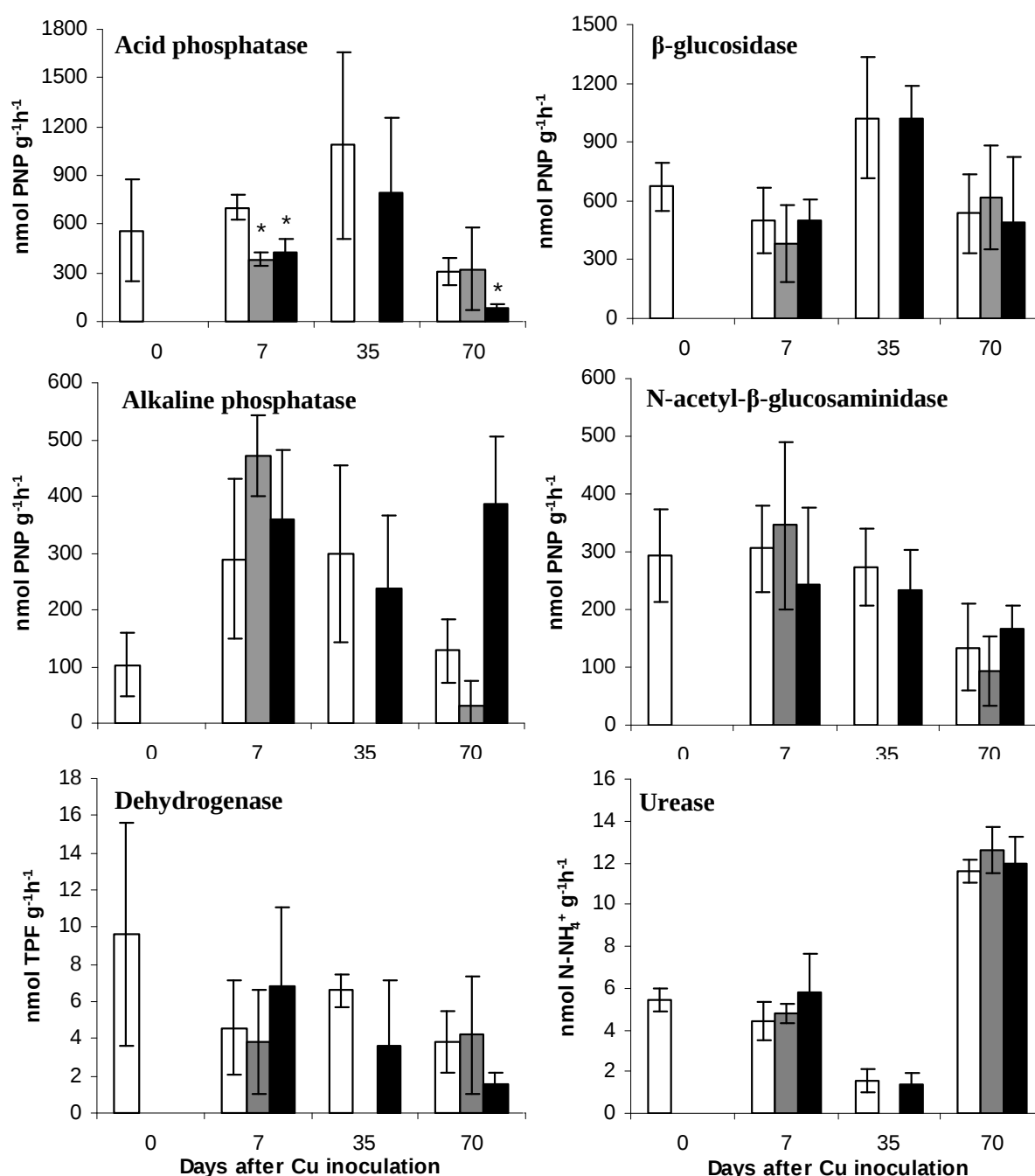


Figure III.4. Soil enzymatic activities in grassland cosmes uncontaminated (□) or contaminated to 2 (■) or 200 (■) ppm of copper. *, indicate a significant difference between the control and contaminated cosmes (p < 0.05)

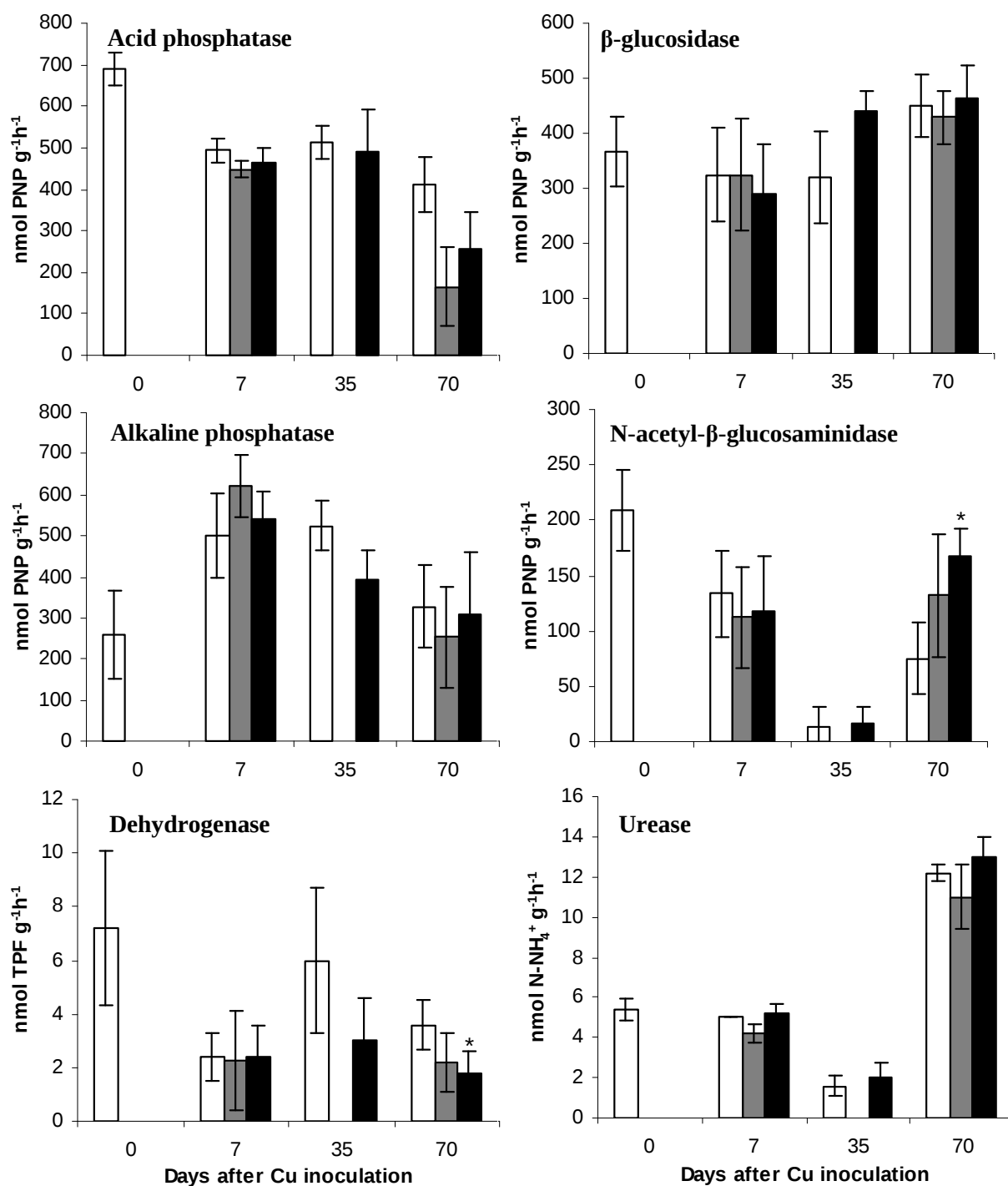


Figure III.5. Soil enzymatic activities in cropland cosmes uncontaminated (□) or contaminated to 2 (■) or 200 (■) ppm of copper. *, indicate a significant difference between the control and contaminated cosmes ($p < 0.05$)

Analysis of variance was carried out in order to identify the most important factor affecting the soil enzymatic activities: the cultivation practice, the presence of copper, the incubation time and the TMEs establishment (**Table III.4**). The results confirmed the absence of effect due to the TMEs establishment on the enzymatic activities. They also showed the lack of effect of copper on enzymatic activities: 0% to 19.2% of the variation can be explained by the metal for the six enzymatic activities. The highest percentage was obtained for alkaline phosphatase. Therefore the variation can not be fully explained by any of the factors in this analysis.

Table III.4: Influence of factors on soil enzymatic activities in undisturbed soil cosmes by variance analysis (%)

Enzymatic activities	Cultural practices	Incubation time	Cosme	Copper	Residual variability
Acid phosphatase	0.0	47.0	0.0	10.8	42.2
Alkaline phosphatase	12.0	9.6	14.2	19.2	45.0
β -glucosidase	17.6	39.3	0.0	0.0	43.1
N-acetyl- β -glucosaminidase	49.4	13.1	9.1	2.0	26.4
Dehydrogenase	1.2	27.9	ND	5.6	65.3
Urease	0.0	89.2	ND	2.8	8.0

(2006-campaign; n=114, except dehydrogenase and urease n=90)

ND means not determined

4. Discussion

4.1. Spatial and temporal variability

The objective for the first part of this study was to assess the spatial (20 replicates per plot) and temporal variability (three sampling dates) of measured enzymatic activities. Webster & Oliver (2001) showed that the spatial variability of enzymatic activities could be very high over short distances. The results of our study confirm this finding. Enzymatic activities are highly variable with variation coefficients sometimes higher than 90% for a given site. Variability is linked to the distribution of other factors such as humidity and the level of organic matter (Jordan et al., 1995; Bergstrom et al., 1998; Killham & Staddon, 2002). Other authors have established correlations between enzymatic activity and physical and chemical properties of the soil (Grierson & Adams, 2000; Taylor et al., 2002; Gianfreda et al., 2005). In this study, enzymatic activities are shown to be mainly correlated with the cultivation practises, i.e. with the levels of carbon and total nitrogen which is consistent with previous results. Other than the spatial variability of the physical and chemical properties of the soil, it is important to highlight the spatial variability linked to the scale of the studied habitat in microbial ecology. Indeed, the soil is composed of an assembly of aggregates forming micro-habitats in which the flow of nutritive elements, air and water influence the functioning of the biological communities responsible for the enzymatic activities (Robert & Chenu, 1992). Despite the intra-plot variations observed, the statistical analyses carried out have not highlighted an effect of the sampling site on the measured enzymatic activities. This is probably due to the high similarity of the pedo-climatic characteristics of the sites which is however encouraging for the robustness of the enzymatic tool.

The temporal variability of the measured enzymatic activities is very high in cropland and grassland soils. This is particularly noticeable for urease, aryl-sulfatase and β -glucosidase activities which had 94%, 40% and 38% variability respectively. Taking into account to the temporal variability is particularly important in agriculture because it allows, other than climatic factors, to integrate the diversity of the technical practices and vegetative growth stage which have an impact on the microbial populations and their activities (Calbrix et al., 2005). In this study, amongst the physicochemical parameters measured, moisture was the element which varied most with the sampling date: 95% variation of humidity is linked to the date of sampling.

This spatiotemporal variability of enzymatic activities observed in this study and indicated in the literature (Nannipieri et al., 2000) implies the necessity to establish a data base-line in the given pedo-climatic conditions; especially when the objective of the study is to assess the impact of an anthropogenic activity (soil management, pollutant..) on the levels of activity. However, published studies, which aim at assessing the impact of a pollutant on biological communities in the soil, position themselves most often only at a level of comparison between a control and a contaminated soil (Ekenler & Tabatabaï, 2002^b). This study provides the first data base of enzymatic activities at plot level and under realistic agricultural conditions for the north-west of France.

4.2. Effect of copper

The originality of our study on the impact of copper resides in the fact of having incubated the TMEs in field conditions in a way that is as close as possible to that which can be found in the original plots. The comparison of measured activities in TMEs and in plots at the same time clearly shows that the experimental approach used here is capable of modelling what happens in the field. The experimental approach presented also the interest of not modifying the structure of the soil, in contrast to incubations of sieved soils which are widely used to test the effect of pollutants (Ranjard et al., 2006). Taking into account the large existing interactions between the components of the soil and exogenous molecules, the conservation of soil structure is a significant advantage.

If a comparison is made between the control and TMEs polluted at 200 ppm of copper, the results are then similar to that found in the literature and the enzymes studied are diversely affected by the addition of copper. The activities of β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, urease and alkaline phosphatase do not appear under the experimental conditions of the study to be affected by the presence of copper. These results are in accordance with other reports which did not find any effect of copper on diverse enzymatic activities (Demanou et al., 2006; Avidano et al., 2005; Gianfreda et al., 2005). Other studies have however demonstrated a certain sensitivity of enzymatic activities to the presence of copper: for β -glucosidase (Giller et al., 1998; Hinojosa et al., 2004), alkaline phosphatase (Wang et al., 2007^{a,b}), urease and dehydrogenase activities (Mikanova, 2006), and for a selection of 11 enzymatic activities (Kandeler et al., 1996).

Under the experimental conditions, only the activities of acid phosphatase and dehydrogenase appear to have been inhibited by the presence of copper in this study. Dehydrogenase activity was the most sensitive. Chander & Brookes (1991) showed that copper present in the soil could interfere at the time of the measurement of the activity by limiting the development of the coloration thus inducing an under-estimation of the activity. Preliminary trials during this study indicated that this interaction occurred at concentrations of copper far superior to those used here. Moreover, a reduction in the activity of dehydrogenase was observed during the 2006-campaign compared to the 2005-campaign; if the effect of copper was really an artefact of measuring then this effect would have appeared as from the first year of experimentation. However, if it concerns the activity of dehydrogenase or acid phosphatase, the attributed variations to the presence of copper always remains inferior to the recorded annual natural variation at the level of the plot. Finally, the 200 ppm of copper is far higher than the authorised agricultural rate; nevertheless, the different studies used to assess the impact of copper are often carried out with much higher rates between 120 and 1630 ppm of copper (Avidano et al., 2005; Kunito et al., 2001; Wang et al., 2007^{a,b}; Xie et al., 2009).

5. Conclusion

The present results constitute the first database dealing with enzymatic activities in plots of the north-west region of France. They underline the great natural variability of 6 enzymatic activities. In this study, we show that the impact of agricultural practices and land use is more important than the impact of copper addition on the expressed level of enzymatic activity. Two hypotheses can explain our results:

i) The added copper was not uniformly applied or bioavailable for micro-organisms. Giller et al. (1998) showed that metals added at the surface of the soil can be held in the superficial horizon without disruption of microbial activity. Nevertheless, an additional laboratory experiment showed that our way of copper application lead to a homogenous distribution of the metal, either over the surface or depth of the TMEs. EDTA extractions proved the bioavailability of copper.

ii) In a bare soil *in situ*, the amount of available organic carbon should limit the exponential development of microbial biomass. In that situation, micro-organisms should be poorly sensitive to contaminants. Clarifying that point requires the setting up of further research. Thus, sieving the soil makes organic carbon available, with a stimulation of soil micro-organisms (Jenkinson, 1966), and therefore a change in their physiological state. If this hypothesis proves to be true, it could be of capital importance for agricultural applications. Indeed, the ecotoxicological effect of chemicals treatments should vary according to land use and soil management.

Acknowledgments: This work was supported by the French Agency for Environment and Energy Management (ADEME) and the region of Haute-Normandie (France). We thank Hazel Favre and William Edmonds, english native speaker, for proof reading this manuscript.

*PARTIE B : A l'échelle de l'individu, *Trametes versicolor**

Dans la partie A, nous avons vu que les activités enzymatiques testées dans les sols ne semblent pas être des descripteurs d'une contamination métallique, probablement du à la grande variabilité spatiotemporelle des activités ou à la redondance fonctionnelle des enzymes choisies. Cela peut également s'expliquer par la grande diversité microbienne et de ce fait, l'impact d'un métal peut différer d'une espèce à une autre au sein d'une même communauté. Par ailleurs, les sols sont des systèmes dynamiques dans lesquels les microorganismes sont sous différents états physiologiques (selon leurs stades de développement), ce qui peut affecter la sensibilité et l'intensité de leurs réponses. Ainsi, il est important de comprendre et d'élucider les mécanismes d'action des métaux à l'échelle de l'individu afin d'établir des réponses biologiques spécifiques à une exposition.

Parmi les microorganismes telluriques, les champignons constituent la principale biomasse des sols. Ces acteurs clés du fonctionnement des sols sécrètent un vaste équipement enzymatique capable de dégrader différents polymères naturels. Ainsi, les champignons sont à la base de nombreux réseaux trophiques grâce à leur grande capacité de biocatalyse et de biosynthèse. En culture liquide, il a été observé que l'exposition de champignons à des contaminants conduit à des modulations d'activités enzymatiques et des modifications post-traductionnelles. Des réponses caractéristiques pourraient être reliées à un stress chimique, et constituer de ce fait des outils pour évaluer l'état de santé des sols (Chapitre II.2.).

Puisque l'expression du potentiel fonctionnel des champignons dans un état naturel ou de stress est mal connue, l'intérêt d'utiliser les profils fonctionnels fongiques comme indicateurs d'exposition métallique est avant tout limité. Ainsi, les études réalisées dans cette partie B ont pour but d'améliorer nos connaissances sur les bases physiologiques de la régulation et de la sécrétion des systèmes enzymatiques fongiques, et sur l'impact des métaux sur ces systèmes fonctionnels.

Nos études se sont focalisées sur deux familles d'enzymes : les hydrolases, communément utilisées pour mesurer le fonctionnement des sols et les oxydoréductases de type ligninolytique, plutôt spécifiques des communautés fongiques. Des profils enzymatiques (mesures d'activités) et protéiques (analyse des sécrétomes) ont été établis à partir de cultures

liquides de *Trametes versicolor* exposé ou non à des métaux. *T. versicolor* a été choisi pour sa capacité à sécréter des oxydoréductases, dont leurs productions et leurs activités sont sensibles à la présence de contaminants (Mougin et al., 2002). De plus, les mécanismes de synthèse des oxydoréductases sont mieux décrits dans la littérature que ceux des hydrolases (Johansson & Nyman, 1996 ; Collins & Dobson, 1997 ; Bertrand et al., 2002^a ; Necochea et al., 2005).

L'objectif du **Chapitre IV** a été d'évaluer l'influence de l'état physiologique sur la réponse du système enzymatique à un stress métallique (le cuivre) chez *T. versicolor*.

Les questions soulevées sont :

- Quelle est la distribution des activités hydrolases et oxydoréductases dans les différents compartiments fongiques (intracellulaire/membranaire/extracellulaire) ?
- Quelles sont les enzymes préférentiellement sécrétées par le champignon ?
- Est-ce que la phase de développement conditionne la sécrétion des enzymes ?
- Est-ce qu'un stress métallique modifie les profils de sécrétion des enzymes ?
- Est-ce que la phase de développement influence la sensibilité de la réponse des enzymes à un stress métallique ?

L'objectif du **Chapitre V** a été de déterminer des réponses caractéristiques aux métaux au niveau enzymatique et protéique. L'exposition de *T. versicolor* a alors été élargie aux principaux métaux retrouvés dans les sols cultivés : Cu, Zn, Pb et Cd. Une des originalités de cette étude a été de tester les métaux seuls ou en cocktail, ce qui est plus représentatif des multi-contaminations des sols.

Les questions soulevées sont :

- Est-ce que les métaux testés seuls ou en cocktail modifient les profils extracellulaires au niveau enzymatique et protéique ?
- Est-ce qu'il existe une corrélation entre une modulation d'activité et la quantité de protéines sécrétées ?
- Est-ce que la diversité fonctionnelle est affectée par une exposition métallique ?
- Y a-t-il un effet cumulatif des métaux en présence du cocktail ?
- Les réponses sont-elles caractéristiques à un métal ou à un ensemble de métaux ?
- Est-ce que l'exposition métallique conduit à l'induction d'isoformes spécifiques ?
- Existe-t-il des modifications post-traductionnelles en présence de métaux ?

CHAPITRE IV

Bases physiologiques de la sécrétion du système fonctionnel fongique

« Vers le développement de biomarqueurs fongiques pour l'évaluation de l'écotoxicité des métaux : cas de *Trametes versicolor* exposé au cuivre »

Article accepté dans *Environmental Toxicology and Chemistry*

**INSIGHTS INTO THE DEVELOPMENT OF FUNGAL BIOMARKERS FOR METAL
ECOTOXICITY ASSESSMENT:
CASE OF *TRAMETES VERSICOLOR* EXPOSED TO COPPER**

Authors

JÉRÉMIE D. LEBRUN*†‡, ISABELLE TRINSOUTROT-GATTIN‡, KARINE LAVAL‡
and CHRISTIAN MOUGIN†

Affiliations

† INRA, UMR 251 Physico-chimie et Ecotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés,
RD 10, 78026 Versailles Cedex, France

‡ ESITPA, Equipe BioSol, 3 rue du Tronquet, 76134 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

Running head

Fungal oxidoreductases as biomarkers to a copper stress

Corresponding author*: Jérémie D. Lebrun
jlebrun@versailles.inra.fr

(Received 6 May 2009; Returned for revision 31 August 2009; **Accepted** 23 October 2009)

Résumé - La relation entre l'état physiologique des champignons et la réponse de leur système fonctionnel aux métaux n'est pas connue, ce qui limite l'utilisation des enzymes fongiques comme outils pour évaluer l'écotoxicité des métaux dans les écosystèmes terrestres. Cette étude a pour but d'établir comment les phases de développement modulent la sécrétion des enzymes du champignon filamenteux, *Trametes versicolor*, après exposition au cuivre (Cu). Pour ce faire, des activités hydrolases (phosphatases acide et alcaline, aryl-sulfatase, β -glucosidase, β -galactosidase et N-acétyl- β -glucosaminidase) et oxydoréductases extracellulaires (laccase, manganèse et lignine-peroxydases) ont été suivies dans des cultures liquides pendant deux semaines. Le Cu a été ajouté à 20 ou 200 ppm lors de la phase de croissance ou de la phase stationnaire. Nos résultats ont montré que le Cu à la plus forte concentration modifie la sécrétion des enzymes, quelque soit la phase d'exposition du champignon. Cependant, la sensibilité de la réponse au Cu dépend de la phase de développement et du type d'enzyme sécrétée. De façon générale, la production des hydrolases est diminuée par le Cu tandis que celle des oxydoréductases est fortement augmentée. Par ailleurs, la lignine peroxydase non détectée dans les cultures contrôles, est spécifiquement produite en présence du métal. Nous avons conclu que les oxydoréductases fongiques pourraient être des biomarqueurs d'exposition au Cu pour évaluer l'écotoxicité.

Mots-clés : Champignons filamenteux, Hydrolase, Laccase, Mn-peroxydase, Lignine peroxydase

Abstract - The relationship between the physiological state of fungi and the response of their functional system to metals is not known, hence limiting the use of fungal enzymes as tools to assess metal ecotoxicity in terrestrial ecosystems. The present study attempts to establish how the development phases modulate the secretion of enzymes in the filamentous fungus, *Trametes versicolor*, after exposure to copper (Cu). For that purpose, extracellular hydrolases (acid and alkaline phosphatases, aryl-sulfatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) and oxidoreductases (laccase, manganese and lignin peroxidases) were monitored in liquid cultures for two weeks. Cu was added either during the growth or stationary phases at 20 or 200 ppm. Results of the present study showed that Cu at the highest concentration modifies the secretion of enzymes, whatever the development phase to which the fungus was exposed. However, the sensitivity of enzyme responses to Cu depended on the phase development and the type of secreted enzyme. In a general way, the production of hydrolases was decreased by Cu whereas that of oxidoreductases was highly increased. Furthermore, lignin peroxidase was not detected in control cultures and was specifically produced in the presence of Cu. To conclude, fungal oxidoreductases may be enzymatic biomarkers of copper exposure for ecotoxicity assessment.

Keywords: Filamentous fungi, Hydrolases, Laccase, Mn-peroxidase, Lignin peroxidase

1. Introduction

Soil pollution due to human activities is a worldwide problem with serious consequences on the health of the ecosystems. The release of metallic pollutants into the soil and the non-degradability of these elements have led to their important accumulation in biota, and often cause adverse effects on biological systems. The assessment of these effects, at the least on soil functioning, remains a research subject because of the lack of efficient tools. Soil microorganisms produce extracellular hydrolases which take part in the initial step of the mineralization of biopolymers such as cellulose or chitin, and are also involved in the cycling of phosphorus, sulfur or nitrogen. As a consequence, these biochemical actors play an important role in the soil functioning (Nannipieri et al., 2002). Thus, global hydrolytic activities are commonly measured in soils for many decades to assess their health, functioning and quality in the presence of pollutants (Dick, 1997; Ascosta-Martinez & Tabatabaï, 2000; Kähkönen et al., 2008). It is assumed that high levels of activity reflect high soil quality whereas low levels mean toxic effects. Nevertheless, the physiological bases of these assumptions remain to be determined in filamentous fungi representing one of the largest biomass in terrestrial ecosystems (Kjoller & Struwe, 2002).

Saprophytic fungi, considered as the predominant degraders of lignin, have been particularly studied for their ligninolytic oxidoreductases, such as laccases or peroxidases (Bollag & Leonowicz, 1984; Orth et al., 1991; Bouws et al., 2008). An environmental interest to this fungal set of enzymes has increased because of their ability to degrade a variety of organic xenobiotics (Donnelly et al., 1997; Mougin et al., 2003; Cajthaml et al., 2008). Although fungi have mechanisms for metal tolerance (Baldrian, 2003), the activity of their extracellular enzymes has been shown to be modulated during the metal exposures in liquid cultures. Cu increases the extracellular laccase in different filamentous fungi (Crowe & Olsson, 2001; Levin et al., 2002; Baldrian et al., 2006). It is also known that Cu induces the laccase transcription in *Trametes versicolor* (Collins & Dobson, 1997). Heavy metals, such as Cu, Zn, Mn or Pb, modify the extracellular activity of cellulolytic and ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* (Baldrian et al., 2006). In this fungus, the cellulolytic activities were generally decreased and the laccase activity was increased by all tested metals. Because of these functional modulations, it is assumed that fungal enzymes may be used as tools to assess the metal ecotoxicity in soil.

Soil is a dynamic system in where fungi are in growth or stationary phase. As a consequence, the fungal response to metals can depend on their development phase in environmental conditions. Since the relationship between the physiological state of fungi and the response of their enzymatic system to a metal stress is not known; the predictive interest in such fungal biomarkers to metal exposure is hence limited. Furthermore, the fungal responses to metals can be also modulated by other factors such as the physico-chemical characteristics of soil or the availability of metal. By an inoculation strategy, the influence of these factors on fungal enzymatic activities can be assessed in terrestrial systems. For example, the fungal biomass and laccase activity were monitored after an inoculation of *T. versicolor* or *Cunninghamella elegans* in soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (Rama et al., 2001). Thus, it is feasible to use fungi and their enzymatic system in bioassay studies. However, before performing studies taking into account the complex properties of soil, it is first necessary to improve our knowledge of the response of the enzymatic system of fungi to metal stress at the organism level, in order to determine the relevance of using fungal enzymes as biomarkers of metal exposure.

The present study aims to establish how the development phases influence the response of *Trametes versicolor* to copper at the functional level. Copper has been retained because it is a common contaminant of soils from many agrosystems, amounting from 100 to 1000 ppm (mg/kg of soil), whereas geochemical values in non contaminated soils are between 5 and 30 ppm (Parat et al., 2002; Heijerick et al., 2006; Laguerre et al., 2006). Two main families of enzymes involved in terrestrial ecosystem functioning were monitored: hydrolases (β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, β -galactosidase, acid and alkaline phosphatases, and aryl-sulfatase) and oxidoreductases (laccase, manganese and lignin peroxidases) in liquid cultures of *T. versicolor*.

2. Material and methods

2.1. Culture conditions and metal exposure

Trametes versicolor ATCC 32745 was grown in a liquid culture medium, containing maltose and ammonium tartarate as carbon and nitrogen sources (Lesage-Meesen et al., 1996). A mycelium mat on agar plugs (10 mm diam.) was inoculated into 10 ml of culture medium in 150 ml Erlenmeyer flasks. Cultures were carried out statically in the dark at 25 °C. After 3 or 9 days of incubation, 100 µl of $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (VWR, > 99% purity) sterilized by filtration (0.2 µm pore size membrane) were added to the liquid cultures at final concentrations of 20 or 200 ppm ($\text{mg}_{\text{Cu}}/\text{l}$ of culture medium). Controls were realized without metal addition. The experiments were carried out with 3 independent replicates (3 fungal cultures) per treatment (5 conditions) and per sampling day (8 dates).

