

PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE INTRACELLULAIRE ET DÉGRADATION DES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES PAR UN CHAMPIGNON TELLURIQUE : FUSARIUM SOLANI

Anthony Verdin*, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui*, Ray Newsam**, Gary Robinson** et Roger Durand*.

* Laboratoire de Mycologie/Phytopathologie/Environnement - Université du Littoral-Côte d'Opale, Calais

** Department of Biosciences - University of Kent, Canterbury

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA), composés extrêmement nocifs pour l'homme et son environnement en raison des pouvoirs toxiques, mutagènes et cancérigènes reconnus pour plusieurs d'entre eux, constituent une classe de polluants particulièrement répandus dans le sol.

Parmi les méthodes de réhabilitation des sols contaminés par les HPA, la bioremédiation se révèle être une des techniques les plus économiques et les plus écologiques.

Isolé au laboratoire de Mycologie/Phytopathologie/Environnement de l'Université du Littoral-Côte d'Opale, à partir d'un sol artificiellement contaminé, *Fusarium solani*, un champignon imparfait ou Deutéromycète, est capable de dégrader efficacement une large gamme d'HPA de 2 à 7 cycles. Les taux de dégradation sont respectivement de 84, 70, 58, 34 et 40 % pour l'anthracène, le pyrène, le benzo[a]pyrène, le benzo[ghi]pérylène et le coronène. Quand *Fusarium solani* est cultivé sur un milieu synthétique contenant un des HPA comme substrat, des vésicules fluorescentes sont observées à l'intérieur des hyphes indiquant le prélèvement et le stockage des HPA (ou l'un de leurs métabolites) par ce champignon. Dans cette étude, nous avons démontré que ce phénomène de prélèvement et d'accumulation est passif. En effet, aucune modification n'est décelée lorsque *Fusarium solani* est cultivé à 4°C ou en présence d'un inhibiteur de la cytochrome oxidase (l'azide de sodium). L'emploi d'inhibiteurs du cytosquelette (colchicine et cytochalasine) suggèrent la non implication des filaments d'actine et des microtubules dans ce transport. Des observations au microscope électronique ne montrent aucune structure intervenant spécifiquement dans l'accumulation des HPA chez *Fusarium solani*. En effet, grâce à l'utilisation de deux colorants : le Soudan III et la rhodamine B, nous avons démontré que les HPA s'accumulent dans des vésicules lipidiques préexistantes. D'autre part, nous avons montré que ce phénomène de prélèvement et de stockage des HPA dans les vésicules lipidiques est commun à l'ensemble des souches fongiques quelle que soit leur position taxonomique et indépendamment des taux de dégradation qu'elles présentent.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are of great environmental concern due to their mutagenic and carcinogenic properties. Their persistence in ecosystems is due to their low water solubility which results in their binding to particulates in soils, sediments and atmosphere. Bioremediation represents the major route for the ecological recovery of PAHs contaminated sites.

The aim of this work was to investigate the uptake and storage of benzo[a]pyrene by a non white-rot fungus, *Fusarium solani*, and to characterize, by cytological methods, the intracellular fluorescent vesicles observed when growing the fungus on synthetic medium in presence of benzo[a]pyrene.

We have demonstrated that PAHs uptake into fungal hyphae was a passive phenomenon. Indeed, benzo[a]pyrene uptake and storage in *Fusarium solani* was not prevented at 4°C or in the presence of cytochrome oxidase inhibitor (sodium azide). The use of two cytoskeleton modulating drugs (colchicin or cytochalasin) suggested that microtubules and actin filaments were not involved in PAHs transport. Ultrastructural study showed that PAHs incorporation was not associated with specific structures. The use of Sudan III and Rhodamine B stainings showed that PAHs were accumulated in pre-existing structures corresponding to lipid vesicles.

We found that *Fusarium solani*, was able to store into lipid vesicles and degrade efficiently a large scale of PAHs. The degradation rates were about 84, 70, 58, 34 and 40% for anthracene, pyrene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]perylene and coronene respectively.

We also showed that the PAHs intracellular storage was not restricted to the Deuteromycotina fungus *Fusarium solani*, but could be generalized to numerous other fungi, even poor degraders, belonging to different genera.

