

Comment doser plusieurs activités enzymatiques sur un même type d'ectomycorhizes avec un minimum de matériel prélevé ?

Jean-Louis Churin ¹

Résumé : Afin de mesurer efficacement la capacité des mycorhizes à mobiliser les éléments du sol au bénéfice des arbres, nous avons développé une micro-technique à haut débit qui permet de mesurer les activités de huit enzymes différentes secrétées par les mêmes ectomycorhizes avec seulement sept échantillons d'un même type. Ainsi d'une part nous comparons les profils d'activités enzymatiques de différents types d'ectomycorhizes dans un même peuplement, et d'autre part nous apprécions les variations de ces activités dues aux interventions sylvicoles : chaulage, fertilisation, éclaircies...

Mots clés : Ectomycorhize, fluorimétrie, colorimétrie, fluorochrome, tubes PCR, activités enzymatiques.

Introduction

Les racines fines des arbres des forêts tempérées sont associées avec des champignons formant des organes symbiotiques mixtes appelés ectomycorhizes (ECM). Les champignons ectomycorhiziens jouent un rôle crucial dans la survie et le développement des arbres. Ils sont capables de mobiliser et de prélever les nutriments à partir de la litière par sécrétion d'un grand nombre d'enzymes.

La plupart de nos connaissances sur la diversité fonctionnelle des ECM résultent des expérimentations sur les jeunes semis cultivés en conditions contrôlées en laboratoire. Ces conditions sont très différentes de celles qui prévalent sur les arbres adultes en sols forestiers.

Afin de décrire la diversité fonctionnelle des ECM *in situ* pour comprendre le rôle joué par les partenaires fongiques parmi les communautés ectomycorhiziennes des écosystèmes forestiers, nous mesurons différentes activités contribuant à la nutrition de l'arbre.

Nous avons d'abord utilisé une méthode de micro-radiorespirométrie (Jany *et al.* 2003) qui demandait un investissement important en temps du fait de l'impossibilité de traiter plusieurs types de mycorhizes simultanément. Nous traitons seulement vingt quatre échantillons à la semaine. Puis nous avons utilisé un système mesurant le potentiel d'activité enzymatique des phosphatases et des déshydrogénases à l'aide de microplaques (Buée *et al.* 2004). Plus récemment nous avons développé, en collaboration avec un laboratoire de Munich dans ces mêmes conditions de microplaques, des méthodes de colorimétrie et de fluorimétrie pour la détection simultanée de plusieurs activités enzymatiques sur un même type de mycorhize (Pritsch *et al.* 2004 et Courty *et al.* 2005). Nous avons ainsi abouti à une méthode à haut débit avec 50 types de mycorhizes traités par jour et huit activités enzymatiques. Nous décrivons ici cette méthode.

¹INRA-Univ.Nancy 1- UMR Interactions Arbres/Microorganismes - 54280 Champenoux

☎ 03 83 39 40 82 churin@nancy.inra.fr

1. Principe de la méthode

Les huit enzymes étudiées contribuent à la dégradation de la paroi des végétaux morts : dégradation cellulolytique (cellobiohydrolase et glucosidase), hémicellulolytique (glucuronidase et xylosidase) et dégradation de la lignine et des composés phénoliques (laccase). Elles contribuent également à la dégradation de la chitine qui provient des parois des cellules fongiques et des insectes (chitinase), des phosphates organiques (phosphatase acide) et des protéines (leucine amino peptidase).

Selon les enzymes, deux méthodes sont employées : la fluorimétrie ou la colorimétrie.