2.2. Sampling

At different days of incubation over a 16 days period, mycelia were harvested by a nylon screen (40 µm) and dried for 48 h at 80 °C to monitor the fungal growth. This determination of the dry weights of fungal biomass was also used as an indicator of metal toxicity. The mycelium free culture was used for the extracellular activities assays, the quantification of total proteins by the Bradford method using bovine albumin as a standard (Bradford, 1976) and total sugar amounts by the Nelson-Somogyi method (Nelson, 1944).

For intracellular activities, mycelia were washed five times with ice-cold physiological water (NaCl, 9 g/l), frozen at - 20 °C for 24 h and thawed to rupture cells. Mycelia were ground in a mortar to liberate intracellular enzymes. Membrane debris were separated from the ground extract by centrifugation at 6000 g for 30 min at 4 °C. Obtained supernatants were filtered through 0.45 µm pore size membranes and used to measure intracellular activities. For membrane activities, membrane debris pellets were washed twice with cold citrate/phosphate buffer (0.05 M; pH 5), centrifuged and resuspended to measure membrane activities (Seiboth et al., 2005).

2.3. Activity assays

Hydrolase activities were assayed using their respective substrates of conjugated para-nitrophenyl (Sigma-Aldrich). Assays were carried out in 96-well microplates, by mixing 120 μ l of substrate solution (25 mM) in acetate buffer (0.1 M) with 80 μ l of enzymatic samples, followed by incubation at 37 °C. After 45 min, 50 μ l of Na₂CO₃ (1 M) was added to stop the reaction. The liberation of para-nitrophenol by enzymatic hydrolysis of the substrate was determined at 405 nm. Acid phosphatase (EC 3.1.3.2), β -glucosidase (EC 3.2.1.21), β -galactosidase (EC 3.2.1.23), and N-acetyl- β -glucosaminidase (EC 3.2.1.30) were tested at pH 4.5, aryl-sulfatase (EC 3.1.6.1) at pH 7 and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) at pH 10 (Keshri & Magan, 2000; Kim et al., 2004). The standard solutions of para-nitrophenol were treated in the same way as the samples.

Laccase (EC 1.10.3.2) activity was measured by monitoring the oxidation of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) acid (1 mM; $\xi_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) at 420 nm in citrate/phosphate buffer (CPB; 0.1 M, pH 3.0) at 30 °C (Wolfenden & Willson, 1982). Lignin and manganese peroxidases (EC 1.11.1.13 and EC 1.11.1.14) activities were monitored respectively by the oxidation of veratrylic alcohol (3 mM; $\xi_{310} = 9\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) at 310 nm in CPB (pH 3.0) in the presence of H₂O₂ (0.6 mM) (Tien & Kirk, 1984) and the oxidation of 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one (1 mM; $\xi_{334} = 18\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) at 334 nm in CPB (pH 5.0) in the presence of MnSO₄ (0.1 mM) and H₂O₂ (0.4 mM) (Paszczyński et al., 1986). Solutions of enzymes were added to a final volume of 1 ml and the kinetics were monitored for 30 s.

Assay mixtures containing membrane debris samples were centrifuged (10 000 g for 1 min) before absorbance reading. Intracellular, extracellular and membrane activities were measured in triplicate and expressed in U/g dry weight of fungal biomass (U/g d.w.). Controls were done with enzymatic samples boiled to inactive the activities, and treated in the same way during the enzymatic assays. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed 1 μ mol substrate in 1 min.

2.4. Statistical analyses

Means and standard errors (SEM) were calculated from three independent sets for each biological variable measured. Statistical analyses were performed by XLStat (Addinsoft). The significant differences were tested with $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Fungal development and metal toxicity

The growth of *T. versicolor* was first determined in order to identify the development phases over a 16 d period (**Fig. IV.1**). In the absence of metal, *T. versicolor* grew during 8 d. This growth phase was related to the consumption of available sugars in the liquid medium. The fungus then entered in stationary phase from 8 to 9 d when the source of carbon (sugars) was exhausted. This stationary phase was followed by a decline phase from 9 to 16 d due to a cell lysis.

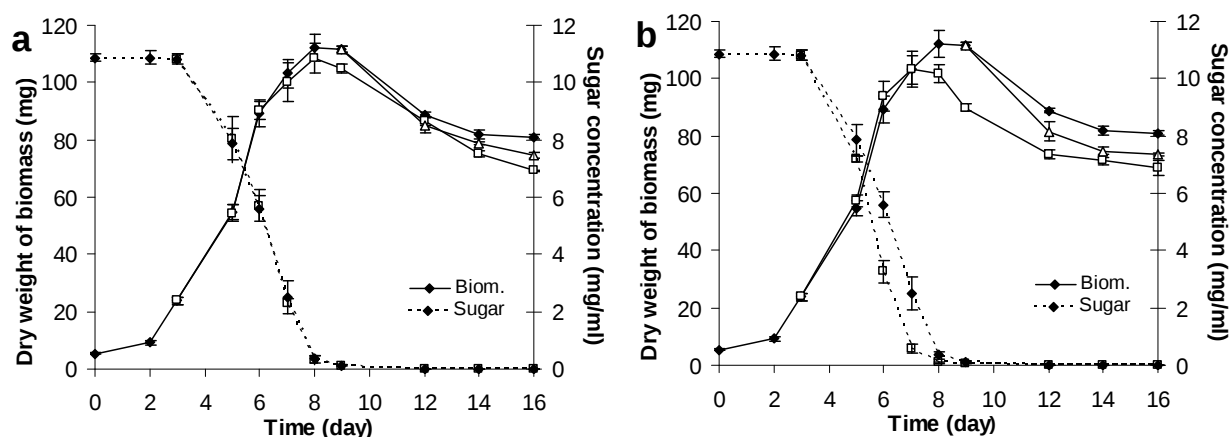


Figure IV.1. Sugar concentration in culture medium and growth of *Trametes versicolor* exposed to Cu at 20 (a) or 200 (b) ppm. Symbols: unexposed (◆) or exposed to Cu added either during the growth (□) or stationary (Δ) phases. The values are means $\pm$ SEM ($n=3$).

Copper was then added at 20 or 200 ppm either at the 3 or 9 d of fungus incubation, during the growth or stationary phases respectively. Whatever the concentration of Cu added during the growth phase (3 d), the metal had no effect on the growth of *T. versicolor* compared to the unexposed control (**Fig. IV.1a and IV.1b**). However, the fungus reached the stationary phase earlier for the concentration of 200 ppm linked to a faster loss of sugars in the liquid medium (**Fig. IV.1b**). When Cu at 200 ppm was added in the stationary phase (9 d), the lysis rate was significantly increased compared to the control (**Fig. IV.1b**).

2.2. Distribution of enzymatic activities

Hydrolase and oxidase activities were measured in extracellular, intracellular and membrane compartments in the absence of metal to establish the localization of enzymes produced by *T. versicolor* during the growth and decline phases (**Fig. IV.2**). Aryl-sulfatase and lignin peroxidase activities were not detected whatever the development phases. Among the detected activities, it can be observed that all hydrolase activities are principally associated with cells (> 85 % of total activities) in the growth phase (**Fig. IV.2a**). Acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase activities were distributed between intracellular and membrane compartments, except for alkaline phosphatase which was only intracellular. By contrast, oxidase — laccase and Mn-peroxidase — activities were preferentially found in the extracellular compartment (> 45 % of total activities). This distribution was slightly affected in the decline phase (**Fig. IV.2b**). The principal difference appeared for β -galactosidase activity whose extracellular part was increased five times compared to the growth phase.

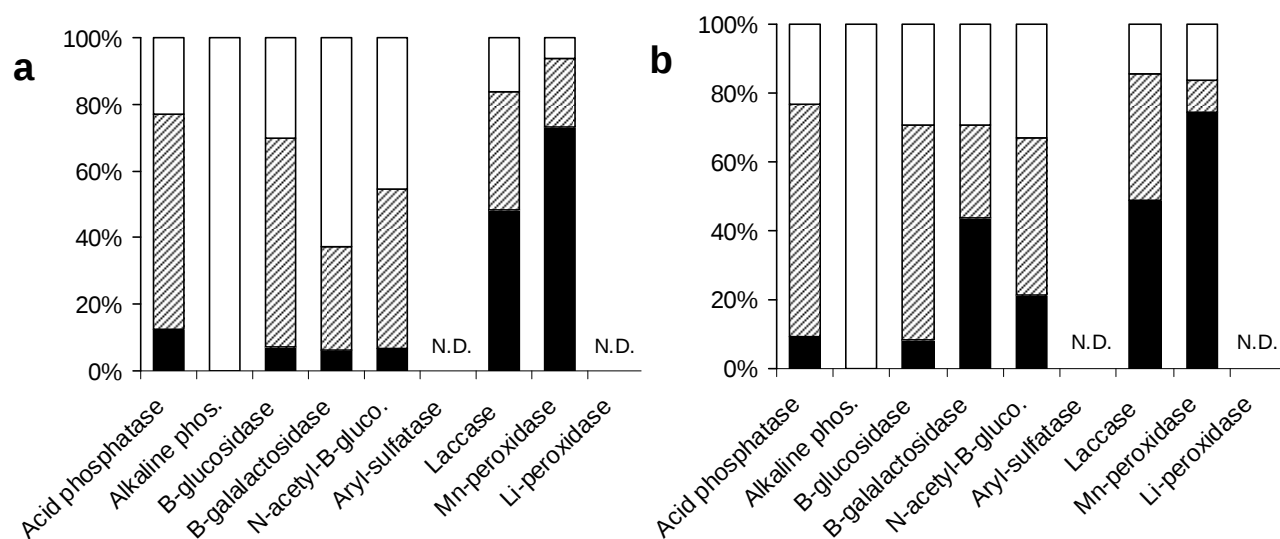


Figure IV.2. Distribution of enzymatic activities in the different compartments of *Trametes versicolor* after 6 or 12 days of incubation, in growth (a) or stationary (b) phases respectively. Symbols: extracellular (■), membrane (≡) and intracellular (□) compartments. The activities expressed in U/g d.w. were reported as percentages ($n=9$). N.D. means not detected.

2.3. Protein secretion during the fungal development

The regulation of protein secretion during the development of *T. versicolor* is presented in **Figure IV.3**. In the absence of metal, a first peak of secretion appeared during the growth phase reaching 16.9 mg_{proteins}/g dry weight of fungal biomass on day 3. A second peak occurred during the decline phase of the fungus where the value of total secreted proteins amounted to 27.4 mg/g d.w. on day 14. The copper addition at 20 ppm either in the growth or stationary phase slightly modified the protein secretion compared to the unexposed control (**Fig. IV.3a**). However, the metal at 200 ppm altered the regulation of secretion (**Fig. IV.3b**). Its addition during the growth phase led to a long term effect by decreasing the stimulation of protein secretion occurring during the decline phase. Despite variations in the amount of secreted proteins, its addition in stationary phase did not prevent this stimulation.

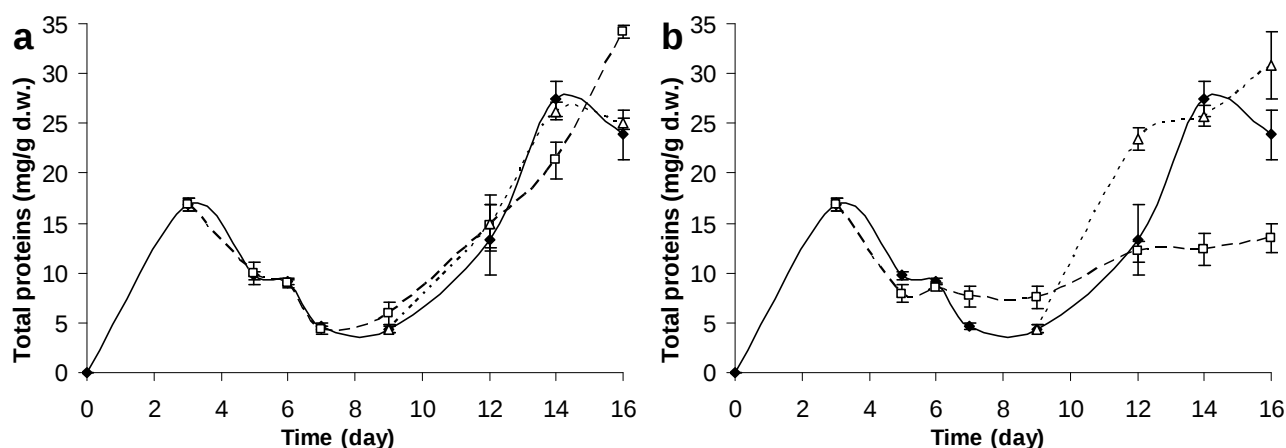


Figure IV.3. Effect of copper at 20 (a) or 200 (b) ppm on the protein secretion by *Trametes versicolor*. Symbols: unexposed (—◆—) or exposed to Cu added either during the growth (--□--) or stationary (--△--) phases. The values are means $\pm$ SEM ($n=9$).

2.4. Secretion of hydrolases and oxidoreductases

Among extracellular enzymes detected and secreted in significant amounts by *T. versicolor* in the absence of Cu, two sets of enzymes can be distinguished according to their secretion profile in culture conditions. Each set had a peak of activity either during the growth or decline phase related to the peaks of protein secretion of the fungus (**Fig. IV.3 vs Fig. IV.4 and IV.5**). A first set including acid phosphatase, β -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase, was mainly secreted during the growth phase (**Fig. IV.4 and IV.5**). Peaks of these activities were at least 2-fold higher than their activity average over the culture period (**Table IV.1**). By contrast, a second set gathering β -galactosidase and oxidoreductases — laccase and Mn-peroxidase — was poorly produced during the growth phase and mainly secreted during the decline phase (**Fig. IV.4 and IV.5**). Peaks of β -galactosidase, Mn-peroxidase and laccase activities were at least 2.5-fold higher than their activity average over the culture period (**Table IV.1**).

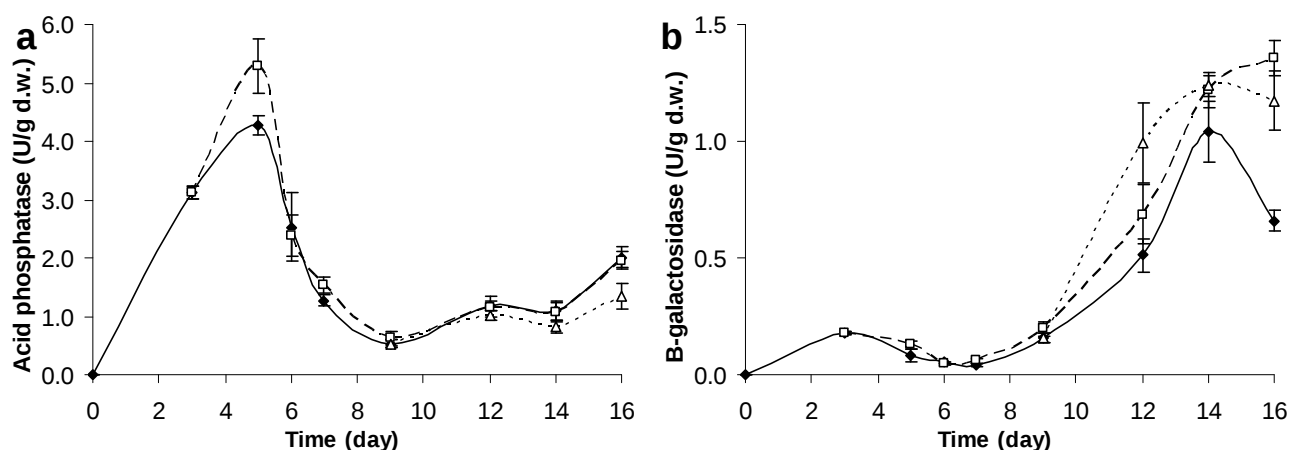


Figure IV.4. Responses of extracellular acid phosphatase (a) and β -galactosidase (b) activities to Cu at 20 ppm in *Trametes versicolor*. Symbols: unexposed (—◆—) or exposure to Cu added during the growth (—□—) or stationary (—△—) phases. The values are means $\pm$ SEM (n=9).

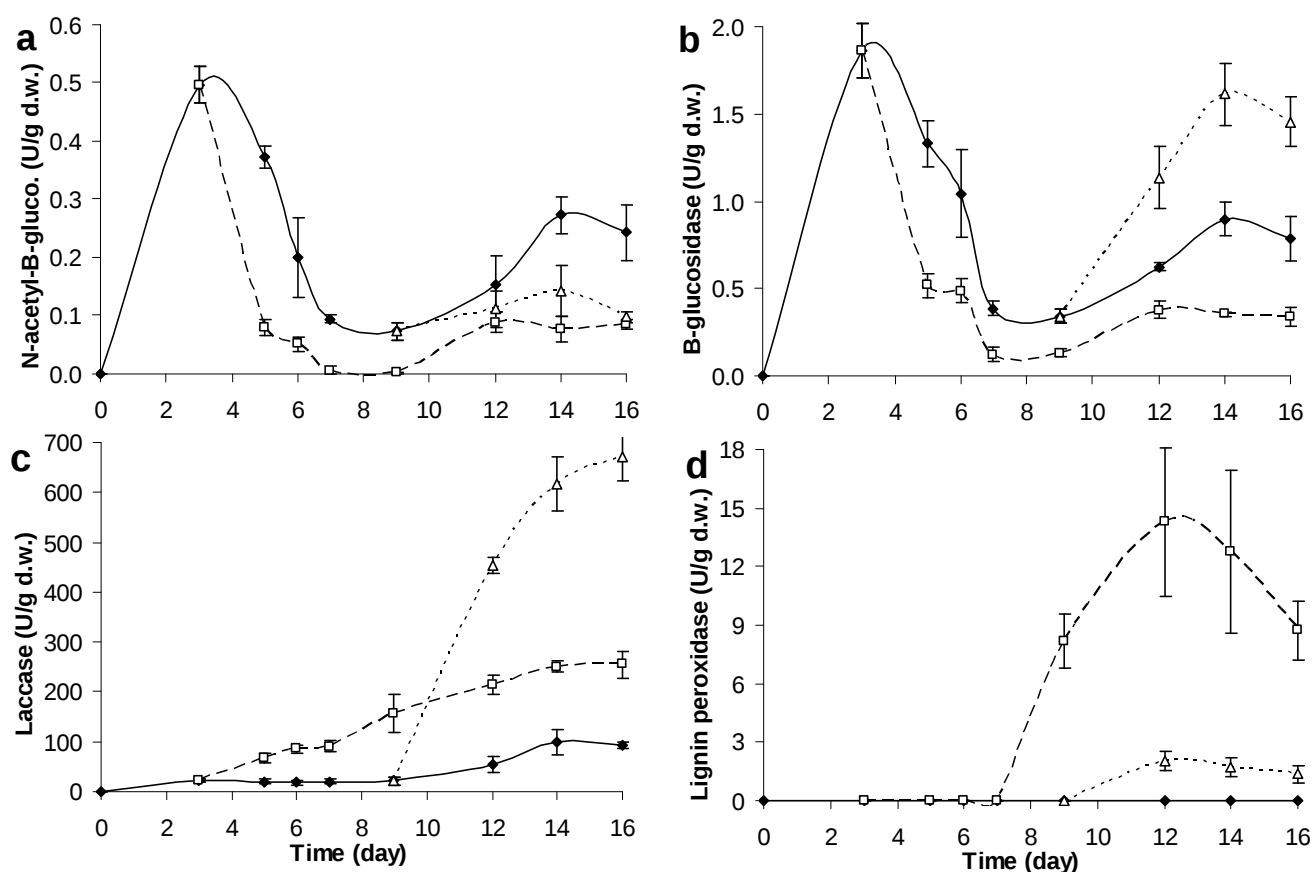


Figure IV.5. Responses of extracellular hydrolase (a, β -glucosaminidase; b, β -glucosidase) and oxidase (c, laccase; d, lignin peroxidase) activities to Cu at 200 ppm in *Trametes versicolor*. Symbols: unexposed (—●—) or exposed to Cu added during the growth (--□--) or stationary (--△--) phases. The values are means $\pm$ SEM ($n=9$).

Table IV.1. Averages and peaks of extracellular activities (U/g d.w.), and effect of copper in cultures of *Trametes versicolor*

	Copper addition					
	Control		Growth phase		Stationary phase	
	Average	Peak (day)	20 ppm	200 ppm	20 ppm	200 ppm
Acid phosphatase	2.00	4.26 (5)	107	52*	76	44
β -glucosidase	0.93	1.86 (3)	142	43*	174	182*
N-acetyl- β -glucosaminidase	0.24	0.50 (3)	98	25*	89	55*
β -galactosidase	0.29	1.04 (14)	138	21*	164	90
Mn-peroxidase	11.66	34.36 (14)	125	330*	76	149
Laccase	36.33	98.13 (14)	169*	418*	133	730*

Number in parentheses indicates the day of activity peak. Effect of copper on activities expressed in % of control is in italic.

* Significant effect of copper during the exposure period ($p < 0.05$).

2.5. Effect of copper on extracellular enzymes

The exposure of *T. versicolor* to Cu showed that the metal modifies the production of extracellular enzymes. However, this response was dose-dependent. Applied at 20 ppm, Cu slightly altered the secretion profiles of hydrolases and oxidoreductases compared to the controls, whatever the development phase to which the fungus was exposed (see examples in **Fig. IV.4**). Only the laccase production was significantly stimulated by a factor of 1.7 during the exposure period when Cu was added in growth phase (**Table IV.1**). Applied to 200 ppm, Cu highly modulated the extracellular activities (**Fig. IV.5**). In every exposure phase except for β -glucosidase, all hydrolase activities were decreased by Cu (see N-acetyl- β -glucosaminidase, **Fig. IV.5a**). The β -glucosidase activity was increased when the metal was added in the stationary phase (**Fig. IV.5b**). The production of extracellular oxidoreductases, such as laccase and Mn-peroxidase, increased substantially by Cu at 200 ppm (see laccase, **Fig. IV.5c**). Moreover, the exposure of *T. versicolor* to Cu resulted in a specific response of lignin peroxidase produced only during the decline phase (**Fig. IV.5d**). However, the intensity of enzyme responses to Cu depended on the phase development (**Table IV.1**). Acid phosphatase, N-acetyl- β -glucosaminidase, β -galactosidase and peroxidases were more sensitive to a metal addition during the growth phase than during the stationary phase. It was the opposite situation for laccase.

5. Discussion

Among filamentous fungi, the rot-white species were studied especially for their ligninolytic oxidases. However, the knowledge about both their extracellular hydrolases and functional diversity is still limited. In the present study, it was shown that *T. versicolor* produced extracellular hydrolases, such as acid phosphatase or glycosidases (β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase). These hydrolases are involved in the intake of phosphorus and the degradation of natural polymers such as cellulose or chitin. The distribution of enzymatic activities in different fungal compartments provided a snapshot of the localization of the enzymes. Hydrolases were essentially associated with cells, i.e. in membrane and intracellular compartments. It could be explained by the involvement of the glycosidases in the degradation of di-saccharides which can enter the cell by permeases (Seiboth et al., 2005). By contrast, ligninolytic enzymes known to depolymerase extracellular substrates (Baldrian, 2003; Bouws et al., 2008) were preferentially found in the outside environment. This is in agreement with the identification of signal peptides involved in the secretory pathways in genes coding for lignin and Mn-peroxidases in *T. versicolor* (Johansson & Nyman, 1996).

The present study showed that the secretion of both total proteins and enzymes depends on the physiological state of *T. versicolor* in these culture conditions. During the growth phase, there was a panel of oversecreted proteins including acid phosphatase, β -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase. During the decline phase, the protein secretion was highly stimulated, related to the increase of some activities, such as laccase, Mn-peroxidase and β -galactosidase. When the fungus was submitted to nutrient exhaustion like carbon limitation, it could thus activate metabolic alternative pathways associated with a new enzymatic production pattern. For example, it is known that the production of laccases and peroxidases are increased when medium carbon exhausts (Orth et al., 1991). A release of intracellular proteins due to the cell lysis observed during the decline phase can not be excluded. However, ligninolytic oxidoreductases are known to be constitutively produced at the extracellular level in several fungi of different taxons (Bollag & Leonowicz, 1984; Orth et al., 1991; Crowe & Olsson, 2001; Baldrian 2003). Moreover, β -galactosidase activity is basically extracellular in *Hypocrea jecorina*, also known for several filamentous fungi, including *Aspergillus* and *Penicillium* species (Seiboth et al., 2005). In addition, alkaline

phosphatase which was only intracellular, was not found in extracellular medium during the cell lysis.

By their adaptation mechanisms to different stressors including metal tolerance and their involvement in nutrient cycles (Kjoller & Struwe, 2002; Nannipieri et al., 2002; Baldrian, 2003), fungi are of ecological relevance. In the present study, copper, one main metallic contaminant in soils from agrosystems was tested (Parat et al., 2002; Heijerick et al., 2006; Laguerre et al., 2006). The originality of the present study is to test the impact of copper on enzymatic equipment according to the fungal physiological state. Results of the present study showed that the response of extracellular enzymes to the metal was dose-dependent in *T. versicolor*. The copper addition at a geochemical level (20 ppm) slightly altered the secretion profiles of enzymes. At a higher contamination level (200 ppm), Cu modified the secretion profiles of hydrolases and oxidoreductases independently of physiological state of *T. versicolor*. Generally, the production of hydrolases was decreased by Cu whereas that of oxidoreductases was highly increased. But the sensitivity of enzymatic responses depended on the physiological state of the fungus and the type of secreted enzyme. A decrease in activities of cellulolytic hydrolases including β -glucosidase, has also been observed in the presence of Cu in *Pleurotus ostreatus* (Baldrian et al., 2006). Insofar as incubations of extracellular enzymes were performed in the presence of copper; this decrease in hydrolase activities was not due to an interaction of Cu with enzymes at the extracellular level in the present study (data not shown). Among tested hydrolases, only β -glucosidase gave a controversial response according to the exposure phase. Its activity was stimulated only when Cu was added during the stationary phase. This process may be due to cell lysis accentuated in the presence of the metal (**Fig IV.1.**), releasing consequently intracellular β -glucosidases. However, that was not observed for other hydrolases. An increase in ligninolytic oxidoreductases, like Mn-peroxidase and laccase, has been reported in the presence of Cu in different filamentous fungi (Collins & Dobson, 1997; Crowe & Olsson, 2001; Levin et al., 2002; Baldrian et al., 2006). We showed that the exposure of *T. versicolor* resulted in a specific response of lignin peroxidase (**Fig. IV.5d**). This enzyme, not detected in control cultures, was specifically produced in the presence of Cu which has not reported in the literature. The stimulation of oxidase production can be explained by a metal action at transcriptional level. Indeed, Metal Responsive Elements or MRE have been characterized on the laccase gene in *P. ostreatus* (Giardina et al., 1999) and on a gene cluster coding for Mn- and lignin peroxidases in *T. Versicolor* (Johansson & Nyman, 1996). Thus, it has been observed that RNA coding for a

laccase is increased in the presence of Cu in *T. versicolor* (Collins & Dobson, 1997). By the presence of MRE on their genes, the oxidoreductases could be pertinent fungal biomarkers of metal exposure in more complex environment.

In summary, filamentous fungi represent one of major biomass in the terrestrial ecosystems and are essentials for their functioning. Among these microorganisms, *T. versicolor* produces both hydrolases and oxidoreductases involved in the cycles of nutrient elements. The exposure of this fungus to copper stress modulates the secretion of enzymes. Since a metal stress can lead to functional modulations independently of the fungal physiological state, the response of these biochemical actors may be used as biomarkers of copper contamination. The fact that oxidoreductases are preferentially secreted and highly stimulated during the metal stress makes these enzymes useful for this purpose. Finally, the present study constitutes a first step in the understanding of the regulation and the secretion of functional systems of fungi and their response to a metal stress in order to improve enzymatic tools for ecotoxicity assessment. By inoculation of fungi specialized in the oxidoreductase production in copper contaminated soils, further studies should allow to assess the influence of complex properties of soil on these functional responses.

Acknowledgements: The present study was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique and by the Conseil Régional de Haute Normandie.