INTRODUCTION

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA) occupent au sein des préoccupations environnementales

une place particulière. Cet intérêt est dû à leur ubiquité, à leur rémanence dans l'environnement et à leurs toxicités (mutagenèse et cancérogenèse)^[1]. Ces composés, constitués de cycles aromatiques condensés, sont produits en quantité importante par l'activité humaine, et notamment dans les processus de pyrolyse et de combustion^[2]. Leur élimination des différents écosystèmes (sol, eau, air) constitue une priorité. La bioremédiation représente l'une des voies de dépollution les plus économiques et les plus écologiques^[3]. Parmi les microorganismes capables de dégrader les HPA (bactéries, algues et champignons), les champignons ont la double particularité de posséder une grande capacité à se propager et des équipements enzymatiques capables de dégrader un large spectre de molécules polluantes^[4]. Les études réalisées jusqu'alors sur la biodégradation des HPA ont majoritairement porté sur la biodégradation des HPA de faible poids moléculaire par les bactéries et les champignons du sol, comme les champignons de la pourriture blanche^[5].

Des études précédentes^[6], réalisées au laboratoire de mycologie / phytopathologie / environnement de l'Université du Littoral-Côte d'Opale, ont mis en évidence l'aptitude d'une souche de *Fusarium* (*Fusarium solani*), champignon n'appartenant pas aux champignons de la pourriture blanche, à dégrader efficacement le benzo[a]pyrène (HPA de haut poids moléculaire). Cette souche présente par ailleurs, quand elle est cultivée en présence de benzo[a]pyrène, un phénomène d'incorporation (capacité de prélèvement et de stockage des HPA) qui se manifeste par l'observation de vésicules intracellulaires fluorescentes.

Le but du présent travail est d'étudier ce phénomène de prélèvement et d'accumulation des HPA par les champignons grâce à des méthodes biochimiques et cytologiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souches utilisées

Lors de nos expériences plusieurs souches de champignons qui diffèrent par leur position systématique ont été utilisées (tableau 1).

Préparation de l'inoculum

Après une quinzaine de jours, les souches repiquées sur

milieu malt en boîtes de Pétri ont sporulé. Une suspension de spores est préparée dans de l'eau distillée et un comptage grâce à la cellule de Malassez permet de déterminer la densité de l'inoculum

Conditions de culture

Les études sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu liquide synthétique de Oudot^[7]. La nature hydrophobe des différents HPA nécessite de les dissoudre préalablement dans l'acétone (2 mL) avant de les ajouter aux traitements concernés (0,02 mole/L). Les milieux sont ensuite placés à l'étuve (70°C) pendant 1 heure afin d'éliminer l'acétone, puis autoclavés (20 min à 120°C). Après autoclavage, une solution stérile de glucose (10 g/L de milieu) est ajoutée au milieu de culture. Les milieux sont alors inoculés (10⁴ spores par mL de milieu) puis sont placés sur un agitateur (120 rpm) et incubés dans une étuve thermostatée à 22°C et éclairée (lumière blanche, photopériode 12h/12h). Parallèlement aux différentes cultures, trois réplicats de milieu de culture, contenant l'HPA, et non inoculés sont réalisés. Ces réplicats nous serviront de témoins abiotiques pour le calcul des taux de dégradation.

Microscopie à fluorescence

Les HPA et/ou certains de leurs métabolites, de part leur structure aromatique et leur résonance (présence de plusieurs doubles liaisons dans la molécule), présentent un phénomène de fluorescence qui va nous permettre de suivre leur incorporation par le champignon en microscopie à fluorescence (microscope Nikon, excitation 450-490 nm, miroir dichroïque 505 nm, filtres barrières DAPI = 485 nm et FITC = 520 nm).

Microscopie électronique

Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante. Les échantillons sont d'abord fixés au glutaraldehyde (2,5 %, vol/vol), rincés avec du tampon PBS pendant 15 min puis fixés au tétraxide d'osmium (1 %, poids/vol), et rincés une seconde fois au tampon PBS pendant 15 min. Les échantillons sont ensuite deshydratés dans un gradient d'éthanol avant d'être inclus dans une résine. Des coupes de 60 nm d'épaisseur sont réalisées et observées au microscope électronique (Philips 410) et des photos sont prises avec un film Agfa EM.