Dans le cas des mesures par fluorescence, les substrats des enzymes étudiées sont couplés avec des fluorochromes : MU (MéthylUmbelliférone) ou AMC (AminoMéthylCoumarine). En solution, par exposition à une longueur d'onde précise, ces fluorochromes ont la propriété de réémettre à une autre longueur d'onde. C'est la mesure de la quantité de photons réémise qui indique la quantité de fluorochrome libre dans le milieu et ainsi de connaître la quantité de substrat hydrolysé par les enzymes. En effet, lorsque la liaison entre le fluorochrome et le substrat reste intacte, on ne mesure que l'autofluorescence naturelle du couple substrat-fluorochrome ; mais, si la liaison entre le substrat et le fluorochrome est rompue, on mesure la quantité de fluorochrome en solution, qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme secrétée. En colorimétrie (détermination de l'activité laccase), l'ABTS (diammonium 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate), un substrat synthétique de l'enzyme étudiée, change de couleur lorsqu'il est oxydé ; on mesure l'intensité de la couleur verte proportionnelle à la quantité d'enzyme secrétée dans le milieu.

On souhaite mesurer les différentes activités enzymatiques secrétées sur les mêmes apex ectomycorhiziens. Il faut donc pouvoir transférer ces apex d'un réactif à un autre. Pour cela on utilise des barrettes de tubes PCR modifiées. Ces barrettes sont utilisées dans les laboratoires de biologie moléculaire et entrent parfaitement dans une rangée de 8 puits des microplaques à 96 puits utilisées ici pour l'incubation et le rinçage. La modification de ces barrettes de tubes PCR² s'effectue ainsi : on coupe la base conique des 8 tubes d'une barrette, on coupe également le dôme de chacun des bouchons pour garder sur l'anneau résiduel le début de la courbure (**figure 1**). Des rondelles de 5 mm de diamètre sont alors découpées à l'emporte-pièce dans de la toile nylon³ de maillage 250 µm et déposées à la pince au fond des bouchons préparés. Il ne reste plus qu'à insérer les tubes dans les bouchons et à élaguer au scalpel les liants plastiques restant autour des capuchons (**figure 1 et photo 1**). Avec les barrettes ainsi transformées, nous transférons ces apex d'un substrat à un autre sans avoir à les reprendre avec des pinces et risquer ainsi de les détériorer.

1.1 Mode opératoire

1.1.a Échantillonnage

Les échantillons de sol contenant les racines sont collectés dans des boîtes isothermes puis conservés avant traitement à 4 C°. Les racines sont traitées dans les quatre jours suivants. Elles sont lavées précautionneusement pour ne pas détériorer les mycorhizes. Les morphotypes d'ECM (types morphologiques communs) sont décrits à la loupe binoculaire selon Agerer (1987-98). Sept apex ectomycorhiziens de chaque morphotype étudié, sensiblement de même taille, sont prélevés et déposés individuellement dans chacun des tubes des barrettes PCR modifiées (**photos 1 et 2**) installées dans la plaque de rinçage (**photo 3**).

² Astucieux bricolage imaginé par un technicien du laboratoire de Munich avec lequel nous collaborons.

³ Sté Busine - 60600 Clermont de l'Oise

Le huitième puits ne contient pas de mycorhize (témoin négatif). Un échantillon de chaque morphotype est congelé (-80°C) pour de futures identifications moléculaires.