CHAPITRE V

Impact des métaux sur les profils fonctionnels fongiques

Article 3

« Les profils de sécrétion des champignons sont affectés par les métaux : étude du système enzymatique extracellulaire chez *Trametes versicolor* »

Article soumis à *Applied Microbiology and Biotechnology*

Secretion profiles of fungi as affected by metals: a study of extracellular enzymatic system in *Trametes versicolor*

Authors

Jérémy D. Lebrun^{1,2} • Nathalie Demont-Caulet^{3,4} • Nathalie Cheviron¹ • Karine Laval² •
Isabelle Trinsoutrot-Gattin² • Christian Mougin¹

Affiliations

¹ INRA, UPR 251 Physico-chimie et Ecotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés,
Route de St Cyr, RD 10, 78026 Versailles cedex, France

² ESITPA, Laboratoire BioSol, 3 rue du Tronquet, 76134 Mont-St-Aignan cedex, France

³ Université Paris-Diderot, UFR Sciences du Vivant, Bâtiment Lamarck, 35 rue Hélène Brion,
75205 PARIS cedex 13

⁴ INRA, UPR 501 Biologie Cellulaire, Route de St Cyr, RD 10, 78026 Versailles cedex,
France

Corresponding author: Jérémy D. Lebrun
jlebrun@versailles.inra.fr

Résumé - Le lien entre la sécrétion du système extracellulaire et un stress chimique est encore mal connu chez les champignons. Dans cette étude, nous avons investigué l'effet du Zn, Cu, Pb et du Cd testé seul ou en cocktail équimolaire sur les profils de sécrétion de *Trametes versicolor* au niveau enzymatique et protéique. Pour ce faire, des hydrolases (phosphatase acide, β -glucosidase, β -galactosidase et N-acétyl- β -glucosaminidase) et des oxydases extracellulaires (laccase, Mn-peroxydase) ont été suivies dans des cultures liquides. Le sécrétome fongique a été analysé par électrophorèse et la sécrétion de la laccase a été caractérisée par western-blot et spectrométrie de masse. Nos résultats ont montré que toutes les activités hydrolases sont inhibées par les métaux testés seuls ou en cocktail alors que les activités oxydases sont spécifiquement stimulées par le Cu, Cd et le cocktail métallique. Au niveau protéique, les expositions métalliques modifient les profils électrophorétiques du sécrétome fongique et affectent la diversité des protéines sécrétées. Deux isoenzymes de laccase, LacA et LacB, identifiées par spectrométrie de masse sont différenciellement glycosylées selon l'exposition métallique. La quantité de LacA et de LacB sécrétées est fortement corrélée à la stimulation de l'activité laccase par le Cu, Cd et le cocktail métallique. Ces modifications fonctionnelles et post-traductionnelles confortent l'hypothèse que les enzymes fongiques pourraient être des biomarqueurs d'exposition aux métaux.

Mots-clés : Hydrolases, Oxydases ligninolytiques, Laccase, Sécrétome, Biomarqueurs, Cocktail métallique

Abstract - The knowledge of the link between the secretion of extracellular system and a chemical stress is still limited in fungi. In the present study, we investigated the effect of Zn, Cu, Pb and Cd tested alone or in equimolar cocktail on the secretion profiles at enzymatic and protein levels in *Trametes versicolor*. For that purpose, extracellular hydrolases (acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) and ligninolytic oxidases (laccase, Mn-peroxidase) were monitored in liquid cultures. Fungal secretome was analyzed by electrophoresis and laccase secretion was characterized by western-blot and mass spectrometry. Our results showed that all hydrolase activities were inhibited by the metals tested alone or in cocktail whereas oxidase activities were specifically stimulated by Cu, Cd and metal cocktail. At protein level, metal exposures modified the electrophoretic profiles of fungal secretome and affected the diversity of secreted proteins. Two laccase isoenzymes, LacA and LacB, identified by mass spectrometry were differentially glycosylated according to the metal exposure. The amount of both secreted LacA and LacB was strongly correlated with the stimulation of the laccase activity by Cu, Cd and metal cocktail. These functional and post-translational modifications of extracellular system suggest that fungal enzymes could be used as biomarkers of metal exposure.

Keywords: Hydrolases, Ligninolytic oxidases, Laccase, Secretome, Biomarkers, Metal cocktail

1. Introduction

Multiple metal contaminations due to human activities have become a major environmental and health problem. The release of metals into the terrestrial ecosystems has led to their important accumulation in biota and often alters biological systems. These non-biodegradable contaminants travel up the trophic chains and enter bioaccumulation processes (van Gestel 2008). Thus, essential metals in excess as well as metals with no biological role can result in adverse effects for living organisms, and consequently on the terrestrial ecosystem functioning. However, the metal assessment on biota remains a research subject because of the lack of efficient tools.

Since fungi represent one of the largest biomass in terrestrial ecosystems, the response of their extracellular enzymatic systems to metals offers promising perspectives for ecotoxicological assessment, providing the mechanisms of metal action are well known. By their ability to adapt their metabolism to various nutrient sources, saprophytic fungi are key colonizers of ecological niches and play a major role in the terrestrial ecosystem functioning (Kjøller and Struwe 2002; Bouws et al. 2008). These microorganisms produce extracellular enzymes involved in the nutrient mobilization and mineralization of biopolymers. Proteomic studies of the totality of secreted proteins, the secretome, have recently begun to emerge in fungi (Kim et al. 2007). Although a great number of extracellular proteins still remains to be identified, various types of hydrolases and oxidases were characterized (Oda et al. 2006; Sato et al. 2007). However, saprophytic fungi considered as the predominant degraders of lignin, have been rather studied for their set of ligninolytic oxidases, such as laccases or peroxidases, for biotechnological, industrial and environmental applications (Mougin et al. 2003; Ikehata et al. 2004). In spite of these investigations, the functional diversity and secretion of extracellular enzymatic system in biological or stress state in fungi is still limited.

Although fungi have mechanisms for metal tolerance, the activity of their extracellular enzymes can be modulated during metal exposure (Baldrian 2003). Metals, such as Cu, Zn, Mn or Pb, modify the activity of cellulolytic hydrolases and ligninolytic oxidases in *Pleurotus ostreatus* (Baldrian et al. 2006). In particular, Cu is known to increase the extracellular laccase in different filamentous fungi (Crowe & Olsson 2001; Baldrian et al. 2003 and 2006). This oxidase response to metals has been explained at transcriptional level. Collins and Dobson (1997) showed that the stimulation of laccase activity by Cu corresponds to an

increase in its mRNA in *Trametes versicolor*. Indeed, Metal Responsive Elements, or MRE, have been characterized in the gene of laccase in *Pleurotus ostreatus* (Giardina et al. 1999) and in a gene cluster coding for manganese- and lignin-peroxidases in *T. versicolor* (Johansson and Nyman 1996). Furthermore, laccase can be induced as different glycosylated isoforms after exposure to 2,5-xyldine, a well known organic inducer of fungal laccases (Bertrand et al. 2002a; Kollmann et al. 2005). To our knowledge, such post-translational modifications have not been observed after metal exposures. Thus, these functional and post-translational modifications could provide fungal biomarkers for metal ecotoxicity assessment. But the influence of metals on the extracellular enzymatic system in fungi remains poorly documented, limiting the predictive interest of such fungal biomarkers.

In the present study, we investigated the effect of metals on secretion profiles at enzymatic and protein levels in an efficient lignin-degrading fungus, *T. versicolor*. The fungus was exposed to essential metals, Zn or Cu, and non-essential metals, Pb or Cd in liquid cultures. Assays with metal cocktails were realized in order to reflect multiple contaminations. At enzymatic level, we monitored the activities of two main enzyme families involved in the terrestrial ecosystem functioning, hydrolases (acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) and ligninolytic oxidases (laccase, Mn-peroxidase). At protein level, a comparative analysis in electrophoresis of total extracellular proteins was carried out to provide an overview of secretion profiles. The laccase secretion was characterized by western-blot and mass spectrometry.

2. Material and methods

2.1. Culture conditions and metal exposures

Trametes versicolor ATCC 32745 was grown on a liquid culture medium, containing maltose and ammonium tartarate as carbon and nitrogen sources (Lesage et al. 1996). A mycelium mat on agar plugs (10 mm diam.) was inoculated into 10 ml of culture medium in 150 ml Erlenmeyer flasks. Cultures were carried out statically in the dark at 25 °C. After 3 days of incubation, 100 µl of ZnSO₄, CuSO₄, CdSO₄ or PbCl₂ sterilized by filtration (0.2 µm pore size membrane) were added into liquid cultures at final concentrations of 0.25 or 1 mM. Experiments with cocktails of four metals in equimolarity were realized at final concentrations of 0.25, 1 and 4 mM. Controls were realized without added metal and the experiments were carried out with three independent replicates per treatment.

After 5 days of metal exposure, mycelia were harvested by a nylon screen (40 µm) and dried for 48 h at 80 °C to determine the fungal biomass, also used as a toxicity indicator. The mycelium free culture was filtrated through a 0.2 µm-filter and used for the extracellular activity assays, the quantification of secreted proteins by the Bradford method using bovine serum albumin as a standard (Bradford 1976), and the protein preparation for electrophoresis.

2.2. Activity assays

Acid phosphatase (EC 3.1.3.2), β-glucosidase (EC 3.2.1.21), β-galactosidase (EC 3.2.1.23), and N-acetyl-β-glucosaminidase (EC 3.2.1.30) activities were assayed using their respective substrates of conjugated p-nitrophenol (Sigma-Aldrich). Assays were carried out in 96-well microplates, by mixing 160 µl of substrate solution (25 mM) in acetate buffer (pH 4.5, 0.1 M) with 40 µl of enzymatic samples, followed by incubation at 37 °C. After 45 min, 50 µl of Na₂CO₃ (1 M) was added to stop the reaction. The liberation of p-nitrophenol by enzymatic hydrolysis of the substrate was determined at 405 nm (Keshri and Magan 2000). The standard solutions of p-nitrophenol were treated in the same way as samples.

Laccase (EC 1.10.3.2) and manganese-peroxidase (EC 1.11.1.14) activities were measured respectively by monitoring the oxidation of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) acid at 420 nm in citrate/phosphate buffer (CPB; 0.1 M, pH 3.0) (Wolfenden and

Willson 1982) and the oxidation of 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one at 334 nm in CPB (pH 5.0) in the presence of MnSO_4 and H_2O_2 (Paszczyński et al. 1986). Solutions of enzymes were added to a final volume of 1 ml.

Activities were measured in triplicate and expressed in U/g dry weight of fungal biomass. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed 1 μmol substrate in 1 min. Controls performed from boiled enzymatic extracts to inactivate the activities, were treated in the same way as the samples.

2.3. Extracellular protein preparation for electrophoresis

The extracellular filtrates were concentrated 100-fold by an Amicon 10 kDa filter at 4°C and resuspended in 10 ml of Tris-HCl buffer (pH 6.8, 50 mM) twice to remove salts. For protein precipitation, cold acetone with 0.07% β -mercaptoethanol (- 20°C) were added in concentrated protein solutions (3:1 v/v). After mixing and incubation of 30 min at - 20°C, the samples were centrifuged at 14 000 g for 10 min. The pellets were washed with cold acetone and then air-dried. The dry protein pellets were dissolved in 200 μl -solution containing 2 % SDS, 8 M urea and 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) and incubated 24 h at 4 °C. The proteins were separated by SDS-PAGE (poly-acrylamide gel electrophoresis) using 4% stacking gel and 12.5% separating gel at 110 V with Mini-protean electrophoresis cell (Biorad) and proteins were stained using the Coomassie Blue standard method (Biorad). Glycosylated isoforms of laccases induced by exposure of *T. versicolor* to 2,5-xyldine were purified as described by Bertrand et al. (2002^b), and used as controls for the laccase characterization. The molecular weights were estimated by comparison with a commercial protein mixture (Precision plus protein standards, Biorad). Electrophoresis gels were done from three independent sets.

2.4. Western Blot and sample preparation for LC-MS

The proteins were electro-transferred (0.8 mA/cm² of gel) from the electrophoresis gel to a nitrocellulose membrane using a Trans-blot cell (Biorad). Detection of laccase on the membrane was performed with rabbit anti-bodies in combination with goat anti-rabbit Ig conjugated with alkaline phosphatase (Jolivalt et al. 2005). The intensity of revealed spots was quantified by imager (ImageQuant, Amersham) and related to the dry weight of fungal biomass. Western blots were done in triplicate.

Bands of interest were excised from the electrophoresis gel and destained by sequential washing with 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate. The samples were then reduced with dithiothreitol and alkylated with iodoacetamide according to the procedure described by Jolivald et al. (2005). After digestion with trypsin, the resulting peptides were extracted from the gel pieces according to standard protocols. The peptide mixtures were separated by nanoflow liquid chromatography (LC) (Switchos-ultimate II, Dionex) and analyzed in a quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometer (MS) (QTOF global, Waters) equipped with spray ion source. Acquired spectra were searched against the protein databases of Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

2.5. Statistical analyses

Means and standard errors (SE) were calculated from three independent cultures for each measured biological variable. Statistical analyses were performed by XLStat (Addinsoft). The significant differences were tested with $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Growth and protein secretion as affected by metals

The ability of *Trametes versicolor* to grow in the presence of metals was monitored in liquid cultures. The results after 5 days of metal exposures are given in **Figure V.1A**. Zn and Pb did not significantly modify the biomass production of the fungus compared to the unexposed control. On the contrary, Cu and Cd had toxic effect at 1 mM by decreasing the biomass production at 80% and 71% of control biomass respectively. The fungal exposure to metal cocktails at 1 and 4 mM led to decrease in the fungal biomass about 81% and 77% respectively.

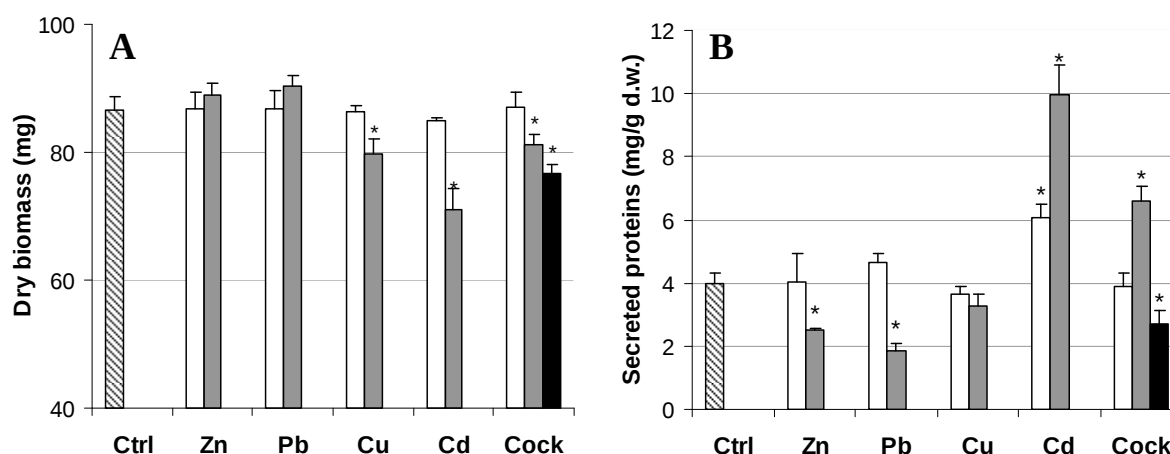


Figure V.1. Fungal biomass (A) and total proteins secreted (B) by *Trametes versicolor* exposed for 5 days to Zn, Pb, Cu or Cd tested alone or in equimolar cocktail. Symbols: final concentrations of 0.25 (□), 1 (■) or 4 mM (■). The values are mean $\pm$ SE for triplicate cultures (* $p < 0.05$).

The quantification of total proteins secreted by *T. versicolor* after exposure to metals tested alone or in cocktail is shown in **Figure V.1B**. At 0.25 mM, metals had no significant effect on the amount of secreted proteins, except for Cd. At 1 mM, Zn and Pb decreased the protein secretion about 2-fold whereas Cd increased this secretion about 2.5-fold compared to the unexposed control. Without effect at 0.25 mM, the metal cocktails provided contrasted effects on the protein secretion for the highest concentrations. The amount of extracellular proteins was increased at 1 mM whereas it was decreased at 4 mM.

3.2. Functional responses to metals

T. versicolor produced significant amounts of both extracellular hydrolases (acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) and oxidases (laccase, Mn-peroxidase) during liquid cultures. The production of these extracellular enzymes shown in **Figure V.2**, is modulated after 5 days of metal exposure. These functional responses to metals differ according to the enzyme family.

Concerning to the hydrolases, their production were decreased by all metals tested alone or in cocktail, but this response was not dose-dependent. Some metal exposures of *T. versicolor* led to total inhibitions of hydrolase activities. No β -galactosidase activity was found in the presence of Pb or the cocktail at 4 mM and no N-acetyl- β -glucosaminidase activity in the presence of Pb or Cd at 1 mM, or the cocktail at 4 mM. Concerning to the oxidases, their production was increased only by Cu, Cd or metal cocktails. However, the sensitivity of oxidase response to metals depended on the concentration and considered enzyme. The laccase activity was stimulated from 0.25 mM of Cu, Cd or cocktail as dose-dependent way whereas the Mn-peroxidase activity was stimulated only from 1 mM.

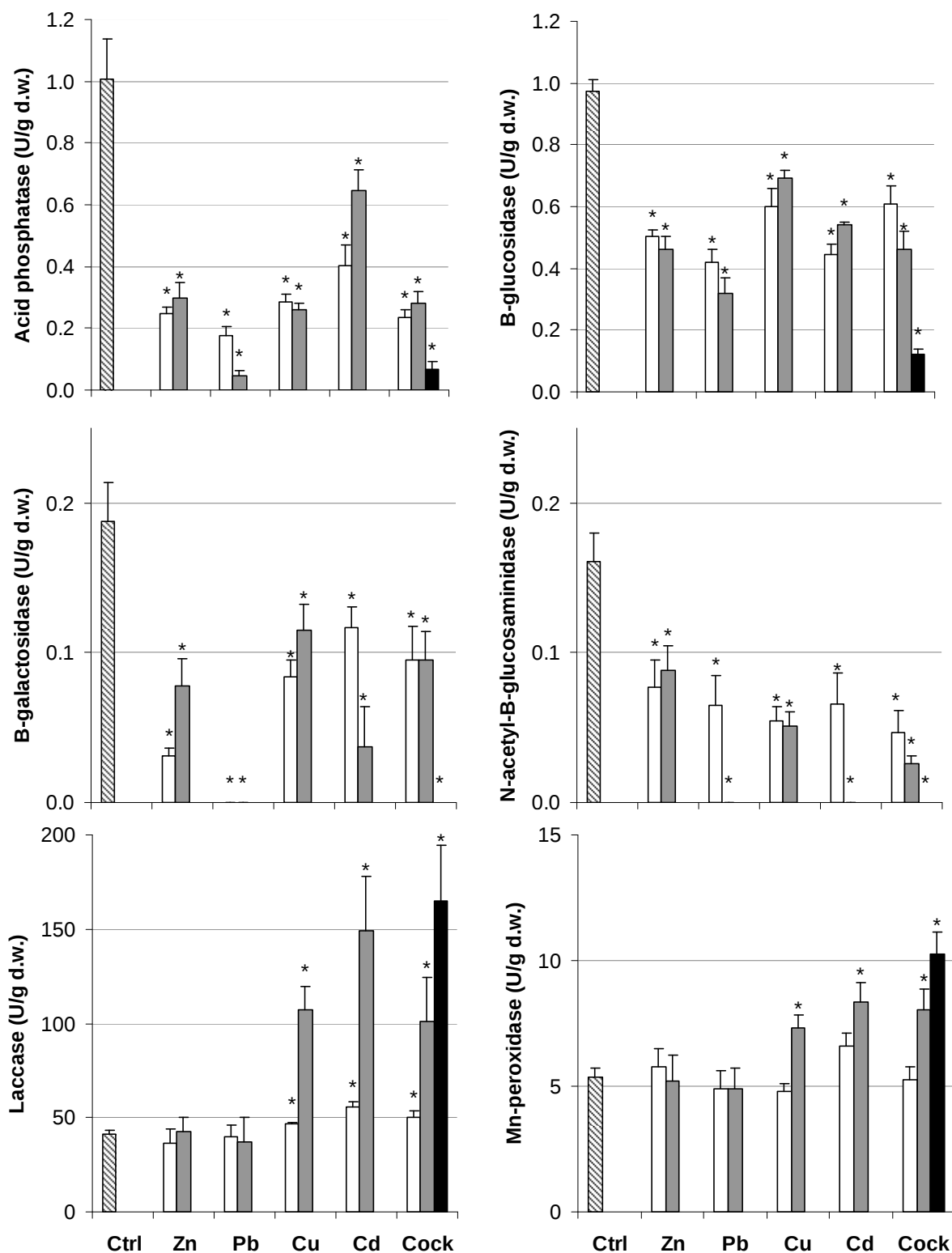


Figure V.2. Response of extracellular hydrolases and oxidases of *Trametes versicolor* exposed for 5 days to Zn, Pb, Cu or Cd tested alone or in equimolar cocktail. Symbols: final concentrations of 0.25 (□), 1 (■) or 4 mM (■). The values are mean ± SE for triplicate cultures (* p < 0.05).

3.3. Electrophoretic profiles as affected by metals

The total secreted proteins of *T. versicolor* exposed for 5 days to metals alone or in cocktail were run in electrophoresis. Electrophoretic profiles obtained for the highest concentrations are shown in **Figure V.3**. In the absence of metal, the protein separation in electrophoresis allowed to distinguish about 15 bands in our conditions. The majority of secreted proteins exhibited of molecular masses of 40-100 kDa. The metal exposures led to the modifications of electrophoretic profiles compared to the control. In the presence of Cu, the intensity of the 50 kDa-band is strongly increased. In the case of Pb, we can observe a decrease in the diversity of secreted proteins with the disappearance of bands. This decrease was more important in the presence of cocktail at 4 mM. In all culture conditions, a 59 kDa-band corresponding to that of purified laccase isoforms induced by xyldine was observed.

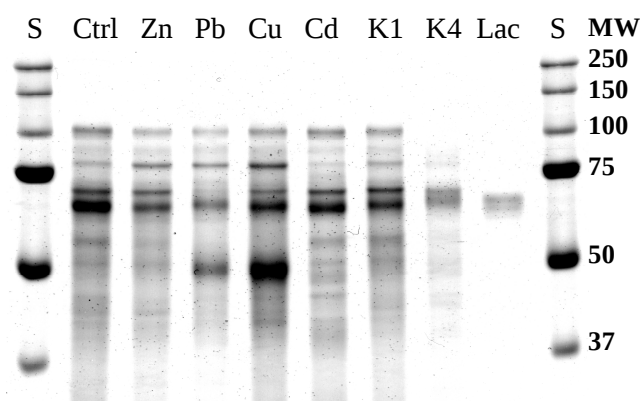


Figure V.3. Electrophoresis analysis of secretomes of *Trametes versicolor* exposed for 5 days to Zn, Pb, Cu, or Cd at 1 mM or metal cocktails at 1 (K1) or 4 mM (K4). 1/10 of total secreted proteins for each culture conditions were run in electrophoresis gel (12.5%). Symbols: S, standard proteins; Lac, glycosylated laccase isoformes induced by xyldine.

3.4. Characterization of laccase secretion

The laccase secretion was characterized by western-blot and obtained spots are shown in **Figure V.4**. Results confirmed the presence of laccase around 59 kDa. A slight difference of 5 kDa was observed according to the metal exposure. At 4 mM, the metal cocktail gave 2 spots suggesting the presence of laccases differentially glycosylated, as observed with laccase

isoforms induced by xyloidine. It is noted the appearance of another laccase at around 50 kDa whose the migration is slightly affected by the metal exposure. In the absence of metal, the quantification of spots by imager (**Fig. V.4B**) showed that the 59 kDa-laccase is 5-fold more secreted than the 50 kDa-laccase. The spot intensity of these two laccase isoenzymes is notably increased in the presence of Cu, Cd and metal cocktails.

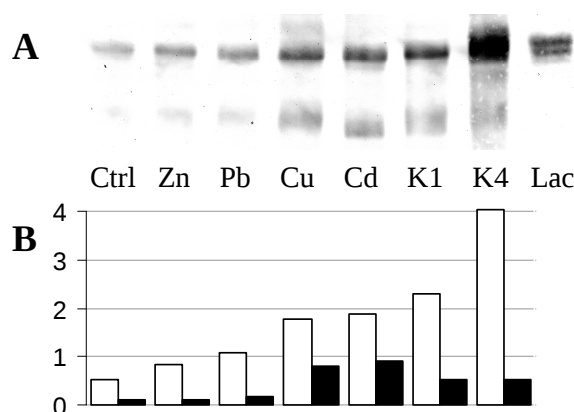


Figure V.4. Western Blot of laccases (**A**) and quantification by imager (**B**) of 59 kDa (□) and 50 KDa-laccase (■) isoenzymes of *Trametes versicolor* exposed for 5 days to Zn, Pb, Cu, or Cd at 1 mM or metal cocktails at 1 (K1) or 4 mM (K4). Lac, glycosylated laccase isoformes induced by xyloidine.

The 59 and 50 kDa-bands from electrophoresis gels were analyzed by using LC-MS. These obtained peptic spectra allowed to identify of the two laccase isoenzymes. The 59 kDa-band corresponded to a sequenced laccase isoenzyme of type A, called LacA (accession number D13372), and the 50 kDa-band to laccase isoenzyme of type B, called LacB (accession number U44430). The characteristic peptides of each isoenzyme are given in **Table V.1**. They covered 21 % and 27.9 % of protein sequences of LacA and LacB respectively.

Table V.1. Characteristic peptides of two laccase isoenzymes identified by mass spectrometry from unexposed cultures of *Trametes versicolor*

Sequence	E value	Mass (Da)	Accession no.
Type A		55826	D13372
STSIHWHGFFQK	0.00017	1473.7	(T. versicolor)
LGPAPPLGADATLINGK	2.2e-006	1653.9	
SAGSTVYNYDNPIFR	0.0036	1702.8	
SPSTTTADLSVISVTPGK	7.3e-006	1759.9	
SPSTTTADLSVISVTPGKR	6.7e-011	1916.0	
ANPNFGNVGFTGGINSAILR	6.2e-008	2018.0	
QAVVVNGGTPGPLITGNMGDR	0.017	2068.1	
Type B		55771	U44430
MPVPGSPTPGGVDK	0.00049	1353.6	(T. versicolor)
FPLGADATLINGLGR	3.6e-006	1513.8	
DAIVVNGVVPSPITGK	7.4e-006	1677.9	
SASTPTAALAVINVQH GK	2.8e-007	1763.9	
SASTPTAALAVINVQH GK	3.8e-008	1920.0	
ANPNFGTVGFAGGINSAILR	7.6e-008	1975.0	
YDVDNESTVITLTDWYHTAAR	7.2e-007	2469.1	
YQGAPVAEPTTTQTPSVIPLIETNLHPLAR	2.6e-005	3213.7	

4. Discussion

The improvement of the knowledge on the functional diversity of fungal communities contribute to progress in the understanding of terrestrial ecosystem functioning. Saprophytic fungi were particularly studied for their ligninolytic oxidase set. However, the knowledge about both their extracellular hydrolases and functional diversity is still limited. Our results showed that *T. versicolor* produces extracellular hydrolases (acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) involved in the cycling of phosphor and the degradation of natural polymers such as cellulose and chitin. This fungus known for the lignin-degrading efficiency is thus able to use other nutrient sources. Despite a toxic effect of Cu and Cd at high concentrations, *T. versicolor* is tolerant to metals suggesting its ability to grow in environment contaminated by metals. It is known that fungi have adaptation mechanisms to different stresses including metal exposure (Baldrian 2003). Thus, fungi have ecological potential for the development of exposure biomarkers to metals in terrestrial ecosystems.

In this present study, we hypothesized that metals modify the fungal secretion profiles. The metal impact on the extracellular enzymatic system of *T. versicolor* was assessed by exposures to essential or no biological role metals tested alone or in cocktail, more representative of multiple contaminations of ecosystems. When the fungus is exposed to Zn, Pb, Cu or Cd, all hydrolase activities are decreased in *T. versicolor*. But the response of extracellular hydrolases is not dose-dependent. Pb exhibits the stronger inhibitive effect, with 75 and 91 % average inhibitions of all tested hydrolase activities at 0.25 and 1 mM respectively. This average inhibitive effect of other metals, Zn, Cu and Cd is ranged between 55-65 %. A decrease in activities of cellulolytic hydrolases has also been observed in the presence of Cu, Mn and Pb in *Pleurotus ostreatus* (Baldrian et al. 2006). By contrast, oxidase activities — laccase and Mn-peroxidase — are specifically stimulated by Cu and Cd whereas Zn and Pb have no effect on these activities. The stimulation of laccase activity by Cu, known in different fungi (Crowe & Olsson 2001; Baldrian et al. 2006), is explained at transcriptional level in *T. versicolor* (Collins and Dobson 1997). Furthermore, MRE sequences were found on genes coding for laccases or peroxidases in various fungi (Johansson and Nyman 1996; Giardana et al. 1999). When the fungus is exposed to metals in cocktail, the response of functional system is dose-dependent. Thus, the cocktails at 0.25, 1 and 4 mM lead to the average inhibitions of tested hydrolase activities are 59, 65 and 95 % respectively. The

sensitivity of oxidase response to metals also depends on the considered enzyme. Although testing metals in cocktail is an original approach, it is difficult to discriminate the part of each metal on these functional responses. Indeed, neither the total concentration of cocktails nor the concentration of each metal in the cocktails is correlated to the effect of a metal taken alone. There may be competition processes between the metals in their distribution in different fungal compartments and in internalization/externalization processes (Hu et al. 2003).

