

CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES  
EN SCIENCES AGRONOMIQUES  
(Montpellier SupAgro)

ECOLE DOCTORALE  
Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences, Environnement  
(SIBAGHE)

En co-tutelle avec

UNIVERSITE DE COCODY- ABIDJAN  
UFR Sciences des Structures de la Matière et Technologie  
(SSMT)

DOCTORAT

Discipline : Ecosystèmes

Atolé Brice Bienvenu KEDI

**FONCTIONNEMENT DES PHOSPHATASES DANS LES SOLS TROPICAUX :  
INFLUENCE DE LA COMPOSITION ORGANO-MINERALE SUR  
L'EXPRESSION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE**

Thèse dirigée par Siobhán STAUNTON, Hervé QUIQUAMPOIX et Joseph SEI

Soutenue le 20 Décembre 2011

Membres du jury :

Maria RAO	Professeur, Université Napoli, Italie	Rapporteur
Christian MOUGIN	Directeur de Recherche, INRA	Rapporteur, Président du jury
Isabelle BERTRAND	Chargé de Recherche, INRA	Examineur
Roger FRUTOS	Directeur de Recherche, CIRAD	Examineur
Hervé QUIQUAMPOIX	Directeur de Recherche, INRA	Invité, co-directeur de thèse
Joseph SEI	Professeur, Université Cocody, Côte d'Ivoire	Co- directeur de thèse
Siobhán STAUNTON	Directeur de Recherche, INRA	Directrice de thèse

## REMERCIEMENTS

---

*Je veux commencer par remercier le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique de Côte d'Ivoire pour le financement de la bourse de ma thèse.*

*Cette thèse s'est réalisée sous la direction de Siobhán STAUNTON, Directeur de Recherche à l'INRA (Montpellier), Hervé QUIQUAMPOIX, Directeur de Recherche à l'INRA (Montpellier) et Joseph SEI, Professeur à l'Université de Cocody (Côte d'Ivoire). Je vous remercie infiniment pour m'avoir initié à la recherche. Votre grande disponibilité, vos conseils scientifiques pertinents, la qualité de votre encadrement et vos grandes qualités humaines m'ont été d'une aide précieuse tout au long de cette belle aventure. Je voudrai particulièrement dire merci à Siobhán STAUNTON pour avoir facilité l'obtention de ma bourse de thèse et pour tout son soutien tout au long de cette thèse.*

*Je remercie Maria RAO, Professeur à l'Université de Napoli (Italie) et Christian Mougin, Directeur de Recherche à l'INRA d'avoir accepté d'être Rapporteur de cette thèse. Je voudrai aussi être reconnaissant envers Isabelle BERTRAND, Chargé de Recherche à l'INRA et Roger FRUTOS, Directeur de Recherche au CIRAD d'avoir bien voulu juger ce travail et participer au jury de cette thèse.*

*Pour la partie technique des travaux de ma thèse, je tiens à remercier Josiane Abadie, technicienne de recherche à l'INRA (Montpellier) qui m'a été d'une aide très précieuse, surtout dans le démarrage de mes expérimentations. Je remercie également Gabrielle DAUDIN, technicienne de recherche à l'INRA (Montpellier) qui s'est investie dans la deuxième partie des travaux de cette thèse et qui a aussi été d'une aide précieuse. Merci à vous deux pour les instants de partage de chocolats et pour les encouragements quand j'en avais besoin. Je voudrai aussi remercier Francois-Xavier Sauvage, Ingénieur d'étude à l'INRA (Montpellier) pour son aide et sa disponibilité dans la partie protéomique de cette thèse.*

*Pour la partie statistique, Je suis reconnaissant envers Philippe Delporte, chercheur au CIRAD (Montpellier) et Benoît CLOUTIER-HURTEAU, post-doctorant CIRAD pour leurs conseils et aide précieuse en traitements statistiques.*

*Les travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'UMR Eco& Sols de Montpellier, je voudrai dire merci à son directeur, Jean-Luc CHOTTE pour m'avoir accueilli et financé ma participation à deux conférences scientifiques en Allemagne.*

*Je veux dire merci à chaque membre du personnel administratif et technique et à tous les non permanents de cette UMR pour la bonne qualité de nos relations, pour leur sympathie et leur solidarité pendant les durs moments qu'ont traversés tous les Ivoiriens en 2011. Ils ont tous contribué largement à la réussite de cette thèse. Merci particulièrement à Farid Meddaci, Corinne Allègre, Michelle Tigny, Joëlle Toucet, Didier Brunet, Catherine Pernot, Didier Arnal, Jean Louis Aznar, Gérard Souche, Manon Villeneuve et Elvire Legname pour leur aide parfois ponctuelle.*

*Pendant ces années j'ai eu la chance de faire la connaissance de personnes de diverses origines avec qui j'ai pu échanger. Merci à tous les stagiaires, doctorants et post-doctorants que j'ai côtoyé et avec qui j'ai passé de bons moments.*

*Merci à Usman, Xiaoyan, Elodie, Marek, Rim, Zeeshan, Patrice, Adnane, Egidio, Edouardo, Nicolas...*