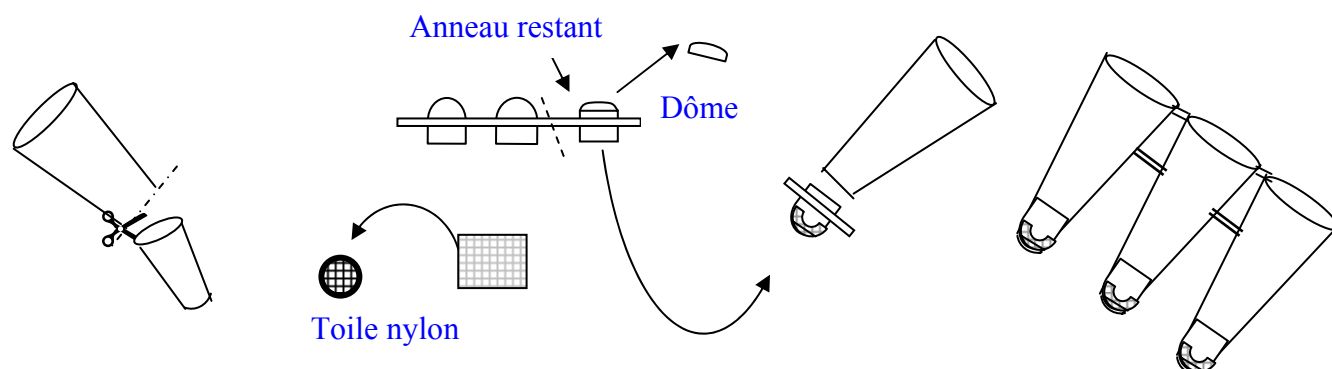


Figure 1 : schéma représentant les étapes de transformations des barrettes PCR



Photo 1 : Barrettes et capuchons tronqués

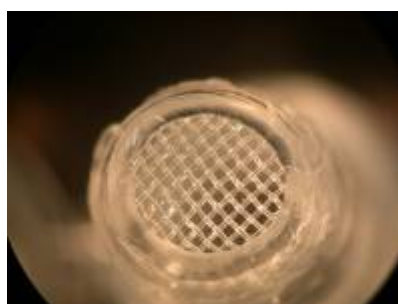


Photo 2 : Tamis en place



Photo 3 : Barrette dans une microplaque

Ordre des tests	Substrats	Concentration de la solution de travail (μM)	pH	Temps d'incubation (min)
Glucuronidase	MU- β -D-glucuronide hydrate	500	4,5	60
Xylosidase	MU- β -D-xylopyranoside	500	4,5	60
Cellobiohydrolase	MU- β -D-cellobioside	400	4,5	40
β -Glucosidase	MU- β -D-glucopyranoside	500	4,5	60
Chitinase	MU-N-acetyl- β -D-glucosaminide	500	4,5	20
Phosphatase acide	MU-phosphate	800	4,5	10
Leucine aminopeptidase	L-leucine-AMC	400	6,5	60
laccase	ABTS	2000	4,5	60

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques de chaque test enzymatique

1.1.b Préparation des solutions

Le **tableau 1** donne les substrats et les paramètres expérimentaux pour chacune des huit activités enzymatiques mesurées. Tous les produits sont référencés chez Sigma Aldrich. Les solutions mères de chaque substrat (5 mM) et les solutions de calibration d'AMC et MU (25 mM) sont préparées dans du méthoxyéthanol. Les substrats sont dilués avec de l'eau ultra pure stérile pour atteindre les concentrations désirées (**tableau 1**). Les solutions mères, les substrats dilués et les solutions de travail doivent être stockés à -20 °C à l'abri de la lumière.

Le tampon d'incubation est préparé à une concentration de 150 mM et stérilisé. C'est un mélange d'acide maléique et de Tris (pH 2-7). Le tampon stop utilisé pour alcaliniser la solution et arrêter les réactions est le Tris 1 M à pH 10 – 11.

1.1.c Incubation et mesure (figure 2)