In order to obtain an overview of protein secretion profiles, a comparative analysis in electrophoresis of total secreted proteins was carried out between a biological or metal stress states of *T. versicolor* (**Fig. V.3**). Although our objective was not to identify the extracellular proteins, the electrophoretic profile showed a diversity of secreted proteins in the absence of metal. In our conditions, it is noted that the separation of extracellular proteins by monodirectional electrophoresis is limiting. In metal stress conditions, the fungal secretion profiles are altered. Pb at 1 mM and metal cocktail at 4 mM led to the most important decreases in protein diversity. That is consistent with the decrease in amount of total secreted protein and in hydrolase activities. Thus, metals affect the regulation of extracellular system secretion in the fungus. To confirm this metal impact, we chose to characterize the laccase secretion in *T. versicolor* because the regulation mechanisms of oxidases are better known than those of hydrolases. We have thus identified two isoenzymes of laccase around 59 and 50 kDa, LacA (accession number D13372) and LacB (accession number U44430) respectively. Although the alignment of their protein sequences showed a similarity near 65%, these two isoenzymes belong to distinct phylogenetic groups (Cassland and Jönsson 1999; Necochea et al. 2005). LacA 5-fold more secreted than LacB in our culture conditions is known to be the major isoenzyme in *T. versicolor* (Cassland and Jönsson 1999; Mougin et al. 2003) and to be induced by organic compounds such as xylinine (Bertrand et al. 2002a).

Our results showed that metals can induce the production of LacA, but also that of LacB which is not yet described in the literature to our knowledge. We found a strong correlation between the total amounts of secreted laccase isoenzymes and the stimulation of laccase activity by Cu, Cd and metal cocktails ($y = 3.121x$; $R^2 = 0.89$). We have said previously that metals can act at transcriptional level. However, this present study confirms that the metal action also leads to both the efficient translation and secretion of active laccase isoenzymes. Furthermore, glycosylated isoforms were observed for our two isoenzymes after

metal exposure affecting their migration during the electrophoresis. The glycosylation is a post-translational process favoring the stability and proteolysis prevention of the protein (Yoshitake et al. 1993). In the presence of metal cocktail at 4 mM, an excess in glycosylation leads to the appearance of two glycosylated isoforms for LacA. This isoenzyme is known to be inducible under different glycosylated isoforms by 2,5-xygidine in *T. versicolor* (Bertrand et al. 2002a).

In summary, fungi represent one of major biomass in terrestrial ecosystems and are essentials for their functioning. Among these microorganisms, *T. versicolor* produces hydrolases and oxidases involved in the nutrient cycles. The exposure of the fungus to metals tested alone or in cocktails modifies the secretion profiles at enzymatic and protein levels. In the case of oxidases, the enzymatic responses are specific to some tested metals. Cu, Cd and metal cocktail modulate the secretion of laccase isoenzymes and affect the glycosylation process. Since metals can lead to functional and post-translational modifications, biochemical actors of ecosystem functioning such as fungal oxidases could be used as biomarkers of metal exposure. Further studies are now necessary to validate such enzymatic tools in terrestrial ecosystems for metal ecotoxicity assessment.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from INRA and Région de Haute Normandie. Authors thank C. Jolivalt for valuable comments concerning to the characterization of laccase secretion.

PARTIE C : Oxydases fongiques, biomarqueurs d'exposition aux métaux ?

Un biomarqueur est une réponse biologique spécifique d'un organisme à une exposition à un ou des contaminants (van Gestel & van Brummelen, 1996 ; Violle et al., 2007). Il est donc nécessaire de choisir des organismes d'intérêt écologique, largement réparti géographiquement, et dont les différents stades de vie sont connus (Forbes et al., 2006 ; van Gestel, 2008). Sur un plan finalisé, le biomarqueur doit être facilement mesurable et peu coûteux pour être utilisé dans des programmes de surveillance biologique. En effet, le biomarqueur est considéré comme un système d'alarme précoce traduisant un événement écotoxicologique. De ce fait, il doit répondre à différents critères :

- La réponse biologique de l'organisme à l'exposition à un contaminant doit être constante au cours du temps car un effet transitoire est difficilement mesurable
- Cette réponse doit pouvoir être observée dans un ensemble d'organismes ou une communauté malgré des sensibilités individuelles différentes
- Le biomarqueur d'exposition doit être sélectif à un ou une famille de contaminants
- Il doit pouvoir refléter la fraction active et biodisponible des contaminants dans les écosystèmes.

Dans la partie B, nous avons vu qu'un stress métallique (Cu, Zn, Pb et Cd) affecte la sécrétion du système extracellulaire chez *Trametes versicolor*. Il a été observé des modulations d'activités hydrolases et oxydoréductases indépendamment de l'état physiologique du champignon ainsi que des réponses d'oxydoréductases caractéristiques de l'exposition aux métaux. Les activités de la laccase et de la Mn-péroxydase ont été stimulées par le Cu et le Cd, mais pas par le Zn et le Pb. La lignine-péroxydase est spécifiquement produite lors d'un stress au Cu. En outre, l'exposition du champignon aux métaux a engendré l'augmentation de la sécrétion d'isoenzymes de laccase et des modifications post-traductionnelles, en agissant sur la glycosylation de cette oxydoréductase. En conséquence, les enzymes fongiques pourraient être des biomarqueurs d'exposition aux métaux. Cependant,

- i) ces observations faites à partir de notre modèle biologique restent difficilement extrapolables à l'ensemble de la communauté fongique.
- ii) la spéciation des métaux n'a pas été prise en compte lors de ces études, ce qui n'a pas permis de relier ces réponses fonctionnelles à une forme chimique des métaux.

Ainsi, les études réalisées dans cette partie C ont pour but de répondre à ces derniers points afin de conforter la pertinence de tels biomarqueurs fongiques.

L'objectif du **Chapitre VI** a été de déterminer si il existait une généricité des réponses enzymatiques aux métaux au sein d'une même communauté, celle des champignons filamenteux. Pour ce faire, douze champignons de différents taxons ont été cultivés en milieu liquide et exposés au Cu et au Cd, métaux qui ont été montrés pour stimuler les activités oxydoréductases (Partie B).

Les questions soulevées sont :

- Quelle est la richesse de la diversité fonctionnelle chez les champignons telluriques ?
- Quel est l'impact d'un stress chimique sur l'expression de ce potentiel fonctionnel ?
- Est-ce que la réactivité des champignons vis-à-vis des métaux et la toxicité métallique diffèrent selon la souche utilisée ?
- Est-ce que les oxydoréductases sont stimulées par le Cu et le Cd quelque soit la souche utilisée ?
- Y a t-il des productions spécifiques d'oxydoréductases en présence de métaux ?

L'objectif du **Chapitre VII** a été d'évaluer l'influence de la spéciation des métaux sur la réponse des oxydoréductases. Pour ce faire, *T. versicolor* a été cultivé dans des milieux de culture exhibant différents niveaux de complexation vis-à-vis des métaux. Le champignon a été exposé au Cu, capable de stimuler les oxydoréductases et au Zn, sans effet sur ces activités (Partie B).

Les questions soulevées sont :

- Quelles sont les formes chimiques des métaux actives et biodisponibles ?
- Y a t-il une relation entre la biodisponibilité des métaux et l'intensité de la réponse des oxydoréductases ?
- Est-ce que le fait de favoriser la biodisponibilité du Zn engendre une réponse des oxydoréductases ou reste t-elle spécifique au Cu ?
- Quelle est la sensibilité de la réponse des oxydoréductases ?

CHAPITRE VI

Généricité des réponses enzymatiques aux métaux chez les champignons

« Diversité fonctionnelle chez les champignons telluriques : Profils enzymatiques comme outils pour évaluer l'écotoxicité des métaux ? »

Article en préparation pour *Applied and Environmental Microbiology*

**Functional diversity in soil fungi:
Enzymatic profiles as tools for metal ecotoxicity assessment?**

Authors

Jérémy D. Lebrun^{1,2,*}, Nathalie Demont-Caulet^{3,4}, Karine Laval²,
Isabelle Trinsoutrot-Gattin², and Christian Mougin¹

Affiliations

¹ INRA, UPR 251 Physico-chimie et Ecotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés, Versailles, France.

² ESITPA, Laboratoire BioSol, Mont-St-Aignan, France.

³ Université Paris-Diderot, UFR Sciences du Vivant, Paris, France.

⁴ INRA, UPR 501 Biologie Cellulaire, Versailles, France.

Running title: Fungal enzymes as biomarkers of metal exposure

Corresponding author*: Jérémy D. Lebrun
jlebrun@versailles.inra.fr

Résumé - La relation entre l'expression du potentiel fonctionnel et la réactivité des champignons telluriques à un stress chimique n'est pas connue, ce qui limite alors l'utilisation des profils enzymatiques comme outils pour évaluer l'écotoxicité des métaux. Cette étude a pour but d'évaluer la diversité fonctionnelle comme indicateur d'exposition métallique chez les champignons telluriques. Pour ce faire, 12 champignons isolés de sols ont été testés pour leur capacité à sécréter des hydrolases (phosphatase acide, β -glucosidase, β -galactosidase et N-acétyl- β -glucosaminidase) et des oxydases ligninolytiques (laccase, Mn- et lignine-péroxydases) dans des cultures en milieux liquides. L'impact du Cu et du Cd a été investigué sur des traits physiologiques (croissance fongique et sécrétion protéique) et sur les activités enzymatiques. Nos résultats ont montré que tous les champignons telluriques sécrètent la plupart des hydrolases testées et que 50 % d'entre eux disposent d'un système oxydatif partiel. En présence de Cu ou de Cd, la sécrétion protéique des champignons est stimulée malgré une toxicité des métaux. Au niveau enzymatique, les métaux modifient les profils de sécrétion des champignons. La réponse des hydrolases aux métaux donne des résultats complexes et contrastés. Cette réponse dépend du métal, de l'enzyme et du champignon considérés. Au contraire, le Cu et le Cd stimulent les activités des oxydases ligninolytiques quelque soit la souche fongique. Chez certaines souches, des oxydases extracellulaires sont spécifiquement produites en présence des métaux. La généricité de la réponse des oxydases fongiques suggère que ces acteurs biochimiques du fonctionnement du sol sont des biomarqueurs potentiels d'exposition aux métaux.

Mots-clés : Hydrolases, Laccase, Mn-péroxydase, Lignine-péroxydase, Sécrétion

Abstract - The relationship between the expression of functional potential and the reactivity of soil fungi to a chemical stress is not known, hence limiting the use of enzymatic profiles as tools for metal ecotoxicity assessment. The present study aims to assess the functional diversity as indicator of metal exposure in soil fungi. For that purpose, the ability of 12 fungal strains isolated from soils to secrete hydrolases (acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) and ligninolytic oxidases (laccase, Mn- and lignin-peroxidases) were screened in liquid cultures. The impact of Cu or Cd was investigated both on physiological traits (fungal growth and protein secretion) and enzymatic activities. Our results showed that all soil fungi secreted most tested hydrolases and 50 % of them had a partial oxidative system. In the presence of Cu or Cd, the protein secretion of fungi was stimulated despite a metal toxicity as a general way. At enzymatic level, metals modified the secretion profiles in soil fungi. The response of hydrolases to metals provided contrasted and complex results. This response depended on metal, enzyme and fungus considered. By contrast, Cu and Cd stimulated the activity of ligninolytic oxidases whatever the tested fungal strain. In some strains, extracellular oxidases were specifically produced in the presence of metal. The genericity of the response of fungal oxidases suggests that these biochemical actors of soil functioning could be biomarkers of metal exposure.

Keywords: Hydrolases, Laccase, Mn-peroxidase, Lignin-peroxidase, Secretion

1. Introduction

Filamentous fungi are ubiquitous in soils and key colonizers of ecological niches because of their great ability of biosynthesis and biocatalysis. They play important role in the decomposition of organic matter, nutrient cycling and natural functions of terrestrial ecosystems (Kjoller & Struwe, 2002; Thorn & Lynch, 2007). The improvement of knowledge on the functional diversity in soil fungi is of considerable interest because of their significance for environmental processes and their potential applicability in biotechnological processes. Furthermore, their functional responses to a metal stress could provide tools for ecotoxicity assessment.

Filamentous fungi secrete large enzymatic equipment involved in the mobilization and mineralisation of natural polymers or organic compounds, such as pollutants. Proteomic studies of the totality of secreted proteins, the secretomes, have recently begun to emerge in fungi (Kim et al., 2007). Although a great number of extracellular proteins still remains to be identified; several types of hydrolases or oxydases were characterized. These approaches allowed to show the secretion profiles are modified by the carbon source or a salin stress (Gori et al., 2006; Liang et al., 2007; Sato et al., 2007). However, saprophytic fungi considered as the predominant degraders of lignin and cellulose, have been rather studied for their set of ligninolytic oxidases such as laccases or peroxidases, for biotechnological, industrial and environmental applications (Mougin et al., 2003; Ikehata et al., 2004; Baldrian & Valaskova, 2008). In spite of these investigations in some saprophytic fungus, the expression of functional potential in natural or stress state is still limited in soil fungi.

The release of metals into the soils has led to their important accumulation in biota and often alters biological systems. These non-biodegradable contaminants travel up the trophic chains and enter bioaccumulation processes (van Gestel, 2008). Thus, essential metals in excess as well as metals with no biological role can result in adverse effects for living organisms, and consequently on the ecosystem functioning. However, the metal assessment on biota remains a research subject because of the lack of efficient tools. Since fungi represent one of the largest biomass in soils, the response of their extracellular enzymatic systems to metals offers promising perspectives for ecotoxicological assessment. Although fungi have mechanisms for metal tolerance, metals can lead to physiological, morphological or functional alterations (Baldrian, 2003). At the functional level, the activity of their

extracellular enzymes can be modulated during the metal exposures. In *Pleurotus ostreatus*, the cellulolytic hydrolase activities were generally decreased and the laccase activity was increased by Cu, Zn, Mn or Pb (Baldrian et al., 2006). Cu is known to increase the extracellular laccase in other filamentous fungi (Crowe & Olsson, 2001; Baldrian et al., 2003 and 2006). This oxidase response has been explained by a metal action at transcriptional level (Collins & Dobson, 1991). In a previous study, we showed that Cu, Zn, Cd and Pb modulate the enzymatic activities and the secretion of isoenzymes and glycosylated isoforms of laccases in *T. versicolor* (**Chapitre V**). Since metals lead to functional and posttranslational modifications, characteristic secretion profiles could be related to a metal stress. However, the reactivity of fungi to metals can vary from one species to another (van Gestel, 2008). Thus, the establishment of generic responses of the functional system from several soil fungi is a key step in development of tools for metal ecotoxicity assessment.

In this context, the present study aims to assess the functional diversity as indicator of metal exposure in soil fungi. Hydrolase (acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) and ligninolytic oxidase (laccase, Mn-peroxidase) activities involved in the soil functioning were monitored during fungal liquid cultures. We used ten fungi isolated from agricultural soil as well as two fungi known as efficient lignin-degraders, *T. versicolor* and *Irpex lacteus* (Cajthaml et al., 2008; Uhnakova et al., 2009). Soil fungi were exposed to two main metallic contaminants of soils, Cu as an essential element or Cd as metal with no biological role (Zhejazkov et al., 2008). The metal impact was investigated both on the fungal growth used as a toxicity indicator, the secretion of total proteins and the enzymatic activities.

2. Materials and Methods

2.1. Cultures of soil fungi and metal exposures

Almost studied fungal strains were from the collection “Microorganisms of Agro-Environmental Interest” (MIAE, INRA Dijon, France) and were selected by their isolation frequency. Fungi of different phyla were chosen, i.e. 4 Basidiomycetes: *Trametes versicolor* (ATCC 32745), *Irpex lacteus* (Fr. 617/93), *Thanatephorus cucumeris* (MIAE 08.006) and *Stereum rugosum* (MIAE 08.005); 5 Ascomycetes: *Fusarium solani* (MIAE Fspi1), *Fusarium oxysporum* (MIAE Fo47), *Penicillium brevicompactum* (MIAE 08.003), *Trichoderma atroviride* (MIAE Tri10) and *Verticillium albo-atrum* (MIAE Vert1); 3 Zygomycetes: *Mucor hiemalis* (MIAE 08.009), *Mucor racemosus* (MIAE 08.00X) and *Mortierella alpina* (MIAE 08.007).

Soil fungi were grown on a modified Kirk medium, containing 10 g/l maltose, 2.5 g/l yeast extract, 2 g/l KH_2PO_4 , 0.5 g/l MgSO_4 , 0.1 g/l CaCl_2 and mineral salts (Cu, Zn, Fe and Mn at 0.1 mg/l for each metal) (Rubilar et al., 2007). A mycelium mat on agar plugs (10 mm diam.) was inoculated into 10 ml of liquid culture medium in 150 ml Erlenmeyer flasks. 100 μl of CuSO_4 or CdSO_4 sterilized by filtration (0.2 μm pore size membrane) were added into liquid cultures at final concentrations of 0.1, 1 or 3 mM. Controls were performed without added metal. Fungal cultures were carried out statically in the dark at 25 °C. For each fungal strain, the experiments were carried out with three independent cultures per treatment (252 fungal cultures).

After 7 days of metal exposure, mycelia were harvested by a nylon screen (40 μm) and dried for 48 h at 80 °C to determine the fungal biomass. The mycelium free culture was filtrated through a 0.2 μm -filter and used for the extracellular activity assays, the quantification of secreted proteins by the Bradford method using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

2.2. Activity assays

Acid phosphatase (EC 3.1.3.2), β -glucosidase (EC 3.2.1.21), β -galactosidase (EC 3.2.1.23), and N-acetyl- β -glucosaminidase (EC 3.2.1.30) activities were assayed using their respective substrates of conjugated p-nitrophenyl (Sigma-Aldrich). Assays were carried out in 96-well microplates, by mixing 160 μ l of substrate solution (25 mM) in citrate/phosphate buffer (pH 4.5, 0.1 M) with 40 μ l of enzymatic samples, followed by incubation at 37 °C. After 45 min, 50 μ l of Na₂CO₃ (1 M) was added to stop the reaction. The liberation of p-nitrophenol by enzymatic hydrolysis of the substrate was determined at 405 nm (Keshri and Magan, 2000). The standard solutions of p-nitrophenol were treated in the same way as samples.

Laccase (EC 1.10.3.2) activity was measured respectively by monitoring the oxidation of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (1 mM) at 420 nm in citrate/phosphate buffer (CPB; 0.1 M, pH 3.0) (Wolfenden and Willson, 1982). Manganese- and lignin-peroxidases (EC 1.11.1.13 and EC 1.11.1.14) activities were monitored respectively by the oxidation of 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one (3 mM) at 334 nm in CPB (pH 5.0) in the presence of MnSO₄ (0.1 mM) and H₂O₂ (0.4 mM) (Paszczyński et al., 1986) and the oxidation of veratrylic alcohol (3 mM) at 310 nm in CPB (pH 3.0) in the presence of H₂O₂ (0.6 mM) (Tien and Kirk, 1984). Solutions of enzymes were added to a final volume of 1 ml and the kinetics were monitored for 30 s.

Activities were measured in triplicate and expressed in U/g dry weight of fungal biomass. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed 1 μ mol substrate in 1 min. Controls performed from boiled enzymatic extracts to inactivate the enzymes, were treated in the same way as the samples.

2.3. Statistical analyses

Means and standard errors (SE) were calculated from three independent cultures for each measured biological variable. Statistical analyses were performed by XLStat (Addinsoft). The significant differences were tested with $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Functional diversity in soil fungi

Twelve soil fungi were studied for their ability to produce extracellular enzymes during the liquid cultures. The distribution of extracellular hydrolase and oxidase activities is presented in **Figure VI.1**. Only *M. alpina* produced no tested enzymatic activities. Concerning to the hydrolases, it has been established that they are widely distributed in soil fungi. *M. hiemalis* was found to produce only extracellular β -glucosidase among tested hydrolases. All other fungi secreted acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in various amounts according to the strain. The most efficient producers of extracellular hydrolases were *S. rugosum*, *P. brevicompactum* and *T. atroviride*. Concerning to the oxidases, they were partially secreted by soil fungi. It was found laccases in 3 fungal strains (*T. versicolor*, *T. cucumeris* and *T. atroviride*), Mn-peroxidases in 2 fungal strains (*T. versicolor* and *I. lacteus*) and lignin-peroxidases in 1 fungal strain (*F. oxysporum*). *T. versicolor* was the most efficient producer of extracellular laccase with 36.7 U/g d.w.

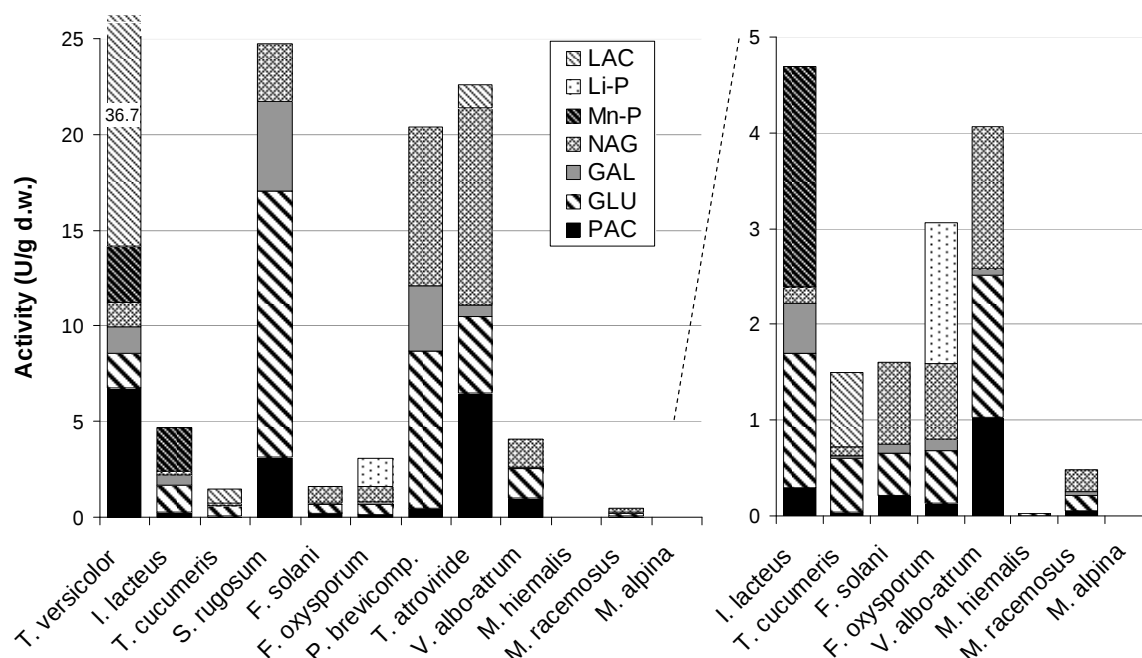


Figure VI.1. Distribution of extracellular activities in liquid cultures of soil fungi: PAC, acid phosphatase; GLU, β -glucosidase; GAL, β -galactosidase; NAG, N-acetyl- β -glucosaminidase; Mn-P, Mn-peroxidase; Li-P, lignin-peroxidase; LAC, laccase.

3.2. Physiological traits as affected by metals

The ability of soil fungi to grow in the presence of metals was monitored in liquid cultures. The biomass produced by soil fungi exposed for 7 days to Cu or Cd is presented in **Table VI.1**. As a general way, Cd had more toxic effect than Cu by decreasing the biomass production compared to the unexposed controls. Whereas Cu had a negligible average effect on soil fungi at 0.1 mM, the metal decreased the biomass production at 87 and 54 % at 1 and 3 mM respectively. For Cd, the toxic effect occurred from the concentration of 0.1 mM in almost soil fungi (8/12 affected strains). All soil fungi underwent a strong average effect of Cd at 3 mM by decreasing the biomass production at 26%. *T. atroviride* is the most tolerant to two tested metals with the appearance of toxicity only in the presence of Cd at 3 mM. In some cases, the metal exposures led to an increase in biomass production. The growth of *Fusarium* species were significantly stimulated by Cu at 0.1 mM or one of *T. atroviride* in the presence of Cd at 0.1 mM.

The quantification of total proteins secreted by soil fungi after exposure to Cu or Cd is shown in **Table VI.2**. As a general way, the metal exposures led to an increase in total secreted proteins compared to the unexposed controls. The average effect on the protein secretion is more important for Cd than for Cu. At 3 mM, Cu and Cd stimulated the protein secretion at 200 and 336 % respectively. The highest stimulations were observed in Basidiomycetes. In *I. lacteus*, the amounts of secreted proteins 3- and 5-fold increased in the presence of Cu at 1 and 3 mM respectively. In *T. cucumeris*, these amounts increased about 8-fold from the concentration of 0.1 mM in the presence of Cd and above 14-fold at 3 mM of Cd.