Estimation de la masse sèche fongique

Après une période d'incubation de 30 jours, le mycélium est récupéré par filtration sur filtre de cellulose (porosité : 45µm) sur une fiole sous vide. L'erlenmeyer est rincé avec du dichlorométhane (DCM), le contenu de chaque rinçage étant versé sur le filtre afin de récupérer tout l'HPA dans la phase organique. Après 48 h de lyophilisation, la masse sèche fongique est déterminée par pesée des

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes souches fongiques utilisées.

Position systématique	Nature de la paroi	Espèces
Zygomycetes	Chitin-Chitosan	<i>Cunninghamella elegans</i>
Deuteromycetes	Chitin-Glucan	<i>Trichoderma viride</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i>
Basidiomycetes	Chitin-Glucan	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Hemiascomycetes	Mannan-Glucan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mastigomycetes	Cellulose-Glucan	<i>Pythium oligandrum</i>

filtres préalablement tarés.

Extraction des HPA

La phase organique est récupérée à partir du filtrat précédemment obtenu. Le DCM est ensuite évaporé sous vide à une température de 70°C. Le culot obtenu est stocké à 4°C et à l'abri de la lumière. Par ailleurs, une fois la détermination de la biomasse effectuée, les filtres sont alors digérés à la soude (5N) pendant 3 jours (dont une nuit à l'étuve à 60°C) à température ambiante afin d'extraire l'hydrocarbure intracellulaire, ce volume est rincé par 3*50 mL de DCM. Le DCM est ensuite évaporé et ce culot est additionné à celui récupéré dans le filtrat, le tout est ensuite remis en solution dans un volume déterminé de DCM pour le dosage en chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Dosage des HPA par HPLC

La consommation des HPA est déterminée par HPLC. L'équipement consiste en une pompe quaternaire (Waters 600E), un injecteur, une colonne en phase inverse (C18) (Waters symmetry 2,1*150) et un détecteur à barrettes de diode (Waters 996).

La phase mobile est constituée d'une solution A (eau ultrapure) et d'une solution B (méthanol). Après injection de 2 µl de l'échantillon, l'analyse en gradient se fait de la façon indiquée dans le tableau 2 ci-dessous, à 30°C, 1800 PSI, et avec un débit de 0,3 mL/min.

L'extraction et l'intégration des spectres s'effectue à 254 nm pour l'antracène, le pyrène et le benzo(a)pyrène, et à 300 nm pour le benzo(ghi)perylène et le coronène.

Taux de dégradation (%) = $\frac{[\text{HPA dans le témoin abiotique}] - [\text{HPA extrait de l'échantillon}]}{[\text{HPA dans le témoin abiotique}]}$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Effet de la température d'incubation, des différents inhibiteurs (azide de Na, colchicine, cytochalasine) sur le transport du benzo[a]pyrène chez *Fusarium solani*

Tableau 2 : Gradient d'élution des HPA

Temps (min)	% A	% B
0	20	80
10	0	100
40	0	100
50	20	80

Quand *Fusarium solani* est cultivé, en présence de benzo[a]pyrène, dans un milieu synthétique contenant du glucose et est :

- 1) soit supplémenté d'un inhibiteur de la cytochrome oxydase (l'azide de Na à 0,01 % (poids/vol)).
- 2) soit additionné d'un inhibiteur du cytosquelette (colchicine ou cytochalasine à 5 µM)
- 3) soit incubé à 4°C, le phénomène de prélèvement et

d'accumulation n'est pas affecté suggérant que l'incorporation du benzo[a]pyrène n'est pas ATP dépendante, ne se fait pas par endocytose, et que les microtubules et les filaments d'actine ne sont pas impliqués dans le transport du benzo[a]pyrène.

Ces résultats montrent que le transport du benzo[a]pyrène chez *Fusarium solani* est un phénomène passif.

Ultrastructure de *Fusarium solani* en présence et en absence de benzo[a]pyrène

Les études en microscopie électronique ne révèlent aucune différence de structure chez *Fusarium solani* cultivé en présence et en absence de benzo[a]pyrène (photo 1). Aucune structure spécifique ne semble produite en réponse au benzo[a]pyrène.