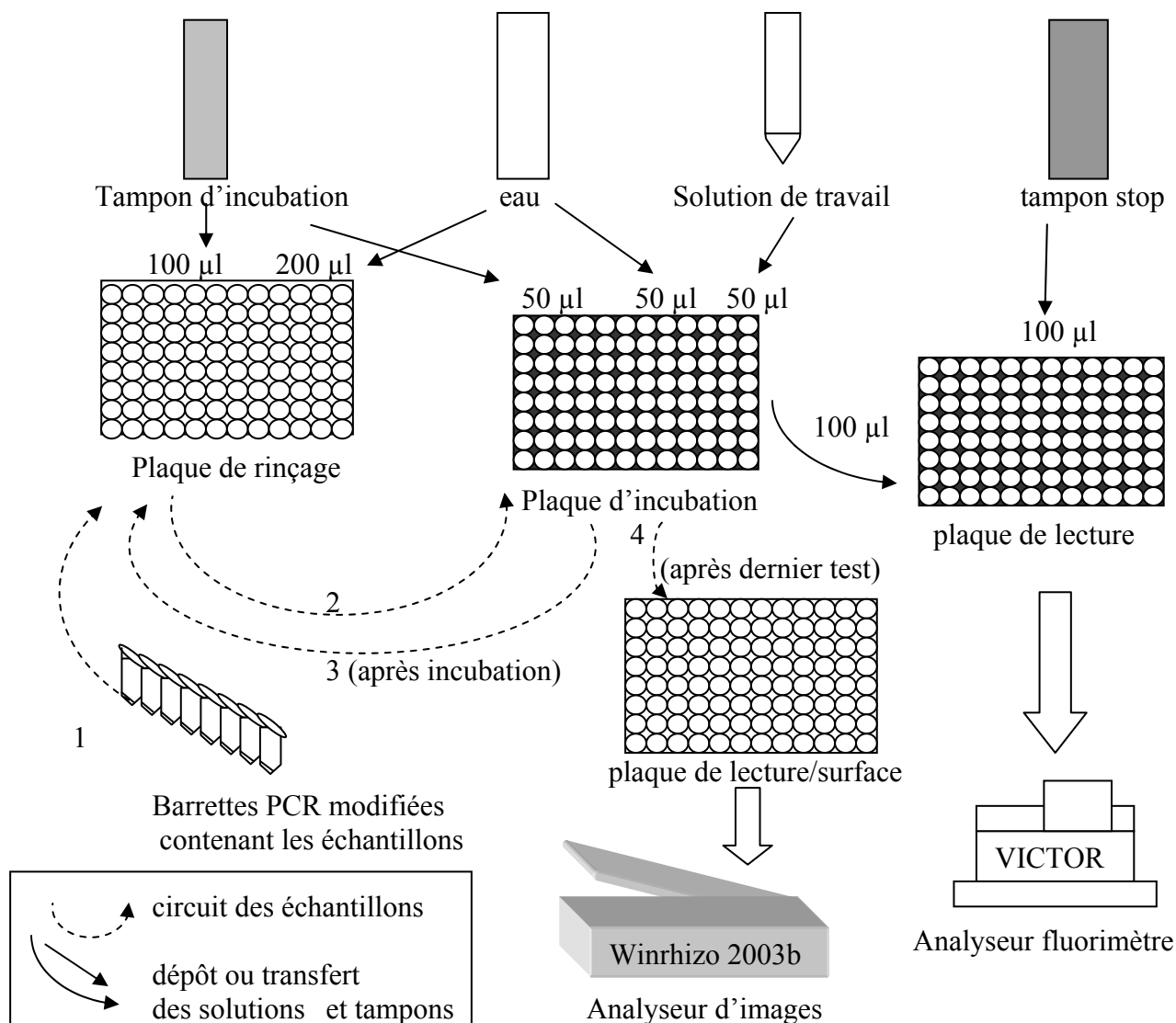


Figure 2 : schéma des manipulations en fluorimétrie.
Ce cycle est répété autant de fois qu'il y a d'activités à mesurer

En fonction du substrat, le temps d'incubation dans les plaques de titration noires à 96 puits est variable Il a été choisi pour mesurer l'activité enzymatique la plus élevée. Chaque puits contient 50µl de tampon d'incubation, 50µl d'eau ultra pure et 50µl de solution de travail. Les mesures sont obtenues avec le lecteur de microplaques Victor (Wallac Perkin-Elmer Life Sciences) à une longueur d'onde d'excitation de 355 nm et de 460 nm en émission. Pour les laccases, l'intensité de la couleur verte est dosée à 415-425 nm avec le lecteur de plaques Hercules 550 (Biorad, Hercules, CA, USA)

Dès que les analyses fluorimétriques et colorimétriques sont terminées, les apex sont transférées à la pince directement des barrettes au fond des puits d'une microplaque transparente afin d'être passés à l'analyseur d'images Winrhizo 2003b (Regent Instrument, Inc., Québec, Canada) qui détermine la surface projetée de chaque échantillon. Les résultats de ces analyses sont exprimés par unité de temps et par unité de surface projetée de chaque type d'ectomycorhize (pmol/mm²/min). Les surfaces projetées présentent une corrélation linéaire avec les surfaces développées des ectomycorhizes supposées cylindriques.