Table VI.1. Effect of Cu or Cd on biomass production in liquid cultures of soil fungi

Fungus	Control Dry weight (mg)	Biomass production (%)					
		Exposure to Cu			Exposure to Cd		
		0.1 mM	1.0 mM	3.0 mM	0.1 mM	1.0 mM	3.0 mM
<i>T. versicolor</i>	51.1 ±1.5	96.8	78.5*	65.2*	96.4	43.1*	2.7*
<i>I. lacteus</i>	56.7 ±0.9	88.2*	35.5*	4.1*	75.2*	27.2*	3.2*
<i>T. cucumeris</i>	77.3 ±1.9	100.0	64.2*	36.5*	11.6*	3.6*	2.4*
<i>S. rugosum</i>	24.6 ±1.7	90.5	68.3*	31.2*	106.6	64.2*	25.2*
<i>F. solani</i>	37.8 ±1.0	140.0*	106.6	12.6*	100.5	69.2*	29.9*
<i>F. oxysporum</i>	37.5 ±1.8	122.1*	131.6*	49.3*	97.2	88.0	73.0*
<i>P. brevicompactum</i>	45.8 ±1.1	96.3	85.7*	78.3*	85.2*	35.8*	10.3*
<i>T. atroviride</i>	25.6 ±3.2	90.0	99.1	113.0	149.8*	92.6	10.6*
<i>V. albo-atrum</i>	44.7 ±1.4	103.0	117.7*	107.2*	91.1*	118.1*	64.1*
<i>M. hiemalis</i>	45.9 ±0.6	90.9*	87.0*	38.9*	89.6*	51.7*	41.1*
<i>M. racemosus</i>	58.1 ±1.7	101.7	97.7	74.9*	91.8*	67.4*	25.5*
<i>M. alpina</i>	47.1 ±2.3	96.7	68.7*	32.9*	80.4*	25.0*	26.7*
Average of metal effect		101.4	86.7	53.7	89.6	57.2	26.2
(affected fungi)		(4/12)	(9/12)	(11/12)	(8/12)	(10/12)	(12/12)

* significant effect of metal compared to the unexposed control ($p < 0.05$)

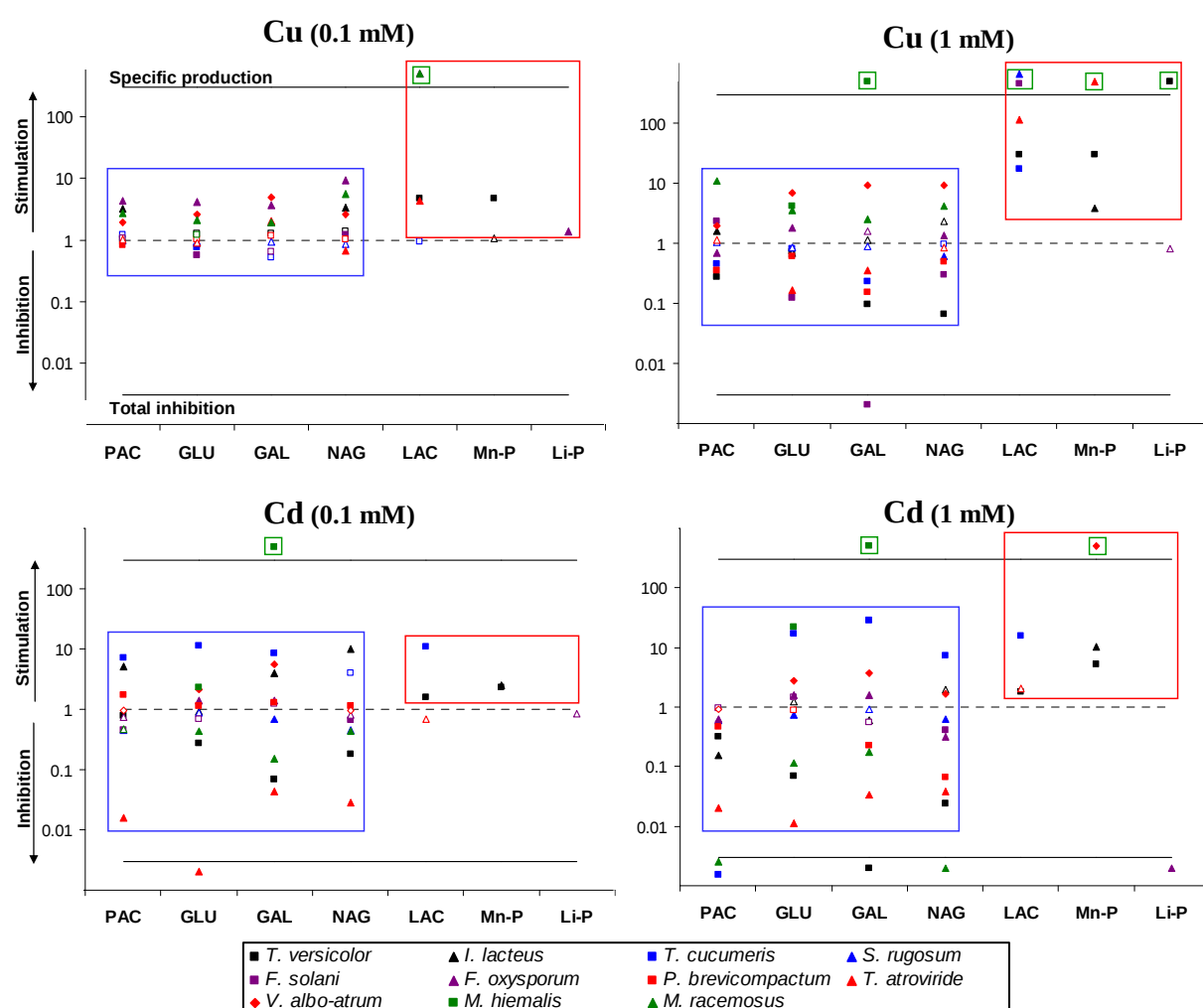
Table VI.2. Effect of Cu or Cd on protein secretion in liquid cultures of soil fungi

Fungus	Control Proteins (mg/g d.w.)	Protein secretion (%)					
		Exposure to Cu			Exposure to Cd		
		0.1 mM	1.0 mM	3.0 mM	0.1 mM	1.0 mM	3.0 mM
<i>T. versicolor</i>	7.8 ±0.9	154.4*	128.9*	176.4*	85.2*	197.9*	555.9*
<i>I. lacteus</i>	4.1 ±0.1	137.9*	289.8*	496.5*	220.0*	249.6*	685.2*
<i>T. cucumeris</i>	3.2 ±0.2	112.0*	236.7*	330.7*	779.0*	1267.1*	1404.8*
<i>S. rugosum</i>	15.9 ±1.3	105.0	124.5	174.1*	69.6*	139.3*	259.5*
<i>F. solani</i>	9.5 ±0.7	56.8*	103.4	215.9*	94.4	53.3*	31.1*
<i>F. oxysporum</i>	5.7 ±0.7	113.3	104.3	152.3	101.7	59.6*	65.9*
<i>P. brevicompactum</i>	8.4 ±0.3	150.0*	95.3	43.7*	164.2*	111.6	237.2*
<i>T. atroviride</i>	37.0 ±3.0	107.2	48.7*	22.7*	11.7*	29.0*	108.0
<i>V. albo-atrum</i>	20.9 ±1.0	108.0	63.3	18.2*	162.2*	41.8*	26.5*
<i>M. hiemalis</i>	3.7 ±0.5	118.1	165.1*	295.0*	137.2*	413.1*	282.7*
<i>M. racemosus</i>	3.9 ±0.3	90.4	97.2	105.3	67.9*	94.0	33.5*
<i>M. alpina</i>	2.7 ±0.3	148.1	272.6*	372.6*	190.5*	458.3*	344.7*
Average of metal effect		116.8	144.1	200.3	173.6	259.5	336.2
(affected fungi)		(5/12)	(6/12)	(10/12)	(10/12)	(10/12)	(11/12)

* significant effect of metal compared to the unexposed control ($p < 0.05$)

3.3. Responses of extracellular enzymes to metals

At functional level, the metal impact was investigated on extracellular hydrolases and oxidases. Since metals at 3 mM led to strong inhibitions of fungal growth, results for this concentration do not be showed (**Table VI.1**). For the concentrations of 0.1 and 1 mM, enzymatic profiles obtained after 7 days exposure to Cu or Cd are presented in **Figure VI.2**. These functional responses to metals differed between hydrolases and oxidases.



PAC, acid phosphatase; GLU, β -glucosidase; GAL, β -galactosidase; NAG, N-acetyl- β -glucosaminidase; Mn-P, Mn-peroxidase; Li-P, lignin-peroxidase; LAC, laccase.

Figure VI.2. Effects of Cu or Cd on extracellular hydrolases and oxidases in soil fungi exposed for 7 days: The inhibitory or stimulatory effects of metals were expressed by relative factors by comparison to unexposed controls. (---) basal level of activities; *Closed symbols*, significant differences and *open symbols*, no significant differences compared to the unexposed control ($p < 0.05$)

Concerning to the hydrolases, a great variability of activities was observed in the presence of metal: the enzymatic responses depended on metal, enzyme and fungal strain considered. Hydrolase activities were inclined to be stimulated by Cu at 0.1 mM. Being either stimulated or inhibited according to the fungal strains, no generic response of hydrolases to Cu at 1 mM was determined. In the case of Cd, this variability of enzymatic responses appeared from the concentration of 0.1 mM. The metal exposures led to some specific productions and total inhibitions of hydrolases. *M. hiemalis* found to secrete only extracellular β -glucosidase (**Fig. VI.1**), produced β -galactosidase in the presence of Cu and Cd. Almost total inhibitions of hydrolase activities were occurred in the presence of Cd at 1 mM. In this stress condition, no activity of acid phosphatase in *M. racemosus* and in *T. cucumeris*, β -galactosidase in *T. versicolor* and N-acetyl- β -glucosaminidase in *M. racemosus* was detected in liquid cultures. Concerning to the oxidases, the activities were stimulated by Cu and Cd in fungi observed to produce some of ligninolytic enzymes (**Fig. VI.1**). In the case of Cu at 1 mM, the highest stimulation was of 115-fold for the laccase of *T. atroviride*. Some specific productions of oxidases were occurred during the metal exposures. In the presence of Cd at 1 mM, *V. albo-atrum* produced the Mn-peroxydase. In the case of Cu, specific productions were: the laccase in *M. racemosus* (at 0.1 mM) and, *S. rugosum* and *F. solani* (at 1 mM); the Mn-peroxidase *T. atroviride* (at 1 mM); the lignin-peroxidase in *T. versicolor* (at 1 mM). The only effect of inhibition observed for the oxidases was found in *F. oxysporum* for the lignin-peroxidase in the presence of Cd at 1 mM.

4. Discussion

The improvement of the knowledge on the functional diversity of fungal communities contribute to progress in the understanding of terrestrial ecosystem functioning. In this present study, we showed that all tested soil fungi from different phyla, except the Zygomycete *Mortierella alpina*, produced extracellular hydrolases (acid phosphatase, β -glucosidase, β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase) involved in the cycling of phosphor and the degradation of natural polymers such as cellulose and chitin. In the literature, it has been observed cellulolytic hydrolases including β -glucosidase in different genera: *Fusarium*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Thanatephorus*, *Trichoderma* and *Mucor* (Borgia & Mehnert, 1982; Joshi et al., 2007; Kovacs et al., 2009). Furthermore, the two Basidiomycetes *T. versicolor* and *I. lacteus* known to degrade the lignin are thus able to use other nutrient sources. Inversely to hydrolases, the production of extracellular oxidases was not prevalent in soil fungi. Except the two efficient lignin-degraders, an oxidative system was found only in a Basidiomycete *Thanatephorus cucumeris* and in two Ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Fusarium oxysporium*. Although these three fungi have not been reported as efficient producers of ligninolytic enzymes, the laccase activity has been measured during the liquid cultures (Crowe and Olsson, 2001; Verdin et al., 2004; Dhouib et al., 2005).

Soil fungi were exposed to two main metallic contaminants of soils, Cu as an essential element or Cd as metal with no biological role (Zhejazkov et al., 2008). The metal exposures affected physiological traits in soil fungi. As a general way, the fungal growth was inhibited whereas the protein secretion was stimulated by metals. However, these metal effects depended on both the considered metal and the fungal strain. Concerning to the metal toxicity, an average decrease in biomass production of 50% was observed at 1 mM for the Cd and at 3 mM for Cu. It is known in white-rot fungi that Cd is more toxic than Cu, which has adverse effects in excess (Baldrian, 2003). It is clear that the presence of metals in environment leads to changes in fungal communities. However, it is also known that fungi have defense mechanisms to different stresses including metal tolerance (Baldrian, 2003; Jarocz-Wilkolazka et al., 2006). Thus, fungi have ecological interest for the development of tools for ecotoxicity assessment because of their ability to grow in environment contaminated by metals.

In this present study, it has been hypothesized that metals modify the expression of potential functional in soil fungi. However, the sensitivity of the response to metals can vary from one species to another within the same community (Forbes et al., 2006; van Gestel, 2008). The metal impact on the extracellular enzymatic system was then assessed in several fungi from different phyla. The exposures of soil fungi to metals led to modifications of enzymatic profiles. These exposures provided contrasted and complex results for hydrolases activities, insofar as the enzymatic responses depended on metal, enzyme and fungal strain considered. Because of this great intracommunity variability, it was difficult to determine a generic response of hydrolases to metals in soil fungi. By contrast, activities of ligninolytic oxidases were stimulated by metals in each fungal strain possessing a partial oxidative system: three basidiomycetes *T. versicolor*, *I. lacteus* and *T. cucumeris*, and two Ascomycetes *T. atroviride* and *F. oxysporum*. The stimulation of laccase activity by Cu has been reported in *T. cucumeris* and *T. versicolor* (Collins & Dobson, 1997; Crowe & Olsson, 2001). In some strains of different phyla, extracellular oxidases were specifically produced in metallic stress conditions: extracellular laccase activity was detected in *M. racemosus*, *S. rugosum* and *F. solani*; Mn-peroxydase activity in *T. atroviride*; and lignin-peroxidase activity in *T. versicolor*. In this last case, this specific response has been previously described by Lebrun et al. (2009 or **Chapitre IV**). For other fungi, this phenomenon is consistent with the fact the laccase activity has been measured during the liquid cultures of *F. solani* and a *Stereum sp.* although a stimulation of oxidase activities by metals has not been reported (Verdin et al., 2004; Kovacs et al., 2009). It is noted that these metal effects on metabolic processes of soil fungi may have ecological consequences, notably by influencing energy fluxes in terrestrial ecosystems.

In summary, soil fungi represent one of major biomass in terrestrial ecosystems and are essentials for their functioning. In this present study, it has been shown that fungi from different phyla are able to secrete both extracellular hydrolases and oxidases involved in biogeochemical cycles. This establishment confirms the richness of the functional diversity in soil fungi. The exposure of fungi to metals leads to modifications of secretion profiles at the functional level. Although the reactivity of fungi to metals varies from one species to another, it is possible to establish generic responses within the same community. Contrary to the great variability of the response of hydrolases, the fungal oxidases are either stimulated or specifically produced in the presence of Cu or Cd. This validates that enzymatic profiles are potential tools for ecotoxicity assessment. Furthermore, the genericity of the response of

fungus oxidases suggests that these biochemical actors of soil functioning could be biomarkers of metal exposure.

Acknowledgments - The present study was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique and by the Conseil Régional de Haute-Normandie. The authors thank Steinberg C. and Héraud C. of Environment and Soil Microbiological Center (INRA Dijon) for their valuable informations about the MIAE collection.

CHAPITRE VII

Sensibilité et spécificité de la réponse des oxydoréductases aux métaux

« Oxydases fongiques comme biomarqueurs d'exposition aux métaux : influence de la spéciation des métaux sur les réponses fonctionnelles chez *Trametes versicolor* »

Article soumis à *BioMetals*

Fungal oxidases as exposure biomarkers to metals: influence of metal speciation on functional responses in *Trametes versicolor*

Authors

Jérémy D. Lebrun*, Isabelle Lamy and Christian Mougin

Affiliation

INRA, UR 251 - PESSAC - Physico-chemistry and Ecotoxicology of Contaminated Agricultural Soils, RD10, F78026 Versailles, France

Corresponding author*: Jérémy D. Lebrun
jlebrun@versailles.inra.fr

Résumé - La façon dont la spéciation des métaux influence les réponses fonctionnelles des champignons est peu documentée, ce qui limite l'intérêt prédictif de biomarqueurs fongiques d'exposition aux métaux. Dans cette étude, nous avons investigué la sensibilité et la spécificité de la réponse des oxydases de *Trametes versicolor* exposé au Cu ou au Zn dans des milieux de culture exhibant différents niveaux de complexation vis-à-vis des métaux pour faire varier leur biodisponibilité. La spéciation des métaux a été déterminée expérimentalement ou à l'aide d'un logiciel de modélisation géochimique pour distinguer les espèces métalliques libres des espèces organiques et inorganiques. Nous avons testé l'hypothèse que les espèces libres (i.e., Cu^{2+} et Zn^{2+}) sont les formes les plus disponibles et les plus inductives des oxydases extracellulaires. Après addition de Cu ou de Zn, les activités laccase, Mn- et lignine-péroxydases ont été utilisées comme biomarqueurs d'exposition. La biomasse et la morphologie fongique ont été utilisées comme indicateurs d'impact métallique. Pour des mêmes teneurs en métaux ajoutées dans nos milieux de culture de *T. versicolor*, les teneurs en Zn^{2+} sont plus élevées que celles en Cu^{2+} . Cependant, le Zn n'a aucun effet sur les activités oxydases même s'il altère la morphologie fongique. Au contraire, le Cu n'a aucun effet sur la morphologie. Mais, il stimule les activités Mn-péroxydase et laccase jusqu'à 41 et 310 fois comparé aux contrôles non exposés, lorsque la biodisponibilité du métal est augmentée. Une réponse spécifique de la lignine-péroxydase au Cu est mesurée uniquement dans les milieux faiblement complexants. Le potentiel inductif du Cu sur les réponses des oxydases est fortement corrélé aux teneurs en Cu^{2+} dans les milieux. Dans nos conditions, la sensibilité des réponses fonctionnelles est fortement augmentée. Les seuils de réponse diminuent lorsque la biodisponibilité du métal est favorisée. Par ailleurs, la spécificité des réponses fonctionnelles au Cu comparé au Zn est en accord avec le fait que les oxydases fongiques pourraient être utilisées comme outils pour l'évaluation de la biodisponibilité et de l'écotoxicité des métaux.

Mots-clés : Biodisponibilité; Espèces libres ; Laccase ; Mn-péroxydase ; Lignine-péroxydase

Abstract - The way the metal speciation influences the functional responses of fungi is poorly documented, limiting the predictive interest in such fungal biomarkers to metal exposures. In this study, we investigated the sensitivity and selectivity of oxidase responses in *Trametes versicolor* exposed to copper or zinc in liquid media exhibiting various levels of metal complexation to vary the metal bioavailability. Metal speciation was determined experimentally or computed with geochemical modeling in order to distinguish free metal species from inorganic or organic metal species. We tested the hypothesis that free metal species (i.e., Cu^{2+} and Zn^{2+}) were the most bioavailable and inductive forms of extracellular oxidases. Laccase, manganese- and lignin-peroxidase activities were used as exposure biomarkers after Zn or Cu addition. Fungal biomass and morphology were also monitored as indicators of metal impact. For same metal contents added in our growth media of *T. versicolor*, Zn^{2+} contents were higher compared to Cu^{2+} . However, Zn had no effect on oxidase activities even if altered fungal morphology. By contrast Cu had no effect on morphology. But it stimulated Mn-peroxidase and laccase activities until 41- and 310-fold respectively compared to the unexposed controls when metal bioavailability was enhanced. A lignin-peroxidase response to Cu not detected in the control cultures was specifically assessed in low complexing media. The inductive potential of Cu on oxidase responses was highly correlated to Cu^{2+} contents in media. In our conditions, the sensitivity of functional responses was strongly increased. The response thresholds decreased when the metal bioavailability increased. Furthermore, the specificity of functional responses to Cu compared to Zn is consistent with the fact that fungal oxidases could be used as tools for metal availability and ecotoxicity assessment.

Key words: Metal bioavailability; Free metal species; Laccase; Mn-peroxidase; Lignin-peroxidase

1. Introduction

Metal contamination due to human activities has become a major environmental and health problem. The release of metals into the terrestrial ecosystems has led to their important accumulation in biota and often alters biological systems. These non-biodegradable contaminants travel up the trophic chains by bioaccumulation processes (van Gestel 2008). Essential metals in excess as well as metals with no biological role can result in adverse effects on living organisms, and consequently on the terrestrial ecosystem functioning. However, the assessment of metal effects on biota remains a research subject because of lack of efficient tools.

Since fungi represent one of the largest biomass in terrestrial ecosystems, the response of their extracellular enzymatic system to metal contaminants offer promising perspectives for ecotoxicological risk assessment providing the mechanisms of metal action are well known. In no stressing conditions, the extracellular enzymes secreted by fungi are involved in biopolymer degradation, in biogeochemical cycles, and thus in soil ecosystem functioning. Among these enzymes, hydrolases are expressed by most microorganisms leading to a functional redundancy in soils while lignin degrading-oxidases are more specific to fungal communities (Kjøller *et al.* 2002; Nannipieri *et al.* 2002; Bouws *et al.* 2008). Ligninolytic oxidases, such as laccases and peroxidases, identified in various white-rot fungi including *Trametes versicolor* are of an ecological interest because of their possible use as tools for bioremediation (Mougin *et al.* 2003; Gianfreda & Rao 2004; Jarosz-Wilkolazka *et al.* 2006). Activities of these ligninolytic enzymes can be modulated during fungal exposures to metals. In particular, Cu was found to increase laccase activity in different filamentous fungi (Crowe & Olsson 2001; Baldrian 2003). This oxidase response to metals has been explained at molecular level. For example, Collins and Dobson (1997) showed that the stimulation of laccase activity in *T. versicolor* by Cu corresponds to an increase in its mRNA. Metal Responsive Elements, or MRE, have been characterized in the gene of laccase in *Pleurotus ostreatus* (Giardina *et al.* 1999) and in a gene cluster coding for manganese-peroxidase (Mn-P) and lignin-peroxidase (Li-P) in *T. versicolor* (Johansson & Nyman 1996). Li-P is known to be produced by this fungus in the presence of veratrylic alcohol (Jönsson *et al.* 1987; Collins & Dobson 1995) but was never observed to be stimulated by metals. Hypothesis to explain the non-detected metal induction for Li-P in fungi can be linked to an exposition to non-bioavailable inductive metal forms. Indeed, studies of metal impact on fungi link functional

responses to total metal concentrations which do not square with metal bioavailability. The metal free forms have been suggested as the most bioavailable and toxic for organisms, but almost all studies dealing with metal speciation were made with aquatic organisms (Meylan *et al.* 2004; Vigneault & Campbell 2005; Braha *et al.* 2007). Some authors showed that other forms than free metal forms can be bioavailable and induce a biological response in terrestrial organisms (Vulkan *et al.* 2000; Degryse *et al.* 2006). But the metal forms inductive for oxidase activities in fungi are not known.

A significant aspect of experiments concerning the metal effects on fungi is the composition of the liquid culture media used. In the literature, culture media differ both in their C/N ratios and contents in nutriments which influence the fungal behavior (Fomina *et al.* 2003; Dekker *et al.* 2007). The medium composition is also crucial for the metal bioavailability because of the presence of metal ligands. Tartaric acids or thiamine often used for fungi growth are known as ligands complexing metals (Jönsson *et al.* 1987; Lesage *et al.* 1996; Stamatis *et al.* 2007). Yeast extracts commonly added in culture media are also suspected to decrease metal bioavailability through complexation (Gonzalez-Gil *et al.* 2003). If only specific metal forms are inductive but not the total metal contents, the different media compositions lead to difficulties to compare inductive potential of metals for enzyme activities or threshold values applicable to the environment. The relationship between metal speciation and functional responses of fungi during metal exposures is poorly documented, limiting the predictive interest in such fungal biomarkers.

In this work, we aimed at investigating the influence of metal speciation on both the sensitivity and selectivity of fungal responses to two essential metals, Cu and Zn, added at several concentrations in the culture medium. *Trametes versicolor* known to produce laccase and Mn-P was used as an efficient lignin-degrading fungus. It was grown in various liquid media either rich or poor in metal ligands in order to vary metal speciation and thus metal availability. At the physiological level, biomass production and morphology studied by scanning electron microscopy were used to assess the metal toxicity on the fungus. At the functional level, we focused on three extracellular oxidases activities used as biomarkers of metal bioavailability: laccase, Mn-P and Li-P.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Anhydrous D-(+)-glucose, tartarate di-NH₄, tartarate di-Na, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O and ZnSO₄·7H₂O were purchased from Fisher Scientific. Monohydrate D-(+)-maltose was from Sigma-Aldrich, KH₂PO₄ was from Baker, KCl, NH₄Cl and NaNO₃ were from Merck. Bacto yeast extracts were purchased from BD. According to the supplier, yeast extracts contain 54.10% amino acids, 10.90% total N, 3.27% phosphate, 3.19% potassium, 0.49% sodium, 0.38% chloride, 0.09% sulfate, 0.07% magnesium and 0.01% calcium. Total contents of Cu, Zn and Fe in yeast extracts were determined by atomic absorption spectrometry (Varian, SpectrAA 220). We found 0.01, 0.10 and 0.06 mg of Cu, Zn and Fe per g of yeast extracts respectively. Total organic carbon in these extracts (48.1%) was determined by TOC-analyzer (TOC-VCSN, Shimadzu).

2.2. Medium compositions and culture conditions

Trametes versicolor ATCC 32745 was grown in five liquid culture media which differed in their content in organic ligands (**Table VII.1**). One medium called Lesa was made after Lesage *et al.* (1996), and was chosen for its richness in organic ligands including tartaric acid. The other media contained no tartaric acid and were performed from Abadulla *et al.* (2000) who used it with success for cultures of *Trametes* strains. We modified the composition by decreasing the yeast extract contents from 5 to 2.5 and 0 g L⁻¹ to give media called Aba5, Aba2.5 and Aba0 media respectively. The fifth medium called Czapek, is a minimal medium designed to grow fungi according to Yano *et al.* (2009).

Mycelium agar plugs with 10 mm-diameter were taken from the outer circumference of a fungal colony growing on agar-plate (8 to 10 days) and were inoculated into 10 mL of liquid medium in 150 mL Erlenmeyer flasks. Cultures were incubated statically at 25 °C in the dark for 10 days. After 3 days of incubation, 100 µL of CuSO₄ or ZnSO₄ solutions sterilized by filtration (0.2 µm pore size membrane) were added into liquid cultures in order to obtain final concentrations ranged from 10 nM to 1 mM for each metal. Controls were done without added metals. The experiments were carried out with three independent replicates per treatment. Fungal growth in each medium was monitored by determining the dry weights of

fungus biomass. Mycelia were filtered through linen (40 μm) and dried for 48 h at 80 °C. The growth medium was filtered (0.2 μm pore size) before used for measurements of extracellular activities.

Table VII.1. Composition of media used for liquid cultures of *Trametes versicolor*

Nutriment (g L ⁻¹)	Medium				
	Lesla	Aba5	Aba2.5	Aba0	Czapek
maltose	20	-	-	-	-
glucose	-	10	10	10	10
tartarate di-NH ₄	2.3	-	-	-	-
NH ₄ Cl	-	2.5	2.5	2.5	-
NaNO ₃	-	-	-	-	3.0
yeast extracts	1.0	5.0	2.5	-	-
tartarate di-Na	1.8	-	-	-	-
KCl	-	0.5	0.5	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄	1.3	2.0	2.0	2.0	2.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.07	-	-	-	0.01
total C	9.4	4.4	3.2	2.0	2.0
total N	0.2	1.2	0.9	0.7	0.5
C/N	37.9	3.7	3.5	3.1	4.0

2.3. Determination of Cu²⁺ contents in culture media

Contents in free copper species (i.e., Cu²⁺) in culture media were determined using a copper-ion selective electrode (Ion Selective Electrode, ISE25Cu-9, Radiometer) coupled with a reference electrode (XR100, Radiometer) at 25 °C. A calibration curve was established with 0.01, 0.1 and 1 mM CuClO₄ buffers in the presence of a constant ionic strength of 0.1 M. The background electrolyte of calibration buffers was NaClO₄ in the absence or presence of various contents in KCl used to adjust the Cl⁻ contents mimicking the molarities of each culture medium. Slopes of the electrode response obtained in calibrations were close to the theoretical Nernstian slope of 29.6 (29.3 $\pm$ 0.8, n = 18, R² = 0.99). After an addition of 1 mM CuSO₄, the Cu²⁺ contents were determined in the various media in their initial states (i.e., in the absence of the fungus) or after 3 days of fungus incubation (i.e., the day of metal addition). In the last case, fungal mycelia were harvested from media before the metal addition. These determinations were used to check differences in the copper complexation between the culture media.

2.4. Theoretical speciation of Zn and Cu using Soilchem modeling

The chemical equilibrium program Soilchem (Sposito & Coves 1991) was used to calculate the speciation of Zn or Cu after their addition in the various culture media. The pH and total contents in organic and inorganic species of the culture media were used as inputs with the database Geodata to compute speciation. The Soilchem program took into account the complexation constants of metals with the amino acids identified in the yeast extracts as given by the supplier. Cu^{2+} contents measured both at $t = 0$ and at the 3rd day of fungus incubation by the Cu-ISE were plotted against the theoretical Cu^{2+} contents calculated by the program and a linear relationship was found ($R^2 = 0.91$) which validated speciation results for Cu. Since no direct Zn^{2+} determinations could be made as for Cu, we assumed the same validation for Zn. Soilchem was used to compute theoretical Zn and Cu speciation in order to compare the percentages of free ionic forms, and inorganic or organic bound metal forms after metal additions in the various culture media.

2.4. Extracellular oxidase activities

Laccase activity was measured by monitoring the oxidation of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS) at 420 nm in a citrate/phosphate buffer (CPB; 0.1 M, pH 3.0) at 30 °C (Wolfenden & Willson 1982). Manganese- and lignin-peroxidases activities were monitored respectively by the oxidation of 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-one at 334 nm in CPB (pH 5.0) in the presence of MnSO_4 and H_2O_2 (Paszczynski *et al.* 1986) and the oxidation of veratrylic alcohol at 310 nm in CPB (pH 3.0) in the presence of H_2O_2 (Tien & Kirk 1984). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed 1 μmol substrate in 1 min. The activities were measured in triplicate from extracellular filtrates and expressed in U per g dry weight of fungal biomass ($\text{U g}^{-1} \text{ d.w.}$).

2.5. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to assess Zn or Cu impacts on the fungal morphology. Harvested 10-days old mycelia were washed four times with deionized water for 1 min and cryogenised (-180°C), coated with gold and scanned with SEM (Philips, SEM 525M).

2.6. Statistical analysis

Means and standard errors (SE) were calculated from three independent sets for each variable measured: fungal biomass, pH of liquid medium, Cu^{2+} contents and extracellular oxidase activities. Effects of C/N ratios and metal speciation on oxidase activities were analyzed by Pearson's principal component analysis (PCA) involving 378 data per metal for six concentrations of metal added from 10 nM to 1 mM in each culture medium. Results were used to determine which fraction of metal is the most inductive among total, inorganic, organic or free forms. Statistical analyses (t-test, regression, PCA) were performed by XLStat (Addinsoft).

3. Results

3.1. Influence of medium composition on fungal growth in the absence of metal

Trametes versicolor did not grow in the two liquid media, Aba0 and Czapek. Biomass production and pH values of the three other culture media during the fungal incubations are presented in **Fig. VII.1**. The decrease in pH was about two units after 10 days of culture, and the lowest pH was observed in Aba2.5 followed by Aba5 and Lesa. Whatever the medium, the fungus reached a stationary phase within 7 days. After 10 days, the biomass production of *T. versicolor* was greater in the Lesa medium with the highest organic carbon content (**Fig. VII.1** and **Table VII.1**). The fungal biomass was 64 and 53% in Aba5 and Aba2.5 respectively of that measured in Lesa medium, despite a higher content in yeast extracts of these two Aba media compared to Lesa (**Table VII.1**).