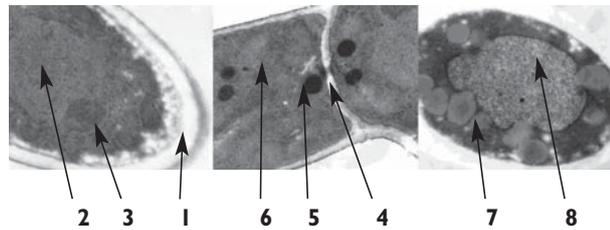


Photo 1 : Ultrastructure de *Fusarium solani* (Gx34 000)

1 : paroi, 2 : noyau, 3 : nucléole, 4 : pore septal, 5 : corps de Woronin, 6 : mitochondrie, 7 : gouttellettes lipidiques, 8 : vacuole

Très peu de travaux ont porté sur la cytologie des moisissures en présence et en absence d'hydrocarbure. L'induction de microbodies en réponse à une croissance sur hydrocarbures est largement discutée.

Coloration de *Fusarium solani* au Soudan III

En utilisant le Soudan III, les vésicules intracellulaires observées à l'intérieur des hyphes de *Fusarium solani* (photo 1a), cultivé sur milieu synthétique plus glucose en présence et en absence de benzo[a]pyrène se colorent en rose-rouge, indiquant que le contenu de ces vésicules est de nature lipidique (photo 2 b). Les vésicules fluorescentes observées en présence de benzo[a]pyrène se trouvent exactement au même endroit que les vésicules lipidiques mises en évidence par le Soudan III (photos 2c et 2d). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un autre colorant, la rhodamine.

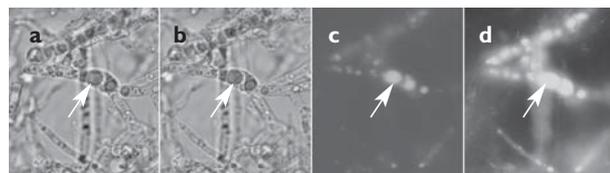


Photo 2 : Observation au microscope photonique des vésicules lipidiques chez *Fusarium solani* cultivé en présence de benzo[a]pyrène (Gx100)

a : en lumière blanche, b : en lumière blanche après coloration au Soudan III, c : fluorescence DAPI, d : fluorescence FITC.

Ces résultats indiquent que le benzo[a]pyrène ou l'un de ces métabolites s'accumulent dans des vésicules lipidiques préexistantes. Le rôle des vésicules lipidiques dans la dégradation des HPA reste inconnu. L'accumulation des HPA dans les lipides semble un phénomène commun à divers organismes (plantes, mollusques) en croissance sur un milieu contaminé. A notre connaissance, c'est la première fois que cela a été mis en évidence chez les moisissures.

Prélèvement, stockage et dégradation des différents HPA par *Fusarium solani*

Des taux de dégradation élevés ont été obtenus avec l'antracène, le pyrène, le benzo[a]pyrène, le benzo[g, h, i]pérylène et le coronène respectivement d'environ 84, 70, 58, 34 et 40 % quand *Fusarium solani* est cultivé sur milieu minimum plus glucose (fig. 1).

Quel que soit l'HPA utilisé, des vésicules intracellulaires fluorescentes ont été observées dans les hyphes de *F. solani* indiquant que le phénomène de prélèvement et d'accumulation n'est pas restreint au benzo[a]pyrène et semble indépendant des taux de dégradation des HPA.

Accumulation et dégradation du benzo[a]pyrène par différentes souches fongiques

Parmi les souches fongiques testées, deux groupes peuvent être distingués en fonction de leur aptitude à dégrader le benzo[a]pyrène (fig. 2):

- Les « bons dégradeurs » comprenant *Trichoderma viride*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium solani*. avec des rapports (taux de dégradation / poids sec) respectifs de 39, 21 et 17.

- Les « mauvais dégradeurs » comprenant *Fusarium oxysporum*, *Pythium oligandrum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Saccharomyces cerevisiae* avec des rapports (taux de dégradation/ poids sec) respectifs de 8, 6, 5 et 3.

Des vésicules fluorescentes intracellulaires sont observées dans toutes les souches testées quand elles sont cultivées en présence de benzo[a]pyrène quels que soient leur position systématique et leur taux de dégradation.