2. Résultats et exemple d'application

La **figure 3**, tirée du travail de Courty *et al* (2005) montre qu'un même type d'ectomycorhize (formée par le champignon *Lactarius quietus*) présente des profils d'activité différents selon la saison. En été, les activités dominantes sont : glucosidase, chitinase et cellobiase, alors qu'en hiver, après la chute des feuilles, l'activité xylosidase domine.

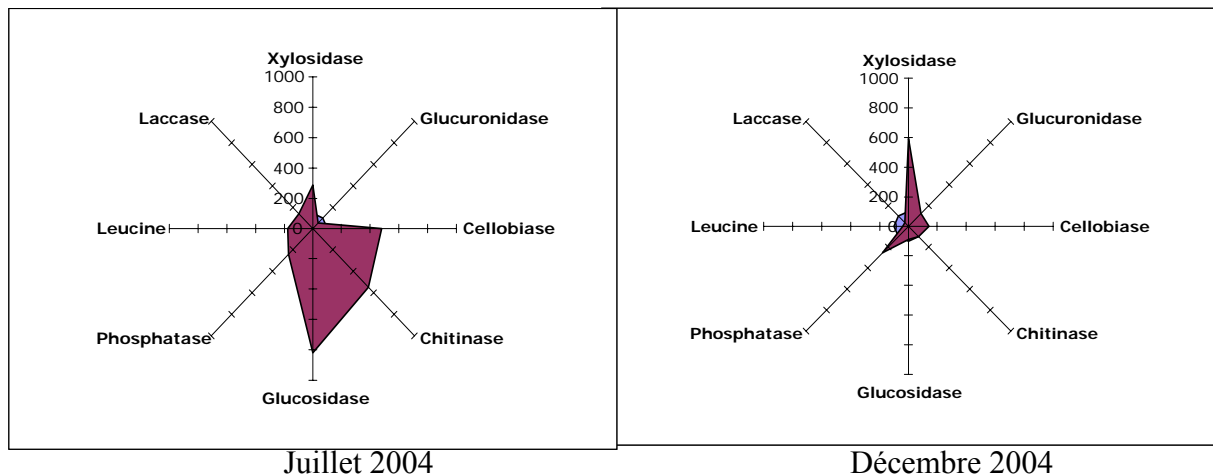


Figure 3 : Exemple de profils d'activités d'ectomycorhize de *Lactarius quietus* selon la saison

Conclusion

Un grand progrès vient d'être réalisé, nous faisant passer de 24 échantillons et une seule activité par semaine à une cadence possible de 50 échantillons et 8 activités par jour. Ce progrès a été obtenu en combinant trois techniques :

- méthode d'analyse en colorimétrie et fluorimétrie utilisant les substrats fluorescents,
- analyse d'image évitant les pesées fastidieuses pour la calibration des mesures,
- adoption d'un bricolage gardant intacts les échantillons tout au long du processus.

Cela nous permet d'une part de comparer les profils d'activités enzymatiques de différents types d'ectomycorhizes dans un même peuplement, et d'autre part d'apprécier les variations de ces activités dues aux interventions sylvicoles (chaulage, fertilisation, éclaircies...).

Cette méthode pourra être utilisée pour de nouveaux tests concernant non seulement les activités enzymatiques extracellulaires mais aussi d'autres mécanismes relatifs à la mobilisation des nutriments, comme la chélation du fer ou l'altération des minéraux.

Bibliographie

- Agerer R (1987-1998) Colour atlas of ectomycorrhizea. Munich, Germany: Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger
- Buée M, Vairelles D, Garbaye J (2004) Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15, 235-245
- Courty PE, Pritsch K, Schloter M, Hartmann A, Garbaye J (2005) Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests, *New phytologist*, 167, 309-319.
- Jany JL, Martin F, Garbaye J (2003) Respiration activity of ectomyccorhizeas from *Cenococcum geophilum* and *Lactarius sp.* In relation to water potential in five beech forest. *Plant Soil* 255 : 487-494.
- Pritsch K, Raidl S, Marksteiner E, Blaschke H, Agerer R, Schloter M, Hartmann A (2004) A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 233-241.