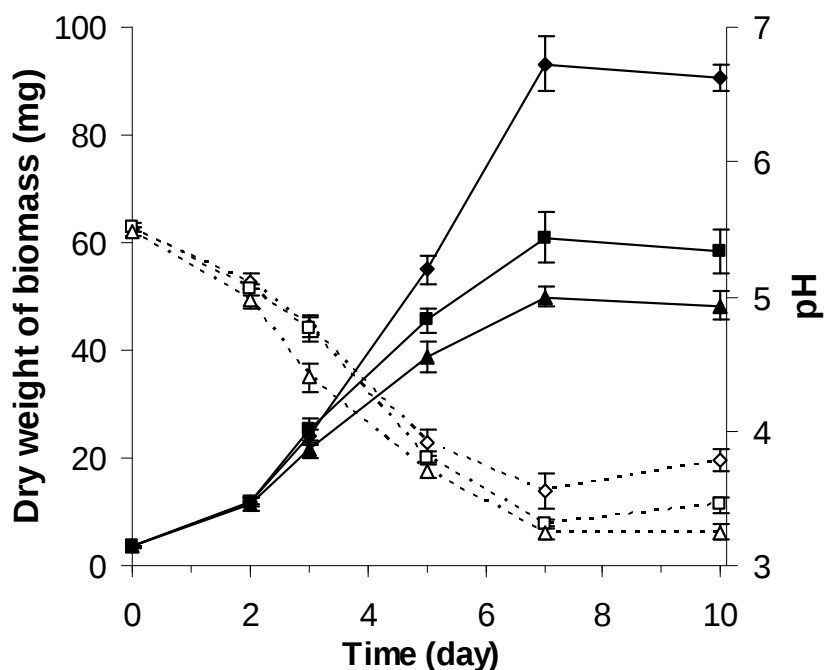


Figure VII.1. pH (open symbols) and growth of *T. versicolor* (closed symbols) during the incubation in various culture media: Lesa (diamonds), Aba5 (squares) and Aba2.5 (triangles). The values are means $\pm$ SE for triplicate cultures.

3.2. Metal speciation as affected by the medium composition

After the addition at 1 mM, Cu was found at about 100% in the free form in the Czapeck and Aba0 media (where no growth of the fungus was observed). For the three other media, Cu²⁺ contents were 1.5-fold higher in media after 3-days growth of the fungus than in media in their initial states without fungus (**Table VII.2**). The one effect of pH on Cu²⁺ contents was tested by abiotically decreasing the initial pH of the media to the pH value measured the 3rd day of fungus incubation. The decrease in pH increased the Cu²⁺ contents about 3-fold. In all cases, Cu²⁺ contents were lower than 10% of the total added Cu content, and increased in the order Lesa < Aba5 < Aba2.5.

Table VII.2. Influence of the absence or presence of *T. versicolor* on Cu²⁺ contents of culture media after a 1 mM copper addition

Medium	Cu ²⁺ contents (μM)		
	Lesa	Aba5	Aba2.5
without <i>T. versicolor</i>	3.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	32.3 ± 1.1
(constant initial pH)	(5.5)	(5.4)	(5.5)
with <i>T. versicolor</i>	4.2 ± 0.3	6.6 ± 0.1	51.3 ± 7.9
(pH after 3 days of culture)	(4.8)	(4.8)	(4.4)
without <i>T. versicolor</i>	9.3 ± 0.4	17.5 ± 0.8	87.9 ± 4.0
(adjusted pH to mimic the 3 rd day of culture)	(4.8)	(4.8)	(4.4)

An example of theoretical Cu and Zn speciation computed for the pH value of the 3rd day of fungus incubation is shown **Fig. VII.2** as percentage of the different metal forms for the case of Cu or Zn added at the highest concentration of 1 mM. Free metal forms were found always lower for Cu than for Zn, and lower than 1%, 5% and 13% of the total Cu content and 13%, 28% and 74% of the total Zn content in Lesa, Aba5 and Aba2.5 respectively. In Lesa, metals were calculated as being mainly in the complexed form with organic ligands, essentially with tartaric acid (> 95% for Cu and > 83% Zn). In Aba5 and still further in Aba2.5, the level of organic complexation attributed here to amino acids is highly decreased for Cu and was found negligible for Zn, favoring inorganic and free forms. Calculations were made for all the conditions of the experiments (Cu or Zn additions from 10 μM to 1 mM) and free forms were computed as always lower for Cu than for Zn, and lower in Lesa medium than in Aba5 and Aba2.5 media.

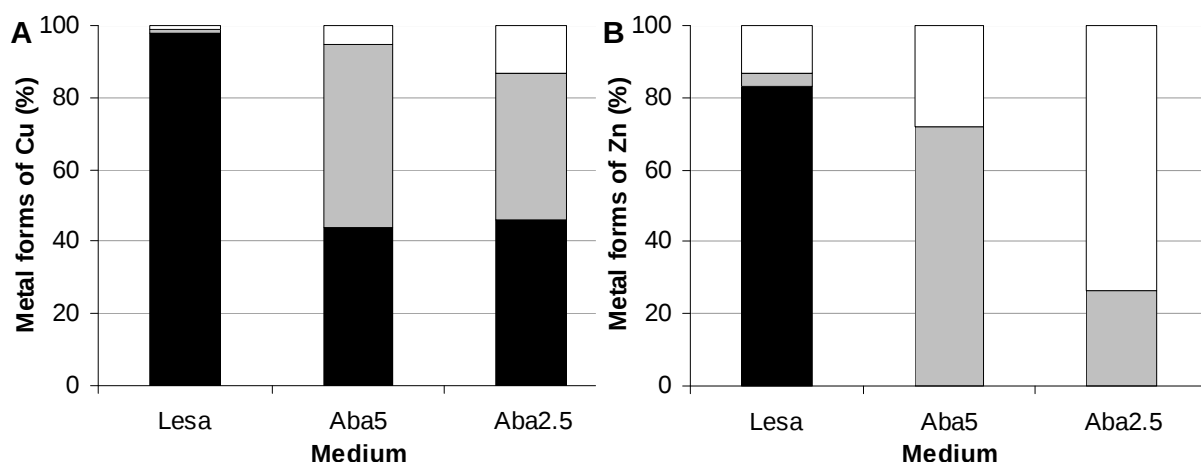


Figure VII.2. Distribution of organic- (■) or inorganic-complexed (▒), and free (□) forms of Cu (A) or Zn (B) added at 1 mM in the different culture media. The percentages were calculated using the Soilchem program

3.3. Influence of metals on biomass and morphology

Metal effects on the biomass produced by *T. versicolor* exposed for 7 days from 10 nM to 1 mM of Cu or Zn were assessed. **Table VII.3** shows the results only for the highest concentration of 1mM which gave significant effects for Cu. Zn additions had no significant effect on the biomass production of *T. versicolor* whatever the medium composition. Whereas Cu had no effect in Lesa, Cu at 1 mM led to a decrease in biomass production of about 88% in Aba5 and Aba2.5 compared to unexposed controls.

Table VII.3. Biomass production and extracellular oxidase activities by *T. versicolor* exposed to 1 mM Zn or Cu for 7 days in different media

	Lesa			Aba5			Aba2.5		
	Ctrl	Zn	Cu	Ctrl	Zn	Cu	Ctrl	Zn	Cu
Biomass production (%)	100.0 ± 2.6	101.0 ± 0.6	98.8 ± 1.4	100.0 ± 6.3	107.4 ± 4.9	88.6 ± 4.7	100.0 ± 3.5	101.1 ± 2.3	88.7 ± 1.7
Laccase (U g ⁻¹ d.w.)	50.2 ± 4.6	43.4 ± 3.8	95.3 ± 7.8	23.8 ± 3.8	21.5 ± 3.6	3324.1 ± 467.8	24.7 ± 3.0	24.9 ± 1.6	7651.6 ± 627.5
Mn-P (U g ⁻¹ d.w.)	6.4 ± 0.7	5.1 ± 0.7	8.2 ± 0.8	10.8 ± 1.7	8.4 ± 1.3	168.4 ± 9.4	9.1 ± 1.9	8.9 ± 3.1	376.5 ± 21.6
Li-P (U g ⁻¹ d.w.)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	48.4 ± 12.5	N.D.	N.D.	126.0 ± 5.5

Fat value: significant differences (P < 0.05)

N.D. means not detected

Fig. VII.3 shows the metal effects on the morphology of *T. versicolor* exposed for 7 days to 1 mM of Cu or Zn in Aba2.5 assessed by scanning electron microscopy. Only Zn led to morphological alterations observed by the coalescence of filaments. Observations in Aba5 were found similar as those in Aba2.5. Metals had no notable effects on the fungal morphology in Lesa (data not shown).

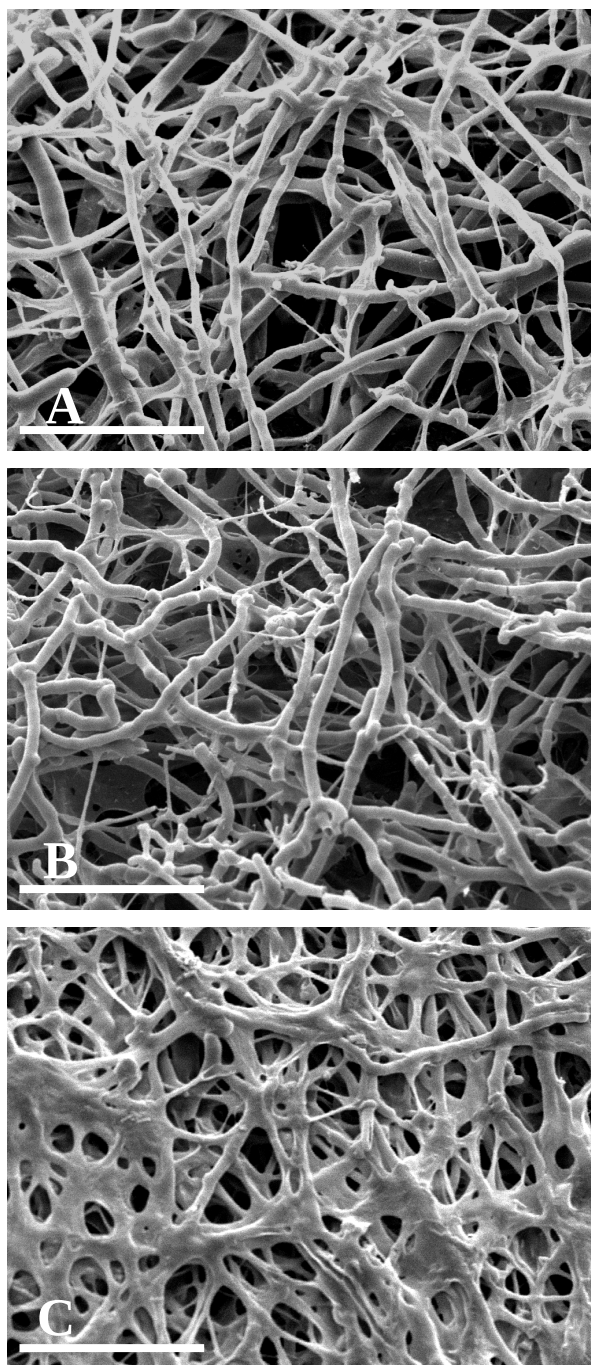


Figure VII.3. Scanning electron microscopy of *T. versicolor* mycelia cultured in Aba2.5, unexposed (A) or exposed to 1 mM of Cu (B) or Zn (C) for 7 days. Magnification x 2020 (white bar corresponds to 20 μ m).

3.4. Influence of metals on functional responses

After 7 days of exposure to 1 mM Zn or Cu, extracellular activities of *T. versicolor* related to the fungal biomass are given **Table VII.3**. In the unexposed controls, no Li-P activity could be detected whatever the culture medium. The basal production of laccase was 2-fold higher in Lesa than in Aba media, while the basal production of Mn-P was slightly affected by the composition of the media. Results show that Zn had no significant effect on the oxidase activities whatever the medium. Cu increased the production of oxidases, but the intensity of the response depends on the medium. Compared to the controls the copper inductive factors for laccase production were 2, 140 and 310 in Lesa, Aba5 and Aba2.5 respectively. Mn-P production was stimulated by Cu in the same way but with lower inductive factors of 1.3, 16 and 41 in Lesa, Aba5 and Aba2.5 respectively. Li-P was specifically produced in the presence of Cu but was only detected in the low complexing media Aba5 and Aba2.5, and at least 2-fold more in Aba2.5 than in Aba5.

In Lesa, Cu had no significant effect on oxidase activities for concentrations lower than 1 mM (data not shown). The only significant effect was found for the 1 mM Cu addition. **Fig. VII.4** shows the functional responses of *T. versicolor* exposed to Cu from 10 μ M to 1 mM in Aba media. The response of extracellular oxidases was sensitive to the increase in copper contents of the Aba media. The threshold of copper stimulation was thus determined at 1 μ M, except for Li-P in Aba5 which was stimulated at the threshold value of 10 μ M. These threshold values had to be compared to the one in Lesa medium determined at 1 mM. The intensity of stimulation was at least 2-fold higher in Aba2.5 than in Aba5 for the same concentration of added copper.

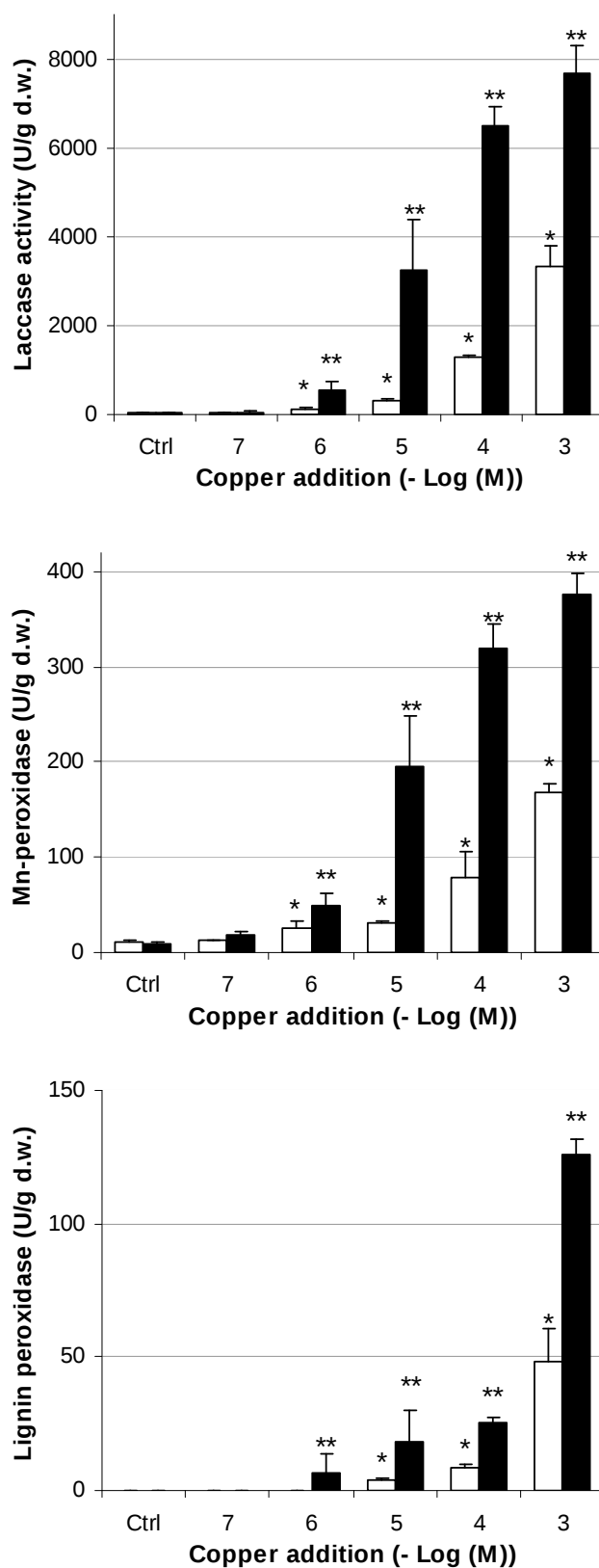


Figure VII. 4. Responses of extracellular oxidases by *T. versicolor* exposed to Cu in Aba5 (□) or Aba2.5 (■) for 7 days. The values are means $\pm$ SE for triplicate cultures. Significant differences: * and **, compared to the respective unexposed controls for each medium ($P < 0.05$).

Statistical analyses by PCA were made with the various potential stressing factors, including the total Cu content, the different Cu species and the C/N values of media. **Fig. VII.5** shows that among the different copper species, i.e. free, inorganic and organic complexes, the free fraction had the best inductive potential on oxidase activities whatever the used medium. A higher correlation with the free copper fraction was found for Li-P ($R > 0.98$; $P < 0.0001$) than for Mn-P or laccase ($R > 0.79$ and $R > 0.77$ respectively; $P < 0.0001$). The fraction of Cu complexed to inorganic ligands was also highly correlated to the stimulation of oxidase activities, unlike the total and organic copper fractions, and the C/N values of the media. But if we take into account the fraction of Cu complexed to amino acids (data not shown); this specific organic complexed fraction was correlated with the stimulation of Li-P, Mn-P and laccase activities ($R > 0.86$, $R > 0.69$ and $R > 0.67$ respectively; $P < 0.0001$).

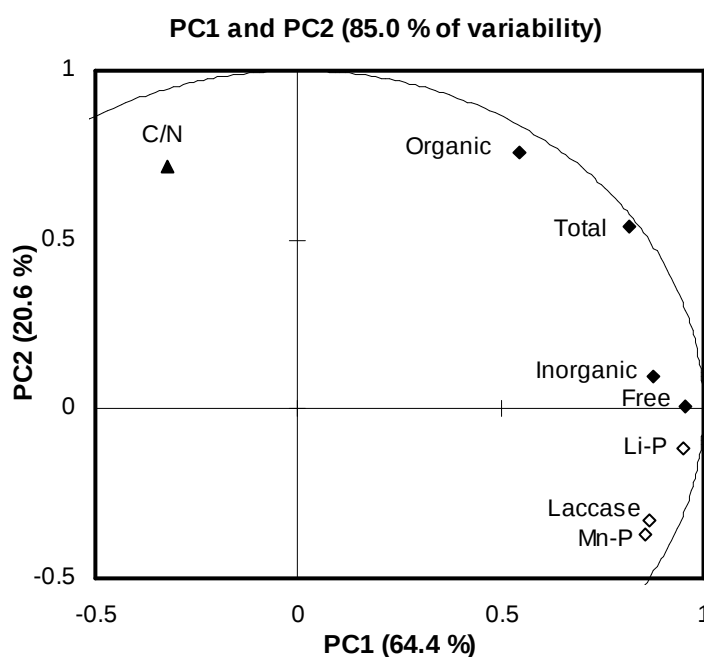


Figure VII.5. Correlation circles of Pearson's principal component analysis between the different fractions of Cu (total, organic or inorganic, and free forms), the C/N ratio and the stimulation of oxidase activities by Cu. This analysis concerns six concentrations of Cu (10 nM to 1 mM) added in Lesa, Aba5 and Aba2.5 media.

4. Discussion

4.1. Metal speciation as affected by the medium composition

The metal stressing conditions for the fungus were here defined as the metal bioavailability, with the hypothesis: i) total metal content is not representative of inductive potential of metal and ii) bioavailable metals for organisms are the free metal species (Vigneault & Campbell 2005). Some authors, however, suggested that species other than free forms can be available, for example when complexed metal forms are labile (Degryse *et al.* 2006). We thus compared the fungal responses to metal additions in various classic media differing in their ability to complex metals. The determinations of Cu^{2+} contents in media allowed us to assess the metal complexation which was very different according to their contents in metal ligands. We verified that added Cu was almost at 100% in the free form in no-complexing media, Czapeck and Aba0. But as soon as yeast extracts or organic substrates are introduced in the culture media, the Cu complexation levels increase in the order Lesa > Aba5 > Aba2.5 (**Table VII.2**). Cu^{2+} measurements confirmed that yeast extracts have metal complexing properties, but results showed that without yeast extracts no growth of *T. versicolor* is observed: a compromise must thus be done. Cu^{2+} measurements also confirmed that the fungus growth influences the copper speciation. This influence is mainly due to changes in pH during the fungus growth, but also to fluxes of carbon and nutriment. The abiotic effect of pH on metal speciation is strong and can be predicted through the use of geochemical modeling, while the impact of fungus growth on copper speciation is worse predicted.

The theoretical metal speciation was consistent with the experimental Cu^{2+} determinations and allowed to calculate the various metal species: free, inorganic or organic bound metal forms whatever the conditions used. The high complexing level of Lesa medium and its low content in free metal species are mainly due to the presence of tartaric acid as major metal ligand. The calculations took into account the complexing effect of yeast extracts through the amino acids as organic ligands. The fact that free forms were computed as always lower for Cu than for Zn, and lower in Lesa medium than in Aba5 and Aba2.5 media is due to the higher stability constants of copper complexes compared to zinc complexes. If only free metal forms are considered as bioavailable or having an impact, metals added in Lesa medium are supposed to have a lower effect on the fungus than in Aba5 or Aba2.5. At equal total

concentrations added in the media, Zn should have a stronger impact than Cu. Furthermore, Zn in Lesa and Cu in Aba2.5 exhibit nearly the same contents in free forms, so that their availability and their impact could be compared.

4.2. Influence of metal speciation on fungal physiology

The culture medium composition has an important role in the growth of *T. versicolor*. Results showed that the biomass production of *T. versicolor* is greater in the Lesa medium with the highest organic carbon content than in Aba5 and Aba2.5 media which differ only by their yeast extract contents (**Table VII.1** and **Fig. VII.1**). When the fungal biomass is taken as a toxicity indicator, our results showed that Zn has no toxic effect on *T. versicolor* even if Zn bioavailable forms are favored in our conditions compared to Cu. On the contrary, Cu toxicity appears in the Aba media compared to the Lesa medium (**Table VII.3**), i.e. when the bioavailability increases. SEM observations of fungal morphology are more difficult to discuss (**Fig. VII.3**). Such observations by SEM are rare in the literature. More generally metal effect on morphology is assessed by visual changes in pigmentation, in mycelia shape or in sclerotization (Crowe & Olsson 2001; Lundy *et al.* 2001; Baldrian 2003). Azevedo *et al.* (2007) observed by SEM some morphological alterations in the presence of Cu in aquatic fungi. In our conditions, for equal total Zn or Cu contents in the culture media, we found that Cu has no effect on the mycelium surface, but Zn can alter the morphology of mycelia. The opposite effects for Zn and Cu on the two chosen toxicity indicators, fungal biomass and morphology, may be related to a difference in the distribution and localization of metal species during exposure. Indeed, Hu *et al.* (2003) suggested to distinguish the bioavailability between the metal uptake (internalization) and the metal adsorption on the membrane surface (externalization) to explain metal impact on a biological trait. It should be interesting to separate these two processes to determine their significance, and to compare them to the significance of the metal speciation in the surrounding environment.

4.3. Influence of metal speciation on functional responses

In the absence of metal, the medium composition slightly affects the production of oxidases. The main effect appears for the laccase production which was 2-fold higher in Lesa medium than in Aba media (**Table VII.3**). This could be explained by differences in C/N ratios and N sources between Lesa and Aba media (Dekker *et al.* 2007). However, the

production of oxidases stays at low level in the various media which is consistent with the absence of significant correlation between the C/N ratios and the oxidase production (**Fig. VII.5**).

Despite available species favored in our experimental conditions with a high content of free forms in liquid culture, Zn had no effect on the extracellular oxidase activities of *T. versicolor*. By contrast, Cu highly increased the production levels of extracellular oxidases despite a speciation not in favor of available species compared to Zn. But its inductive potential was shown to depend on its speciation. The significant correlations found between the stimulation of oxidase activities and the different fractions of Cu gave the following hierarchy of the inductive metal forms: free > inorganic complexed > organic complexed. Our results are thus consistent with the fact that beside free metal forms, some Cu complexes could participate to the response of oxidases in the fungus. The intensity and sensitivity of functional responses strongly increased when the Cu complexation level of the medium decreased thus favoring the metal bioavailability. Our results show that these enzymatic responses can occur at environmental levels of metal contaminations generally low (van Gestel 2008).

The stimulation of laccase activity in the presence of Cu has been observed in other fungi (Crowe & Olsson, 2001; Baldrian 2003). This may be due to the fact that Cu is a constitutive element of the laccase catalytic site (Mougin *et al.* 2003). However, Jarosz-Wilkolazka *et al.* (2006) showed that the laccase activity is also increased by Cd in *Abortiporus biennis* and *Cerrana unicolor*. Furthermore, the stimulation of laccase activity by Cu was also shown to correspond to a regulation at the transcriptional level in *T. versicolor* (Collins & Dobson 1997). We showed that Cu also stimulated Mn-P activity though this metal is not known as a constitutive element of this enzyme. Furthermore, the Li-P not detected in the control cultures was found specifically produced in the presence of Cu when Cu availability was enhanced. To our knowledge, this peroxidase was never detected in the presence of added metal.

5. Conclusion

Our study aimed at testing the hypothesis that the metal speciation plays a great role in the production of fungal enzymes more than the total metal content, and to explore the fact that these productions could be metal specific. *Trametes versicolor* was chosen as a white rot fungus well studied for its ability to produce oxidases. We showed that the intensity and specificity of the response of extracellular enzymes in *T. versicolor* strongly depends on metal speciation. Compared to Zn, Cu was a powerful inductive metal for the stimulation of extracellular oxidases. The threshold value of enzyme activation can be strongly lowered and the inductive power of metal can be strongly enhanced when available Cu species are favored. The Li-P was found specifically produced in the presence of Cu and was the most sensitive to the Cu speciation among the tested oxidase enzymes. These results are consistent with the fact that oxidases could be biomarkers of fungal exposure to metals. Further studies are engaged to validate these enzymatic tools in terrestrial ecosystems.

Acknowledgments

Authors thank A. Kollmann for valuable discussions, N. Wolff for microscopic devices and A. Trouvé for metal content determinations in yeast extracts. J. D. Lebrun was supported by a grant from INRA and the Haute-Normandie Region.

DISCUSSION GENERALE

Le fonctionnement des sols d'agrosystèmes dépend en grande partie de la biodiversité fonctionnelle des organismes qui y vivent. Grâce à leur capacité à synthétiser des enzymes impliquées dans les principaux cycles biogéochimiques, les microorganismes sont à la base de nombreux processus métaboliques environnementaux. En ce sens, les enzymes devraient constituer des indicateurs fonctionnels de la qualité biologique des sols. Cependant, les agrosystèmes sont soumis à différents stressés chimiques et physiques, ce qui affecte les services écologiques rendus par les microorganismes du sol. Ainsi, l'objectif de ce travail de recherche a été d'étudier le potentiel de la biodiversité fonctionnelle, essentiellement fongique, en tant qu'indicateur de l'écotoxicité de composés chimiques dans les sols.

Ce travail de recherche témoigne de la difficulté d'élaborer des descripteurs pertinents d'une contamination métallique dans des conditions environnementales. Les activités enzymatiques sont considérées comme des indicateurs de l'état de santé des sols (Dick, 1997 ; Nannipieri et al., 2002). Toutefois, les approches au champ ont montré la nécessité d'intégrer les facteurs naturels et anthropiques qui peuvent affecter le statut métabolique des microorganismes lors de l'utilisation de tels indicateurs pour évaluer un impact métallique sur le fonctionnement biologique des sols.

Dans des contextes agricoles contrastés (deux prairies et deux cultures intensives sur deux sites localisés en Haute-Normandie), l'expérimentation au champ a permis d'acquérir des bases environnementales gouvernant les variations de la biodiversité fonctionnelle. Au cours d'un cycle cultural, les mesures d'un indicateur global de l'activité microbienne (déshydrogénase) et d'activités hydrolases (phosphatases acide et alcaline, β -glucosidase, N-acétyl- β -glucosaminidase, uréase) dans les sols ont montrés que les activités enzymatiques varient dans l'espace et le temps. Cette variabilité spatiotemporelle s'explique par des facteurs climatiques (climat, température...) qui conditionnent entre autre le développement microbien (Gianfreda & Bollag, 1996 ; Criquet et al., 2002 ; Bouseba et al., 2009) et par la complexité de la matrice sol. L'hétérogénéité de sa structure fournit de nombreux microhabitats pour les communautés microbiennes. Ces niches écologiques, qui sont le siège de processus

métaboliques environnementaux, sont alors fonctionnellement différentes à des échelles microscopiques (Nannipieri et al., 2003).