* **Anthony Verdin, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui, Roger Durand**

Laboratoire de Mycologie/Phytopathologie/Environnement, Université du Littoral-Côte d'Opale, 17, avenue Blériot, BP 699, 62228 Calais Cedex, France - Tél. : 03 21 96 48 07, fax : 03 21 34 71 13 - E-mail : lounes@univ-littoral.fr

** **Ray Newsam, Gary Robinson**

Department of Biosciences, University of Kent, Canterbury, CT2 7NJ, UK.

Remerciements

Ce travail a été financé par la Région Nord-Pas de Calais.

RÉFÉRENCES

[1] International Agency for Research on Cancer (1983) *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part I, Chemical, Environmental and Experimental Data*, Vol 32, IARC Press, Geneva: World Health Organization.

[2] Blumer, L., Hadar, Y. and Cerniglia, C.E. (1976) *Polycyclic aromatic compounds in nature*. *Sci. Am.* 234, 34-44.

[3] Lecomte, P. (1998) *Les sites pollués. Traitements des sols et des eaux souterraines*. 2^e édition. Lavoisier, TEC et DOC, Londres, Paris, New-York.

[4] Cerniglia, C.E. (1992) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Biodegradation* 3, 351-368.

[5] Field, J. A., de Jong, E., Feijoo Costa, G. and de Bont, J. A. (1992) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2219-2226.

[6] Rafin, C., Potin, O., Veignie, E., Lounes Hadj-Sahraoui, A. and Sancholle, M. (2000) *Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white-rot-fungus Fusarium solani*. *Polycyclic Aromatic Compounds* 21, 311-329.

[7] Oudot, J., Fusey, P., Abdelouahid, D.E., Halaoui, S., Roquebert, M.F. (1987) *Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel*. *Can. J. Microbiol.* 33, 232-243.

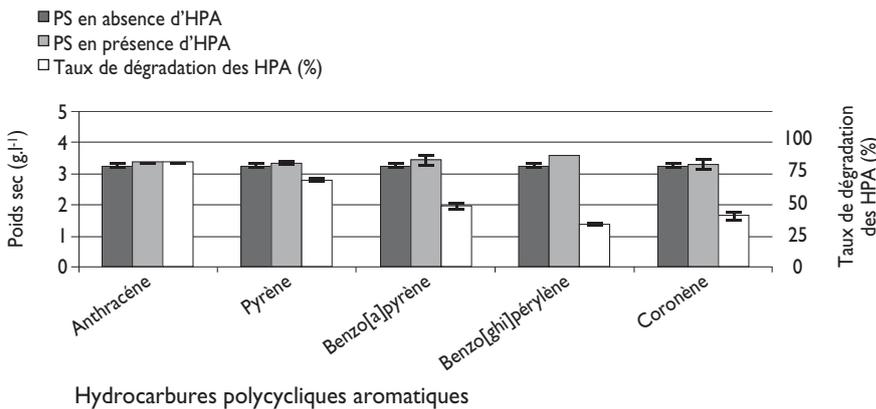


Figure 1 : Taux de dégradation des différents HPA et biomasses produites par *Fusarium solani* cultivé sur milieu minimum plus glucose.

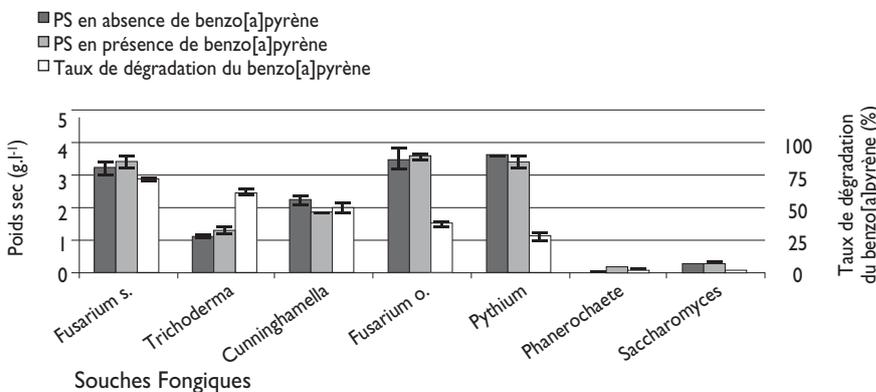


Figure 2 : Taux de dégradation du benzo[a]pyrène et biomasses produites par les différentes souches fongiques testées.