Il a été également montré que les activités enzymatiques du sol sont sensibles aux pratiques agricoles. Les niveaux d'activités sont plus élevés dans les prairies que dans les sols cultivés. Ceci est à relier au fait que les teneurs totales en C et en N sont au moins deux fois plus élevées dans les prairies que dans les grandes cultures. En effet, les cultures conduisent à un appauvrissement des sols en éléments nutritifs. Il est connu que les propriétés physico-chimiques des sols tels que la teneur en C, conditionnent l'abondance de la biomasse microbienne et donc, les niveaux d'activités enzymatiques (Frey, 2007 ; Bouseba et al., 2009 ; Lagomarsino et al., 2009). Par ailleurs, la diminution de variabilité spatiotemporelle observée dans les sols cultivés par rapport aux prairies peut s'expliquer par le travail du sol. Ce facteur anthropique conduit à une déstructuration de microhabitats et une homogénéisation de la composition des sols au niveau de la parcelle (Smith & Collins, 2007). Cette homogénéisation conduit alors à celle de la répartition géographique de la biodiversité et de ses fonctions. Comme les pratiques agricoles modifient les propriétés intrinsèques de l'habitat des organismes telluriques et par conséquent leur réponse aux contaminants, elles peuvent constituer des facteurs de confusion lors de l'utilisation d'indicateurs fonctionnels de l'état des sols d'agrosystèmes.

Cependant, les activités enzymatiques du sol ne semblent pas être des descripteurs pertinents d'une contamination métallique. Bien que les cosmes ou « écosystèmes terrestres miniaturisés » soient des modèles d'intérêt pour étudier les propriétés biologiques des sols dans des conditions agronomiques, ils n'ont pas permis de révéler un impact du Cu sur les activités enzymatiques, et ce pour une concentration 100 fois supérieure à celle agronomique (200 ppm). Des études complémentaires ont été réalisées sur la distribution et la biodisponibilité du Cu dans les cosmes de sols non déstructurés (Dur et al., 2009). Les résultats ont montré que le métal se distribue de façon homogène verticalement et horizontalement dans les cosmes et qu'il reste potentiellement biodisponible (extraction à l'EDTA). De ce fait, l'absence d'effet du Cu du à son immobilisation totale est à exclure. Il se peut que la fraction biodisponible de cet oligo-élément soit en quantité insuffisante pour provoquer des effets délétères sur les microorganismes. Toutefois, de nombreuses études rapportent que des activités hydrolases sont inhibées lors de contaminations métalliques des

sols (Eivazi & Tabatabaï, 1990 ; Kandeler et al., 1996; Renella et al., 2003 ; Tuomela et al., 2005 ; Lorenz et al., 2006). Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- la sensibilité des microorganismes à un stress chimique est diminuée lorsque leur croissance est limitée en raison d'une faible accessibilité aux éléments nutritifs
- la redondance fonctionnelle des enzymes choisies ne permet pas de traduire un déplacement des communautés lors d'un stress chimique
- l'importante variabilité spatiotemporelle des activités enzymatiques du sol masque l'impact réel du Cu sur les activités

Dans le cadre du programme de l'ADEME « Bioindicateurs de qualité des sols », l'effet du Cu a également été testé dans des cosmes de sols remaniés, i.e. sols tamisés (2 mm) et homogénéisés (travaux non présentés dans ce mémoire). Le tamisage conduit à une remobilisation des éléments nutritifs. Dans ces conditions expérimentales, l'absence d'impact du Cu sur les activités enzymatiques permet d'écarter l'hypothèse d'une baisse de la sensibilité des microorganismes à un stress chimique due à une croissance limitée. Cependant, un déplacement d'équilibre communautaire n'est pas à exclure. Laguerre et al. (2006) ont montré qu'un stress modéré au Cu (< 90 ppm) conduit à des déplacements de populations dans des sols agricoles. La redondance fonctionnelle des enzymes choisies et le fait qu'elles soient soumises à de nombreux facteurs environnementaux expliquent plus vraisemblablement l'absence d'observation d'un effet du métal sur les fonctions métaboliques des microorganismes.

Ces travaux reflètent toute la complexité des approches en écotoxicologie des sols. Les propriétés du compartiment biologique, des contaminants et celles intrinsèques de la matrice sol sont autant de déterminants et d'interférents qu'ils rendent la compréhension d'un événement écotoxicologique difficile. L'intégration de l'influence de facteurs environnementaux et anthropiques est capitale dans l'interprétation des variations d'indicateurs fonctionnels de l'état de sol et la description d'un impact métallique. Par ailleurs, les activités enzymatiques renseignent sur des processus environnementaux globaux sans apporter d'informations sur les espèces activement impliquées. De ce fait, les connaissances limitées sur le potentiel fonctionnel des microorganismes sont un obstacle dans la compréhension de l'action de contaminants sur l'expression de ce potentiel.

Ce travail de recherche a permis d'apporter des éléments sur la relation entre la diversité fongique et l'expression de ses fonctions. Le modèle fongique a été retenu de par sa pertinence écologique dans les sols et par l'importante répartition géographique des champignons (Kjoller & Struwe, 2002 ; Thorn & Lynch, 2007). Les cultures en milieux liquides permettent de s'affranchir de la complexité de la matrice sol, et de ce fait d'acquérir des bases physiologiques sur la régulation et la sécrétion des systèmes fonctionnels fongiques à l'échelle de l'individu. Par ailleurs, les investigations ont été élargies à une famille d'enzyme spécifique à cette communauté tellurique, les oxydoréductases de type ligninolytique (laccase, Mn- et lignine-peroxydases) (Orth et al., 1991 ; Baldrian et al., 2003 ; Bouws et al., 2008).

L'étude de l'expression du potentiel fonctionnel chez un ensemble des champignons représentatifs de cette communauté dans les sols d'agrosystèmes a confirmé leur capacité à sécréter des enzymes impliquées dans les cycles d'éléments nutritifs et dans la dégradation de différents polymères naturels. Ainsi, les hydrolases et notamment celles testées dans les sols sont largement distribuées dans l'ensemble des champignons, ce qui confirme par ailleurs leur redondance fonctionnelle au sein d'une même communauté. A l'inverse, les oxydoréductases ne sont retrouvées que dans 50% des souches testées. Cependant, elles ne sont pas essentiellement sécrétées par les Basidiomycètes dits de la pourriture blanche, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature (Bollag & Leonowicz, 1984 ; Orth et al., 1991 ; Baldrian, 2003). En effet, des activités oxydoréductases ont été détectées chez des Basidiomycètes non ligninolytiques, des Ascomycètes et des Zygomycètes. Ainsi, il est tout à fait envisageable de mesurer ces activités enzymatiques dans les sols d'agrosystèmes.

Puisque les mesures d'activités enzymatiques dans les sols ne permettent pas de discriminer la part intracellulaire et extracellulaire, la localisation des hydrolases et des oxydoréductases a été déterminée dans les différents compartiments de *Trametes versicolor*. Les hydrolases couramment utilisées au champ sont essentiellement localisées au niveau cellulaire (intracellulaire et membranaire). A l'inverse, les oxydoréductases sont préférentiellement retrouvées dans l'environnement extérieur, ce qui est en accord avec l'identification sur leurs gènes de peptides signaux impliqués dans les voies de sécrétion (Johansson & Nyman, 1996). Cependant, cette détermination apporte peu d'informations à l'échelle de l'écosystème car les enzymes extracellulaires ou intracellulaires libérées lors de lyses cellulaires, sont généralement liées aux colloïdes des sols et sont de ce fait persistantes

dans l'environnement (Huang et al., 2005 ; Kandeler et al., 2007). La localisation de la diversité fonctionnelle au niveau extracellulaire reste néanmoins à être reliée aux besoins nutritionnels des organismes. En effet, la sécrétion des enzymes est régulée par les stocks de nutriments présents dans l'environnement (Olander & Vitousek, 2000). De la même manière, l'état physiologique des organismes conditionne son activité métabolique et ses implications écologiques dans l'environnement. Par exemple, lorsque les sources de C facilement assimilables (oligomères, dimères) sont limitantes, la sécrétion des oxydoréductases est stimulée confirmant la capacité des champignons à activer des voies métaboliques alternatives impliquées dans la dégradation de polymères complexes tels que la lignine (Orth et al., 1991 ; Sato et al., 2007 ; Lebrun et al., 2009).

Bien que l'amélioration des connaissances sur la diversité fonctionnelle contribue à une meilleure compréhension du fonctionnement biologique des sols, elle reste dans ces travaux limitée à des représentants de deux familles d'enzymes. L'étude des sécrétomes fongiques via des approches en électrophorèse bidimensionnelle et en spectrométrie de masse permettrait une meilleure accessibilité à la diversité fonctionnelle (Maron et al., 2007^a). Toutefois, cela implique que les protéines d'intérêt écologique aient été caractérisées au préalable. En effet, une grande partie des protéines sécrétées par les champignons restent à être identifiées (Oda et al., 2006 ; Kim et al., 2007 ; Sato et al., 2007 ; Bouws et al., 2008).

Ce travail de recherche confirme l'hypothèse que les profils fonctionnels fongiques sont utilisables pour évaluer l'écotoxicité des métaux dans les sols. Grâce à leur capacité à croître dans un environnement contaminé par des métaux et à leur réponse métabolique adaptative à un stress métallique, les champignons sont des modèles biologiques intéressants dans le développement d'outils pour l'évaluation de l'écotoxicité de ces contaminants dans les sols. Lors de cultures liquides fongiques, différents mécanismes de tolérance aux métaux ont été rapportés dans la littérature (Gadd, 1993 ; Fomina et al., 2005^{a,b}). A l'échelle environnementale, les contaminations métalliques diminuent l'abondance de la biomasse microbienne avec une sensibilité plus grande pour la communauté bactérienne que celle fongique (Vig et al., 2003 ; Lorenz et al., 2006 ; Lejon et al., 2008). De toute évidence, la présence de métaux dans l'environnement a des conséquences tant d'un point de vue écologique qu'agronomique. La limitation de croissance des organismes telluriques conduit à

des déplacements de l'équilibre des communautés et l'effet métallique sur leurs métabolismes affecte les flux et la dynamique des éléments nutritifs.

L'expérimentation en cultures liquides a permis, lors d'expositions métalliques, d'obtenir des réponses caractéristiques de la diversité fonctionnelle fongique. L'action des métaux sur l'expression du potentiel fonctionnel des champignons isolés d'agrosystèmes se traduit par des modulations d'activités enzymatiques. La réponse des hydrolases aux métaux est complexe. Elle dépend de l'enzyme, du champignon et du métal considéré. Cette grande variabilité intracommunautaire peut expliquer l'absence d'effet du Cu sur les activités enzymatiques globales du sol lors des études en cosmes. A l'inverse, les activités oxydoréductases sont stimulées par le Cu et le Cd, et non par le Zn et le Pb. Cette réponse se produit indépendamment du genre et de l'espèce fongique malgré des sensibilités individuelles différentes. Toutefois, l'état physiologique du champignon conditionne la sensibilité des réponses enzymatiques (Lebrun et al., 2009). Ceci confirme que des organismes telluriques exposés à des contaminants dans des conditions environnementales auront des réponses plus élevées lors d'une stimulation de leur croissance et de leur activité métabolique que lorsqu'ils sont en dormance. La stimulation de l'activité laccase a été décrite chez différents champignons filamenteux (Collins & Dobson, 1997 ; Crowe & Olsson, 2001 ; Levin et al., 2002 ; Baldrian et al., 2006). Bien que les oligo-éléments disposent de transporteurs membranaires, les mécanismes d'induction sont encore mal décrits. Mais il est connu que des gènes codant pour les oxydoréductases disposent de séquences MRE, capables d'augmenter leur expression transcriptionnelle (Johansson & Nyman, 1996 ; Giardina et al., 1999 ; Baldrian, 2003). Ainsi, les oxydoréductases sont parfois considérées comme des protéines de stress. Par ailleurs, il y a des réponses spécifiques aux métaux dans le sens où elles ne sont pas retrouvées chez des organismes « sains », i.e. non exposés. En effet, certaines souches fongiques sécrètent des oxydoréductases uniquement en présence de métaux, ce qui n'a pas été rapporté dans la littérature à notre connaissance (Lebrun et al., 2009).

L'exposition de *T. versicolor* à l'ensemble des principaux métaux retrouvés dans les agrosystèmes (Cu, Zn, Pb et Cd) testés seuls ou en cocktail a montré une action des métaux sur la sécrétion des oxydoréductases au niveau protéique. En effet, les métaux agissent sur la régulation de la sécrétion et sur les processus post-traductionnelles des oxydoréductases fongiques. La stimulation de l'activité laccase par le Cu et le Cd est corrélée à une

augmentation de la sécrétion de ses isoenzymes (LacA et LacB). Par ailleurs, ces formes constitutives et inductives de laccases sont différemment glycosylées en présence de métaux. Ces différences de glycosylation, processus post-traductionnel impliqué dans la stabilité et la protection protéique, permettent de relier des réponses caractéristiques à une exposition métallique. Cependant, il est préférable d'appréhender ce dernier aspect en électrophorèse bidimensionnelle qui permet une meilleure séparation des isoformes glycosylées pour leur caractérisation. Bien que les cocktails métalliques soient plus représentatifs des multi-contaminations des sols d'agrosystèmes, aucun effet cumulatif n'a été mis en évidence suggérant des phénomènes de compétition entre les métaux et l'importance de prendre en compte leurs propriétés physico-chimiques (Hu et al., 2003). De toute évidence, l'appréhension de ces multi-contaminations dans des systèmes plus complexes que des milieux de cultures liquides comme les sols constitue des challenges multiparamétriques dans la compréhension de ces phénomènes de compétition.

L'existence d'une réponse générique des oxydoréductases au sein d'une même communauté et de réponses caractéristiques d'exposition aux métaux renforce la pertinence de ces enzymes en tant qu'outils pour évaluer l'écotoxicité des métaux dans les sols. Les variations de niveaux d'oxydoréductases dans les sols pourraient alors témoigner d'une contamination métallique.

Ce travail de recherche montre que les oxydoréductases sont sensibles à une contamination métallique à des concentrations environnementalement réalistes. Dans des conditions environnementales, il est connu que les teneurs totales en métaux dans les sols ne permettent pas d'évaluer leurs impacts sur la biocénose. En effet, le pouvoir toxique des métaux et leur biodisponibilité dépendent de leur spéciation (Vulkan et al., 2000 ; Vig et al., 2003 ; Sun et al., 2006 ; van Gestel, 2008). De ce fait, l'influence de la spéciation du Cu et du Zn a été testée sur la réponse des oxydoréductases de *T. versicolor*, cultivé dans des milieux exhibant différents niveaux de complexation vis-à-vis des métaux. La réponse du champignon est fortement dépendante de la spéciation métallique. L'intensité de la réponse de ces enzymes augmente lorsque le métal est rendu plus biodisponible. Même si le Zn de par ses propriétés physico-chimiques est plus mobile et biodisponible que le Cu, cette réponse reste spécifique au Cu. Cette expérimentation a également permis de relier les réponses fonctionnelles à une forme active et biodisponible du métal. Il existe une forte corrélation

entre les quantités de formes libres du Cu, i.e. Cu^{2+} et la stimulation des activités oxydoréductases. Toutefois, certaines formes inorganiques et organiques du métal peuvent être mobilisées et assimilées par le champignon (Vulkan et al., 2000 ; Degryse et al., 2006). Par ailleurs, la sensibilité de la réponse des oxydoréductases est augmentée lorsque la biodisponibilité du Cu est favorisée. En conséquence, ces activités sont stimulées pour des concentrations en Cu inférieures à 10 μM soit 0,63 mg/l. D'après le modèle semi mécanistique de Sauvé et al. (2000) basé sur l'adsorption compétitive du Cu^{2+} et du H^+ , la teneur de le Cu^{2+} dissous dans les cosmes de sols non déstructurés de prairies et de grandes cultures contaminés par 200 ppm de Cu est de l'ordre de 1 mg/l (Dur et al., 2009). Ainsi, la réponse des oxydoréductases fongiques se produit à des niveaux de contaminations environnementalement réalistes.

L'ensemble de ces travaux confirme la pertinence des oxydoréductases fongiques en tant que biomarqueurs d'exposition aux métaux. En effet, elles répondent à différents critères de biomarqueurs d'exposition aux métaux :

- elles sont spécifiques à une communauté d'intérêt écologique et largement distribuée dans les écosystèmes terrestres
- leur réponse est spécifique à certains métaux (Cu et Cd)
- il existe une généricité intracommunautaire de cette réponse
- leur réponse se produit indépendamment du stade de vie de l'organisme
- il existe une relation entre la stimulation d'activité et la production protéique
- il existe des réponses caractéristiques d'exposition métallique, i.e. glycosylations différentielles et productions d'oxydoréductases spécifiques en présence de métaux
- il existe une stimulation de leurs activités proportionnelle à la fraction biodisponible et active du métal

Ceci confirme que ces acteurs biochimiques du fonctionnement des sols pourraient être des descripteurs d'une contamination métallique. Toutefois, il est nécessaire de valider ces outils enzymatiques *in situ*, afin de déterminer l'influence des facteurs environnementaux et anthropiques, tel que le travail du sol dans le cas des agrosystèmes, lesquels pourraient masquer l'impact réel d'un stress métallique sur les activités oxydoréductases.

CONCLUSION GENERALE

Pertinence de l'utilisation de biomarqueurs fongiques in situ

Ce travail de recherche multidisciplinaire réalisé à différentes échelles, de l'écosystème à la molécule, a permis :

- d'améliorer les connaissances de l'influence de facteurs environnementaux et anthropiques sur des indicateurs fonctionnels de l'état des sols
- d'améliorer les connaissances sur la biodiversité fonctionnelle et notamment sur la relation entre la diversité fongique et l'expression de ses fonctions
- d'évaluer l'impact de stressors chimiques retrouvés dans les sols agricoles, les métaux, sur les systèmes fonctionnels fongiques.

Lors de cultures liquides de champignons, des profils de sécrétion caractéristiques d'expositions métalliques ont été obtenus à partir de deux grandes familles d'enzymes impliquées dans le fonctionnement des sols, les hydrolases et les oxydoréductases. Nous avons conclu que la réponse de la diversité fonctionnelle des champignons pourrait être utilisée pour évaluer l'écotoxicité des métaux dans les sols. A ces fins, les oxydoréductases semblent être des outils pertinents. Cependant, nous avons également montré l'importance de prendre en considération l'influence de facteurs environnementaux (structure et composition des sols, climat...) et de facteurs anthropiques (pratiques agricoles, travail du sol...) lors de l'interprétation de mesures d'activités enzymatiques à l'échelle parcellaire. Par conséquent, l'applicabilité d'utiliser de tels outils enzymatiques reste à être validé *in situ* afin de prendre en compte l'ensemble des paramètres biotiques et abiotiques gouvernant l'écologie des communautés microbiennes.

Les oxydoréductases de type ligninolytique sont préférentiellement retrouvées dans les écosystèmes forestiers. Bien que leurs niveaux d'activités puissent être faibles dans les agrosystèmes, Gianfreda et al. (2005) ont mesuré des activités laccases dans des sols agricoles cultivés ou non. Ainsi, il est possible de mettre en place des écosystèmes terrestres miniaturisés afin d'évaluer la réponse d'activités oxydoréductases à l'introduction de contaminants métalliques dans des conditions naturelles. Cela nécessite d'utiliser des méthodes fiables de dosages de ces activités dans les sols. Or, il est connu que le dosage de l'activité laccase peut être biaisé par des réactions abiotiques capables d'oxyder les substrats utilisés (Floch et al., 2007). Dans le cas où, l'activité des oxydoréductases serait trop faible

pour être détectée dans les sols ou soumise à d'importantes interférences abiotiques, d'autres alternatives sont envisageables.

Une première alternative serait d'inoculer des champignons connus pour produire des oxydoréductases dans des sols et d'étudier l'effet d'une contamination sur l'expression des enzymes. Par exemple, Ford et al. (2007) ont mesurés des activités laccases, Mn- et lignine-peroxydases après inoculation d'espèces *Trametes* dans des sols contaminés par des chlorophénols. De la même manière, Rama et al. (2001) ont suivi la croissance de *T. versicolor* et la production de laccases après inoculation du champignon dans des sols contaminés par des HAP. Il est à noter que la souche inoculée peut se trouver en compétition avec la microflore autochtone ce qui peut perturber l'analyse de l'effet du Cu.

Une seconde alternative serait d'accéder à la biodiversité fonctionnelle par des empreintes protéomiques. Pour ce faire, les protéines sont extraites des sols à l'aide d'un acide puissant (l'acide fluorhydrique) et identifiées par spectrométrie de masse. De cette manière, Schulze et al. (2005) ont montré des variations de profils protéiques et d'oxydoréductases telles que les laccases au cours des saisons. Il est approprié de penser que de telles variations puissent être observées en présence de contaminants.

Une troisième alternative serait de détecter et de quantifier les oxydoréductases par des méthodes immunologiques. Maron et al. (2003) ont montré l'applicabilité de ces méthodes en estimant les niveaux de la nitrite-oxydoréductase dans des environnements complexes comme les sols. Cette approche pourrait être utilisée pour quantifier les niveaux de réponse des oxydoréductases fongiques à une contamination métallique dans des conditions naturelles.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM (2000).** Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Appl Environ Microbiol* 66:3357-3362.
- Abrahams PW (2002).** Soils: their implications to human health (a review). *Sci Total Environ* 291:1-32.
- Ahn MY, Zimmerman AR, Martinez CE, Archibald DD, Bollag JM, Dec J (2007).** Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminium hydroxide. *Enz Microb Technol* 41:141-148.
- Alloway BJ (1995).** Heavy metals in soils. Alloway BJ (Ed.) 2^e edition. Blackie academic and professional, Glasgow, UK.
- Anderson IC, Parkin PI, Campbell CD (2008).** DNA- and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc. *Soil Biol Biochem* 40:2358-2365.
- Ascosta-Martínez V, Tabatabaï MA (2000).** Enzymes activities in a limed agricultural soil. *Biol Fertil Soils* 31:85-91.
- Avidano L, Gamalero E, Cossa GP, Carraro E (2005).** Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Appl Soil Ecol* 30:21-33.
- Azevedo MM, Carvalho A, Pascoal C, Rodrigues F, Cássio F (2003).** Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Sci Total Environ* 317:233-243.

B

- Baldrian P (2003).** Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enz Microb Technol* 32:78-91.
- Baldrian P, Valaskova V (2008).** Review: Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32:501-521.
- Baldrian P, Valášková V, Merhautová V, Gabriel J (2006).** Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Res Microbiol* 156:670-676.
- Bergstrom DW, Monreal CM, King DJ (1998).** Sensitivity of soil enzyme activities to conservation practices. *Soil Sci Soc Am J* 62:1286-1295.

- Bertrand^a T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C (2002).** Crystal structure of a four-copper laccase complexed with arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochem* 41:7325-7333.
- Bertrand^b T, Jolival C, Caminade E, Joly N, Mougin C, Briozzo P (2002).** Purification and preliminary crystallographic study of *Trametes versicolor* laccase in its native form. *Acta Cryst* D58:319-321.
- Bispo A, Grand C, Galsomies L (2009).** Le programme ADEME « Bioindicateurs de qualité des sols ». *Etude et Gestion des Sols* 16:67-79.
- Blum WEH, Büsing J, Montanarella L (2004).** Research needs in support of the European thematic strategy for soil protection. *Trends Anal Chem* 23:680-685.
- Bollag JM, Leonowicz A (1984).** Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol* 48:849-854.
- Borgia PI, Mehnert DW (1982).** Purification of a soluble and a wall-bound form of β -glucosidase from *Mucor racemosus*. *J Bacteriol* 149:515-522.
- Bouseba B, Zertal A, Beguet J, Rouard N, Devers M, Martin C, Martin-Laurent F (2009).** Evidence for 2,4D mineralization in Mediterranean soils: impact of moisture content and temperature. *Pest Manag Sci* 65:1021-1029.
- Bouws H, Wattenberg A, Zorn H (2008).** Mini-review: Fungal secretomes-nature's toolbox for white technology. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:381-388.
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Braha B, Tintemann H, Krauss G, Ehrman J, Bärlocher F, Krauss GJ (2007).** Stress response in two strains of the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* after exposure to cadmium and copper ions. *Biometals* 20:93-105.

C

- Cajthaml T, Erbanova P, Kollmann A, Novotny C, Sasek V, Mougin C (2008).** Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol* 53:289-294.
- Calbrix R, Laval K, Barray S (2005).** Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil: a reproducible procedure using sole-carbon-source utilization profiles. *Eur J Soil Biol* 41:1-20.

- Calvert R (2003)** Le sol – Propriétés et fonctions, Tome 1, Editions France Agricole – Dunod, France. **a-** Le sol, milieu à trois phases. pp. 81-89; **b-** Les enjeux de la science du sol. pp. 39-60.
- Cassland P, Jönsson LJ (1999).** Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:393-400.
- Chander K, Brookes PC (1991).** Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate activity in copper contaminated soils? *Soil Biol Biochem* 23:909-915.
- Chassin P, Baize D, Cambier P, Sterckeman T (1996).** Les éléments traces métalliques et la qualité des sols : impact à moyen et à long terme. *Etude et Gestion des Sols* 3:297-305.
- Christie P, Beattie JAM (1989).** Grassland soil microbial biomass and accumulation of potentially toxic metals from long-term slurry application. *J Appl Ecol* 26:597-612.
- Collins PJ, Dobson ADW (1995).** Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor* 290. *Biotechnol Lett* 17:989-992.
- Collins PJ, Dobson ADW (1997).** Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 63:3444-3450.
- ComOp - Comité Opérationnel “Recherche” (2008).** Grenelle de L’environnement, chantier n° 30, rapport à Jean-Louis Borloo et Valérie Pécresse : <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics>.
- Criquet S, Tagger S, Vogt G, Le Petit J (2002).** Endoglucanase and β -glucosidase activities in an evergreen oak litter: annual variation and regulating factors. *Soil Biol Biochem* 34:1111-1120.
- Crosby DG (1982).** Environmental chemistry: an overview. *Environ Toxicol Chem* 1:1-18.
- Crowe JD, Olsson S (2001).** Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl Environ Microbiol* 67:2088-2094.

D

- Deacon LJ, Pryce-Miller EJ, Frankland JC, Bainbridge BW, Moore PD, Ronbinson CH (2006).** Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biol Biochem* 38:7-20.
- Degryse F, Smolders E, Merckx R (2006).** Labile Cd complexes increase Cd availability to plants. *Environ Sci Technol* 40:830-836.

- Dekker RFH, Barbosa AM, Giese EC, Godoy SD, Covizzi LG (2007).** Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Internat Microbiol* 10:177-185.
- Demanou J, Sharma S, Dörfler U, Schroll R, Pritsch K, Njine T et al. (2006).** Structural and functional diversity of soil microbial communities as a result of combined applications of copper and mefenoxam. *Soil Biol Biochem* 38:2381-2389.
- Deng SP, Tabatabaï MA (1997).** Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biol Fertil Soils* 24:141-146.
- Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, Hmidi R, Labat M, Martinez MJ, Sayadi S (2005).** Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol* 21:1415-1423.
- Di Nardo C, Cinquegrana A, Papa S, Fuggi A, Fioretto A (2004).** Laccase and peroxydase isoenzymes during leaf litter decomposition of *Quercus ilex* in a Mediterranean ecosystem. *Soil Biol Biochem* 36:1539-1544.
- Dick RP (1997).** Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Parkhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (Eds). *Biological indicators of soil health*. CAB International, Oxon, UK. pp 121-156.
- Dick RP, Breakwell DP, Turco RF (1996).** Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: Doran JW, Jones AJ (Eds). *Methods for Assessing Soil Quality*. SSSA Inc., Madison, Wisconsin, USA. pp. 247-272.
- Donnelly KC, Chen JC, Huebner HJ, Brown KW, Autenrieth RL, Bonner JS (1997).** Utility of four strains of white-rot fungi for the detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid culture. *Environ Toxicol Chem* 16:1105-1110.
- Dur JC, Bailleul C, Lamy I, Mougin C, Legras M (2009).** Vertical distribution of copper added in soil micocosms used to mimick fields: influence of experimental modalities (Poster). SETAC-Europe, Göteborg, Sweden.

E

- Eivazi F, Tabatabaï MA (1988).** Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol Biochem* 20:601-606.
- Eivazi F, Tabatabaï MA (1992).** Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biol Biochem* 22:891-897.

- Ekenler^a M, Tabatabaï MA (2002).** β -glucosaminidase activity of soils : effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biol Fertil Soils* 36:367-376.
- Ekenler^b M, Tabatabaï MA (2002).** Effects of trace elements on β -glucosaminidase activity of soils. *Soil Biol Biochem* 34:1829-1832.
- European Commission (2002).** Communication from the Commission to Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the regions: towards a thematic strategy for soil protection. COM(2002)179 final: <http://ec.europa/environment/soil/>.
- European Commission (2006).** Communication from the Commission to Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the regions: thematic strategy for soil protection. COM(2006)231: <http://ec.europa/environment/soil/>.

F

- Floch C, Alarcon-Gutiérrez E, Criquet S (2007).** ABTS assay of phenol oxidase in soil. *J Microbiol Method* 71 :319-324.
- Flores-Vélez L, Ducaroir J, Jaunet M, Robert M (1996).** Study of the distribution of copper in acid sandy vineyard soil by three different methods. *Eur J Soil Sci* 47:523-532.
- Fomina M, Ritz K, Gadd GM (2003).** Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. *Mycol Res* 7:861-871.
- Fomina^a MA, Hillier S, Charnock JM, Melville K, Alexander IJ and Gadd JM (2005).** Role of oxalic acid overexpression in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Appl Environ Microbiol* 71:371-381.
- Fomina^b MA, Alexander IJ, Colpaert JV, Gadd GM (2005).** Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 37:851-866.
- Forbes VE, Palmqvist A, Bach L (2006).** The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 25:272-280.
- Ford CI, Walter M, Northcott GL, Di HJ, Cameron KC, Trower T (2007).** Fungal inoculum properties : extracellular enzyme expression and pentachlorophenol removal by new Zealand *Trametes* species in contaminated field soils. *J Environ Qual* 36:1749-1759.
- Fragoeiro S, Magan N (2005).** Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environ Microbiol* 7:348-355.

Frey SD (2007). Spatial distribution of soil organisms. In: Paul EA (Ed.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (3rd ed). Elsevier inc., Oxford, UK. pp. 283-299.

G

Gabriel J, Kofronova P, Rychlovsky R, Krenzelok M (1996). Accumulation and effect of cadmium in the wood-rotting basidiomycete *Daedalea quercina*. *Bull Environ Contam Toxicol* 57:383-390.

Gadd GM (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* 124:25-60.

Gaultier JP, Cambier P, Citeau L, Lamy I, van Oort F, Isambert M, Baize D, Tercé M (2003). Devenir des éléments traces métalliques dans les sols du Vexin français soumis à des épandages de boues. *AGREDE*, Dossier de l'environnement n°25.

Ghanem A, Bados P, Estaun AR, de Alencastro LF, Taibi S, Einhorn J, Mougin C (2007). Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof French urban sewage sludge. *Chemosphere* 69:1368-1373.

Gianfreda L, Bollag JM (2002). Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: Burns RG, Dick RP (Eds). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 491-538.

Gianfreda L, Bollag JM (1996). Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: Stotzky G, Bollag JM (Eds). *Soil Biochemistry*, vol.9. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 123-194.

Gianfreda L, Rao MA (2004). Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enz Microbial Technol* 35:339-354.

Gianfreda L, Rao MA, Piotrowska A, Palumbo G, Colombo C (2005). Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Sci Total Environ* 341:265-279.

Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, Sannia G (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J*, 341:655-663.

Giller KE, Witter E, McGrath SP (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* 30:1389-1414.

Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leiros MC, Seoane S (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol Biochem* 37:877-887.

- Gobat JM, Aragno M, Matthey W (2004).** The Living Soil: fundamental of soil science and soil biology, Science publishers inc., NH, USA. **a-** Building blocks of the soil system: Inert constituents and living organism. pp. 13-44; **b-** Soil properties. pp.45-76; **c-** Bioremediation of contaminated soils. pp. 361-378.
- Gonzalez-Gil G, Jansen S, Zandvoort MH, van Leeuwen HP (2003).** Effect of yeast extract on speciation and bioavailability of nickel and cobalt in anaerobic bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 82:134-42.
- Gori K, Hébraud M, Chambon C, Mortensen HD, Arneborg N, Jerpersen L (2006).** Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Res* 7:293-203.
- Grierson PF, Adams MA (2000).** Plant species affect acid phosphatase, ergosterol and microbial P in a Jarrah (*Eucalyptus marginata* Donn ex Sm.) forest in south-western Australia. *Soil Biol Biochem* 32:1817-1827.
- Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC (2002).** Sanco/3268 rev.4/2001 (final), 17 October 2002.

H

- Harden T, Joergenson RG, Meyer B et al. (1993).** Mineralization of straw and formation of soil microbial biomass in a soil treated with simazine and dinoterb. *Soil Biol Biochem* 25:7273-7276.
- Heijerick DG, van Sprang PA, van Hyfte AD (2006).** Ambient copper concentration in agricultural and natural european soils: an overview. *Environ Toxicol Chem* 25:858-864.
- Hinojosa MB, Carreira JA, Garcia-Ruiz R, Dick RP (2004).** Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biol Biochem* 36:1559-1568.
- Hu Z, Chandran K, Grasso D, Smets BF (2003).** Impact of metal sorption and internalization on nitrification inhibition. *Environ Sci Technol* 37:728-734.
- Huang PM, Wang MK, Chiu CY (2005).** Soil mineral-organic matter-microbe interactions: impacts on biogeochemical processes and biodiversity in soils. *Pedobiologia* 49:609-635.

I

Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW (2004). Recent development in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J Environ Eng Sci* 3:1-19.

J

Jacobsen AM, Lorenzen A, Chapman, Topp E (2005). Persistence of testosterone and 17 β -estradiol in soils receiving swine manure or municipal biosolids. *J Environ Qual* 34:861-871.

Jarosz-Wilkolazka A, Graz M, Braha B, Menge S, Schlosser D, Krauss GJ (2006). Species-specific Cd-stress response in the white-rot basidiomycetes *Abortiporus biennis* and *Cerrena unicolor*. *BioMetals* 19:39-49.

Jenkinson DS (1966). The Priming Action. In: The use of isotopes in soil organic matter studies. Pergamon, Oxford, UK. pp. 199-208.

Joergensen RG, Emmerling C (2006). Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 169:295-309.

Johansson T, Nyman PO (1996). A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene* 170:31-38.

Jolival C, Madzak C, Brault A, Caminade E, Malosse C, Mouglin C (2005). Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:456-456.

Jönsson L, Johansson T, Sjöström K, Nyman PO (1987). Purification of ligninase isoenzymes from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Acta Chem Scand* B41:766-769.

Jordan D, Kremer RJ, Bergfield WA (1995). Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biol Fertil Soils* 19:279-302.

Joshi MS, Ingle YV, Dhakate SR, Sarnaik SD, Ujjainkar VV (2007). The cellulose enzymic ability of some plant parasitic fungi. *J Plant Dis Sci* 2:65-67.

K

- Kähkönen MA, Lankinen P, Hatakka A (2008).** Hydrolytic and ligninolytic enzyme activities in the Pb contaminated soil inoculated with litter-decomposing fungi. *Chemosphere* 72:708-714.
- Kandeler E (2007).** Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: Paul EA (Ed.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (3rd ed). Elsevier inc., Oxford, UK. pp. 53-80.
- Kandeler E, Gerber H (1988).** Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol Fertil Soils* 6:68-72.
- Kandeler E, Kampichler C, Horak O (1996).** Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fert Soils*, 23:299-306.
- Kennedy AC, Gewin VL (1997).** Soil microbial diversity: present and future considerations. *Soil Sci* 162:607-617.
- Keshri G, Magan N (2000).** Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 89:825-833.
- Killham K, Staddon W (2002).** Bioindicators and sensors of soil health and application of geostatistics. In: Burns RG, Dick RP (Eds). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 391-405.
- Kim JH, Byun DS, Godber JS, Choi JS, Choi WC, Kim HR (2004).** Purification and characterization of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:553-559.
- Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR (2007).** Proteomics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol* 25:395-400.
- Kjoller AH, Struwe S (2002).** Fungal communities, succession, enzymes and decomposition. In: Burns RG, Dick RP (Eds). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 267-282.
- Kollmann A, Boyer FD, Ducrot PH, Kerhoas L, Jolival C, Touton I, Einhorn J, Mougin C (2005).** Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:251-258.

- Kollmann A, Brault A, Touton I, Dubroca J, Chaplain V and Mougin C (2003).** Effect of nonylphenol on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils. *J Environ Qual* 32:1269-1276.
- Kovacs K, Macrelli S, Szakacs G, Zacchi G (2009).** Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnol Biofuels* 2:14-25.
- Kunito T, Saeki K, Goto S, Hayashi H, Oyaizu H, Matsumoto S (2001).** Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long term sludge amended soils. *Biores Technol* 79:135-146.
- Kwasna H, Sierota Z, Bateman GL (2000).** Fungal communities in fallow soil before and after amending with pine sawdust. *Appl Soil Res* 14:177-182.

L

- Labanowski J, Monna F, Bermond A, Cambier P, Fernandez C, Lamy I, van Oort F (2008).** Kinetic extractions to assess mobilization of Zn, Pb, Cu and Cd in a metal-contaminated soil: EDTA vs. citrate. *Environ Poll* 152:693-701.
- Labanowski J, Sebastia J, Foy E, Jongmans T, Lamy I, van Oort F (2007).** Fate of metal-associated POM in a soil under arable land use contaminated by metallurgical fallout in northern France. *Environ Poll* 149:59-69.
- Lagomarsino A, Moscatelli MC, Di Tizio A, Mancinelli R, Grego S, Marinari S (2009).** Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment. *Ecol Indicators* 9:518-527.
- Laguerre G, Courde L, Nouaïm R, Lamy I, Revellin C, Breuil M, Chaussod R (2006).** Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microb Ecol* 52:426-435.
- Lal R (1997).** Degradation and resilience of soils. *Philosoph Trans Royal Soc* B352:997-1010.
- Laval K, Mougin C, Akpa M, Barray S, Dur JC, Gangneux C, Lebrun J, Legras M, Lepelletier P, Plassart P, Taibi S, Trinsoutrot-Gattin I (2009).** Un premier pas vers la compréhension des données biologiques. *Etude et Gestion des Sols* 16:67-79.

- Lebrun JD, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K, Mougin C (2009).** Insights into the development of fungal biomarkers for metal ecotoxicity assessment: case of *Trametes versicolor* exposed to copper. *Environ Toxicol Chem* online.
- Lebrun JD, Wolff N, Lamy I, Mougin C (2007).** Exocellular oxidases can be sensitive biomarkers of fungal exposure to metals (Poster). 8th European Meeting on Environmental Chemistry, Inverness, Ecosse.
- Lejon DPH, Martins JMF, Lévêque J, Spadini L, Pascault N, Landry D, et al. (2008).** Copper dynamics and impact on microbial communities in soils of variable organic status. *Environ Sci technol* 42:2819-2825.
- Lesage-Meesen L, Delattre M, Haon M, Thibault JF, Ceccaldi BC, Brunerie P, Asther M (1996).** A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol* 50:107-113.
- Levin L, Forchiassin F, Ramos AM (2002).** Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* 94:377-383.
- Liang Y, Chen H, Tang M, Shen S (2007).** Proteome analysis of an ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* under salt shock. *Mycol Res* III:939-946.
- Loiseau L, Barriuso E (2002).** Characterization atrazine's bound (nonextractable) residues using fractionation techniques for soil organic matter. *Environ Sci Technol* 36:683-689.
- Lorenz N, Hintemann T, Kramarewa T, Katayama A, Yasuta T, Marschner P, Kandeler E (2006).** Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. *Soil Biol Biochem* 38:1430-1437.
- Lundy SD, Payne RJ, Giles KR, Garrill A (2001).** Heavy metals have different effects on mycelial morphology of *Achlya bisexualis* as determined by fractal geometry. *FEMS Microbiol Letters* 201:259-263.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ et al. (2004).** Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am J Botany* 91:1446-1480.
- Lynch MDJ, Thorn RG (2006).** Diversity of basidiomycetes in Michigan agricultural soils. *Appl Environ Microbiol* 72:7050-7056.
-

M

- Madejon E, Burgos P, Lopez R, Cabrera F (2001).** Soil enzymatic response to addition of heavy metals with organic residues. *Biol Fertil Soils* 34:144-150.
- Maron PA, Coeur C, Pink C, Clays-Josserand A, Lensi R, Richaume A, Potier P (2003).** Use of polyclonal antibodies to detect and quantify the NOR protein of nitrite-oxidizers in complex environments. *J Microbiol Method* 53:87-95.
- Maron^a PA, Ranjard L, Mougél C, Lemanceau P (2007).** Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology. *Microb Ecol* 53:486-493.
- Maron^b PA, Mougél C, Siblot S, Abbas H, Lemanceau P, Ranjard L (2007).** Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment. *Microb Ecol* 53:426-434.
- Martin-Laurent F, Piutti S, Hallet S, Wagschal I, Philippot L, Catroux G, Soulas G (2003).** Monitoring of atrazine treatment on soil bacterial, fungal and atrazine-degradating communities by quantitative competitive PCR. *Pest Manag Sci* 59:259-268.
- McCarthy GW, Meisinger JJ (1997).** Effects of N fertilizer treatments on biologically active N pools in soils under plow and no tillage. *Biol Fert Soils* 24 :406-412.
- Meylan S, Behra R, Sigg L (2004).** Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: A microcosm study. *Environ Sci Technol* 38:3104-3111.
- Mikanova O (2006).** Effects of heavy metals on some soil biological parameters. *J Geochem Explor* 88:220-223.
- Miller M, Palojarvi A, Rangger A, Reeslev M, Kjoller A (1998).** The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil. *Appl Environ Microbiol* 64:613-617.
- Morris SJ, Blackwood CB (2007).** The Ecology of soil organisms. In: Paul EA (Ed.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (3rd ed). Elsevier inc., Oxford, UK. pp. 195-226.
- Morvan X, Saby NPA, Arrouays D, Le Bas C, Jones RJA, Verheijen FGA, Bellamy PH, Stephens M, Kibblewhite MG (2008).** Soil monitoring in Europe: A review of existing systems and requirements for harmonisation. *Sci Total Environ* 391:1-12.
- Mougin C (2002).** Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soil. *Poly Aro Comp* 22:1011-1043.
- Mougin C, Kollmann A, Jolival C (2002).** Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnol Lett* 24:139-142.

Mougin C, Jolival C, Briozzo P, Madzak C (2003). Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environ Chem Lett* 1:145-148.

Munoz C, Guillen F, Martinez AT, Martinez MJ (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr Microbiol* 34:1-5.

N

Nannipieri P, Asher J, Ceccherini L, Landi L, Pietramellara G, Renella G (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 54:655-670.

Nannipieri P, Falchini L, Landi L, Pietramellara G (2000). Management of soil microflora. In: Balazas E, Galante E, Lynch JM, Schepers JP, Toutant JP, Werner D, Werry PA (Eds). *Biological Resource Management Connecting Science and Policy*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 237-255.

Nannipieri P, Kandeler E, Ruggiero P (2002). Enzyme activities and microbiological processes in soil. In: Burns RG, Dick RP (Eds). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 1-34.

Necochea R, Valderrama B, Diaz-Sandoval S, Folch-Mallol JL, Vazquet-Duhalt R, Iturriaga G (2005). Phylogenetic and biochemical characterization of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiol Lett* 244:235-241.

Nelson NJ (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153:375-380.

Nziguheba G, Smolders E (2008). Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Sci Total Environ* 390:53-57.

O

Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 72:3448-3457.

Olander LP, Vitousek PM (2000). Regulation of soil phosphatase and chitinase activities by N and P availability. *Biogeochemistry* 49:175-190.

Orth AB, Denny M, Tien M (1991). Overproduction of lignin-degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 5: 2591-2596.

P

- Parat C, Chaussod R, Lévêque J, Dousset S, Andreux F (2002).** The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. *Europ J Soil Sci* 53:663-670.
- Paszczyński A, Huynh VB, Crawford R (1986).** Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 244:750-765.
- Peciulyte (2001).** Effect of copper sulfate on the soil fungal community structure. *Ekologija* 1:31-35.
- Pierce FJ, Larson WE (1993).** Developing criteria to evaluate sustainable land management. In: Kimble JM (Ed.). Proceeding of the VIII international soil management workshop utilizations of soil survey information for sustainable land use. Sacramento, CA. pp.7-14.
- Plante AF (2007).** Soil biochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In: Paul EA (Ed.). Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (3rd ed). Elsevier inc., Oxford, UK. pp. 283-299.

Q

- Quiquampoix H, Servagent-Noinville S, Baron MH (2002).** Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity. In: Burns RG, Dick RP (Eds). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 285-305.

R

- Rama R, Sigoillot JC, Chaplain V, Asther M, Jolival C, Mougin C (2001).** Inoculation of filamentous fungi in manufactured gas plant site soils and PAH transformation. *Polyc Arom Comp* 18:397-414.
- Ramade F (2007).** Introduction à l'écotoxicologie - Fondements et applications, Editions TEC & DOC - Lariviosier, France. **a-** Définition de l'écotoxicologie, place parmi les sciences biologiques. pp. 1-11; **b-** Causes et importance de la pollution de l'écosphère. pp. 13-36 ; **c-** Perturbations des cycles biogéochimiques par les polluants : conséquences écologiques. pp. 288-349 ; **d-** Notions de toxique et implications écologiques. pp. 91-133 ; **e-** Effets des polluants sur les écosystèmes. pp. 228-283 ; **f-** Monitoring des polluants. pp. 411-479.

- Ranjard L, Lignier L, Chaussod R (2006).** Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Appl Environ Microbiol* 72:1684-1687.
- Ranjard L, Poly F, Nazaret S (2000).** Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment (a mini-review). *Res Microbiol* 151:167-177.
- Renella G, Ortigoza ALR, Landi L, Nannipieri P (2003).** Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED50). *Soil Biol Biochem* 35:1203-1210.
- Ritz K, Wheatley RE, Griffiths BS (1997).** Effects of animal manure application and 9crop plants upon size and activity of soil microbial biomass under organically grown spring barley. *Biol Fert Soils* 24:372-377.
- Robert M, Chenu C (1992).** Interactions between soil minerals and microorganisms. In: Stotzky G, Bollag JM (Eds). *Soil Biochemistry*, vol. 7. Marcel Dekker, NY, USA. pp.307-370.
- Rodriguez-Valera F (2004).** Mini-review: Environmental genomics, the big picture ? *FEMS Microbiol Lett* 231:153-158.
- Rubilar O, Feijo G, Diez C, Lu-Chan TA, Moreira MT, Lema JM (2007).** Biodegradation of pentachlorophenol in soil slurry cultures by *Bjerkanda adusta* and *Anthracyphyllum discolor*. *Ind Eng Chem Res* 46:6744-6751.

S

- Sato S, Liu F, Koc H, Tien M (2007).** Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates. *Microbiol* 153:3023-3033.
- Sauvé S, Hendershot W, Allen HE (2000).** Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environ Sci Technol* 34:1125-1131.
- Schaefer R (1963).** L'activité déshydrogénasique comme mesure de l'activité biologique globale des sols. *An Inst Pasteur* 105:326-331.
- Schulze WX, Gleixner G, Kaiser K, Guggenberger G, Mann M, Schulze ED (2005).** A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and soil particles. *Oecologia* 142:335-343.

- Seiboth B, Hartl L, Salovuori N, Lanthaler K, Robson GD, Vehmaanperä J, Penttilä ME, Kubicek CP (2005).** Role of the bga1-encoded extracellular β -galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *Appl Environ Microbiol* 71:851-857.
- Smith JL, Collins HP (2007).** Management of organisms and their processes in soils. In: Paul EA (Ed.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (3rd ed). Elsevier inc., Oxford, UK. pp. 283-299.
- Sposito G, Coves J (1991).** Soilchem: a computer program for the calculation of chemical speciation in soils. Riverside and Berkeley, University of California, USA.
- Stamatis A, Malandrinos G, Louloudi M, Hadjiliadis N (2007).** New perspectives on thiamine catalysis: from enzymic to biomimetic catalysis. *Bioinorg Chem Appl* ID:23286.
- Sun SJ, Xu J, Dai SG, Han X (2006).** Influences of copper speciation on toxicity to microorganismes in soils. *Biomed Environ Sci* 19:409-413.
- Svenson A (1986).** Effects of copper, zinc, and cadmium ions on the production of phosphate from phytic acid in spruce forest soils. *Plant Soil* 94:227-234.

T

- Tabatabaï MA, Bremmer JM (1969).** Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1:301-307.
- Tabatabaï MA, Bremmer JM (1970).** Arylsulfatase activities in soils. *Soil Sci Soc Am Proc* 34:225-229.
- Tabatabaï MA, Dick WA (2002).** Enzymes in soil: Research and Developments in measuring activities. In: Burns RG, Dick RP (Eds). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 567-595.
- Taiwo LB, Oso BA (1997).** The influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P release under laboratory conditions. *Agri Ecosyst Environ* 65:59-68.
- Taylor JP, Wilson B, Mills MS, Burns RG (2002).** Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol Biochem* 34:387-401.
- Thorn RG, Lynch MDJ (2007).** Fungi and eukaryotic algae. In: Paul EA (Ed.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (3rd ed). Elsevier inc., Oxford, UK. pp. 145-158.

- Tien M, Kirk TK (1984).** Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2280-2284.
- Topp E, Monteiro SR, Beck A, Coelho BB, Boxall ABA, Duenk PW et al. (2008).** Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. *Sci Total Environ* 396:52-59.
- Trevors JT (1984).** Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O₂ concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. *Plant Soil* 77:285-293.
- Truhaut R (1977).** Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotox Environ Saf* 1:4-14.
- Tuomela M, Steffen KT, Kerko E, Hartikainen H, Holfrichter M, Hatakka A (2005).** Influence of Pb contamination in boreal forest soil on the growth and ligninolytic activity of litter-decomposing fungi. *FEMS Microb Ecol* 53:179-186.
- Tyler G (1981).** Heavy metals in soil biology and biochemistry. In: Paul EA, Ladd JN (Eds). *Soil Biochemistry*, vol.5. Marcel Dekker, NY, USA. pp. 371-414.

V

- Uhnakova B, Petrickova A, Biedermann D, Homolka L, Vejvoda V, Bednar P, Papouskova B, Sulc M, Martinkova L (2009).** Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*. *Chemosphere* in press, doi:10.1016.

V

- Van Beelen P, Doelman P (1997).** Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34:455-499.
- Van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM (2008).** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11:296-310.
- Van Elsas JD, Duarte JF, Keijzer-Wolters A, Smit E (2000).** Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Meth* 43:133-151.

- Van Gestel CAM (2008).** Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soil. *Sci Total Environ* 406:385-395.
- Van Gestel CAM, van Brummelen TC (1996).** Incorporation of biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5:217-225.
- Verdin A, Sahraoui ALH, Durand R (2004).** Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Internat Biodeter Biodegr* 53:65-70.
- Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y (2000).** Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycol Res* 104:1027-1032.
- Vig K, Megharaj M, Sethunathan N, Naidu R (2003).** Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv Environ Res* 8:121-135.
- Vigneault B, Campbell PG (2005).** Uptake of cadmium by freshwater green algae: effects of pH and aquatic humic substances. *J Phycol* 41:55-61.
- Violle C, Navas ML, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, Garnier E (2007).** Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116:882-892.
- Voroney RP (2007).** The soil habitat. In: Paul EA (Ed.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (3rd ed.), Elsevier inc., Oxford, UK. pp. 25-49.
- Vulkan R, Zhao FJ, Barbosa-Jefferson V, Preston S, Paton GI, Tipping E, McGrath SP (2000).** Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environ Sci Technol* 34:5115-5121.

W

- Wang^a YP, Shi JY, Wang H, Lin Q, Chen XC, Chen YX (2007).** The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotox Environ Saf* 67:75-81.
- Wang^b YP, Shi JY, Lin Q, Chen XC, Chen, YX (2007).** Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient. *J Environ Sci* 19:848-853.
- Webster R, Oliver MA (2001).** Geostatistics for environmental scientists. In: Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK. pp. 271.
- Winding A, Hund-Rinke K, Rutgers M (2005).** The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotox Environ Saf* 62:230-248.

- Wolfenden BS, Willson RL (1982).** Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one electron transfer reactions. *J Chem Soc Perkin Trans II*:805-812.
- Wu J, Joergenson RG, Pommerening B, Chaussod R, Brookes PC (1990).** Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction - An automated procedure. *Soil Biol Biochem* 22:1167-1169.
- Wu T, Chellemi DO, Graham JH, Rooskopf EN (2008).** Assessment of fungal communities in soil and tomato roots subjected to diverse land and crop management systems. *Soil Biol Biochem* 40:1967-1970.

X

- Xie W, Zhou J, Wang H, Chen X, Lu Z, Yu J, Chen X (2009).** Short-term effects of copper, cadmium and cypermethrin on dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soils after long-term mineral or organic fertilization. *Agric Ecosyst Environ* 129:450-456.
- Xu J, Wu L, Chen W, Chang AC (2008).** Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chroma A*:189-195.

Y

- Yano A, Kikuchi S, Nakagawa Y, Sakamoto Y, Sato T (2009).** Secretory expression of the non-secretory-type *Lentinula edodes* laccase by *Aspergillus oryzae*. *Microbiol Res* 164:642-649.
- Yoshitake A, Katayama Y, Nakamura M, Iimura Y, Kawai S, Morohoshi N (1993).** N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *J Gen Microbiol* 139:179-185.

Z

- Zheljazzkov VD, Craker LE, Xing B, Nielsen NE, Wilcox A (2008).** Aromatic plant on metal contaminated soils. *Sci Total Environ* 395:51-62.
- Zhou J, Thompson DK (2002).** Challenges in applying the microarrays to environmental studies. *Curr Opin Biotechnol* 13:204-207.

Zinger L, Gury J, Alibeu J, Rioux D, Gielly L, Sage L, Pompanon F, Geremia RA (2008). CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. *J Microbiol Meth* 72:42-53.

ANNEXES

Participations à des programmes scientifiques :

- « Bioindicateurs de la qualité des sols »

soutenu par l'ADEME, 2005-2008

- « Approche biogéochimique de l'exposition des champignons du sol aux micropolluants métalliques »

soutenu par le département Environnement et Agronomie de l'INRA, 2006-2008

Articles :

- **Un premier pas vers la compréhension des données biologiques**

Laval K, Mougin C, Akpa M, Barray S, Dur JC, Gangneux C, [Lebrun JD](#), Legras M, Lepelletier P, Plassart P, Taibi S, Trinsoutrot-Gattin I

Accepté : Etude et Gestion des Sols, 16:67-79 (2009).

- **Insights into the development of fungal biomarkers for metal ecotoxicity assessment: case of *Trametes versicolor* exposed to copper**

[Lebrun JD](#), Trinsoutrot-Gattin I, Laval K, Mougin C

Accepté : Environmental Toxicology and Chemistry, online.

- **Copper impact on soil enzymatic activities is lower than their natural spatiotemporal variability at the plot scale**

[Lebrun JD](#), Trinsoutrot-Gattin I, Vincelas-Akpa M, Bailleul C, Brault A, Mougin C, Laval K

Soumis : Applied Soil Ecology.

- **Secretion profiles of fungi as affected by metals: a study of extracellular enzymatic system in *Trametes versicolor***

[Lebrun JD](#), Demont-Caulet N, Cheviron N, Laval K, Trinsoutrot-Gattin I, Mougin C

Soumis : Applied Microbiology and Biotechnology.

- **Fungal oxidases as exposure biomarkers to metals: influence of metal speciation on functional responses in *Trametes versicolor***

[Lebrun JD](#), Lamy I, Mougin C

Soumis : Biometals.

- **Functional diversity in soil fungi: extracellular profiles as tools for metal ecotoxicity assessment**

[Lebrun JD](#), Demont-Caulet N, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K, Mougin C

En preparation : Applied and Environmental Microbiology.

Communications orales :

- **Biodiversité fonctionnelle : indicateur de l'état de santé des sols ?**

Lebrun JD, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K, Mougin C

1^{ère} journée du GRR de Haute-Normandie: Végétal, Agronomie et Transformation des Agroressources, Rouen (France), Nov. 2009

- **Induction d'exoenzymes fongiques : biomarqueurs d'exposition aux métaux ?**

Lebrun JD, Lamy I, Mougin C

3^{ème} séminaire d'écotoxicologie de l'INRA, Dinard (France), Sept. 2006

Communications affichées :

- **Study of extracellular functional system in soil fungi: enzymes as exposure biomarkers to metals**

Lebrun JD, Demont-Caulet N, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K, Mougin C

ISTA14, Metz (France), Sept. 2009

- **Influence of metal speciation on the sensitivity of functional and morphological responses to Cu and Zn in *Trametes versicolor* (prix du meilleur poster)**

Lebrun JD, Kollmann A, Wolff N, Lamy I, Mougin C

ISMOM 5, Pucon (Chili), Nov. 2008

- **Structural and functional traits of the basidiomycete *Trametes versicolor* are biomarkers for the assessment of soil ecotoxicity?**

Kollmann A, Lebrun JD, Wolff N, Cheviron N, Jolival C, Trinsoutrot-Gattin I, Mougin C

SETAC, Varsovie (Pologne), Mai 2008

- **The response of extracellular enzymes to copper depends on the development phase in the fungus *Trametes versicolor***

Lebrun JD, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K, Mougin C

EMEC8, Inverness (Ecosse), Déc. 2007

- **Exocellular oxidases can be sensitive biomarkers of fungal exposure to metals**

Lebrun JD, Wolff N, Lamy I, Mougin C

EMEC8, Inverness (Ecosse), Déc. 2007