*Un spécial merci à mon épouse Satchait Gisèle pour son soutien moral et spirituel très précieux tout au long de cette thèse. Merci pour ton sacrifice et ta patience pour ces trois longues années de séparation physique. Cette thèse vient récompenser aussi tes efforts et ta compréhension.*

*A mon premier né Joël Yvan, né en plein milieu de ma thèse à près de 6000 km de moi (A Abidjan) et qui a été privé dans les premiers instants de la présence de son père, je t'aime et promets de rattraper tout le temps perdu loin de toi.*

*Grand merci à mes frères et sœurs pour le soutien moral et l'amour manifesté. Merci surtout à mes deux aînés Richmond KEDI et Roland Lebon KEDY qui n'ont pas hésité un seul instant à m'accorder leur soutien financier et moral dès les premiers moments de mon séjour à Montpellier quand j'en avais besoin.*

*Merci à Mon père et ma mère pour m'avoir accompagné de leur bénédiction et leur prière pour la réalisation de ce rêve tant désiré.*

*Merci à tous mes amis étudiants et compatriotes à Montpellier, qui pendant les week-ends me permettaient de ne pas me sentir trop seul et pour les bons moments passés ensemble. Notre groupe, le « VillageIvoir » mérite de continuer à exister pour servir à nouer des liens entre étudiants de la diaspora Ivoirienne. Merci à Privat, Sabine, Bio, Amin, Jean Didier, Doudjo, Momo, Clémentine, Koné de Narbonne, Moctar etc.*

*Je tiens à remercier toute la communauté de l'Eglise du Tabernacle de Montpellier et son pasteur pour avoir été une seconde famille pour moi ici à Montpellier et pour toutes les joies que nous avons ensemble partagé.*

*Enfin, que toute la gloire revienne au Seigneur qui a été du début à la fin de toute chose dans la réalisation de cette thèse.*

## RESUME

---

La prédiction de l'activité des phosphatases fongiques dans l'amélioration de la nutrition phosphatée doit prendre en compte les facteurs qui influencent leur fonctionnement dans les sols. L'objectif de cette thèse a été d'étudier divers facteurs qui pouvaient influencer l'efficacité des phosphatases de champignons ectomycorhiziens dans les sols. L'adsorption et l'activité à l'état adsorbé des phosphatases de *Suillus collinitus* et de *Hebeloma cylindrosporum* ont été étudiées avec plusieurs fractions de différents sols tropicaux. La persistance de l'activité de ces enzymes immobilisées sur les sols a également été étudiée. Ces phosphatases ont montré une diversité d'affinité avec les colloïdes des sols, liée surtout à leur origine et leurs caractéristiques. En outre, aucune relation n'a été établie entre l'adsorption et l'activité catalytique résultante, car il n'y avait généralement pas de perte d'activité à l'état adsorbé. L'une des enzymes qui a montré une dégradation rapide en solution suivant le temps d'incubation, a été protégée par les sols ferrallitiques mais pas par les vertisols. Des essais de purification et de caractérisation ont été faits sur ces échantillons de phosphatases fongiques. Les fractions de phosphatases de *S. collinitus* purifiées et retenues sur une colonne hydrophobe de chromatographie ont montré une activité en contact avec des argiles fortement supérieure à celle en solution. L'hypothèse d'une dimérisation produite à la surface des argiles a été avancée pour expliquer l'amplification inattendue d'activité catalytique à l'état adsorbé des fractions purifiées.

**Mots clés :** adsorption, phosphatases, champignons ectomycorhiziens, *Suillus collinitus*, *Hebeloma cylindrosporum*, sols tropicaux, sols ferrallitiques, vertisols.

## SUMMARY

---

The role of catalytic activity of fungal phosphatases in the improvement of the phosphorus nutrition cannot be reliably predicted without taking into account the factors which influence their behaviour in the soil. The objective of this thesis was to study various factors which could influence the effectiveness of ectomycorrhizal fungal phosphatases in soils. Adsorption and the activity in the adsorbed state of phosphatases produced by *Suillus collinitus* and *Hebeloma cylindrosporum* were studied in contact with several fractions of various tropical soils. The persistence of the activity of these enzymes immobilized on the soils was also studied. These phosphatases showed a diversity of affinity for soil colloids, due to their origin and their characteristics. Moreover, no relation was found between adsorption and the resulting catalytic activity; there was generally no loss of activity in an adsorbed state. One of the enzymes which underwent rapid degradation in solution was protected by the presence of ferrallitic soils but not by the vertisols. These fungic phosphatase samples were purified and partially characterized. The fractions of *S. collinitus* phosphatases retained on hydrophobic chromatography column showed enhanced activity in contact with mineral clays with respect to solution. The hypothesis of dimerisation on the clay surfaces was advanced to explain the unexpected enhancement of catalytic activity in an adsorbed state of the purified fractions.

**Key words:** adsorption, phosphatases, ectomycorrhizal fungi, *Suillus collinitus*, *Hebeloma cylindrosporum*, tropical soils, ferrallitic soils, vertisols

# SOMMAIRE

---

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Références citées .....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre I: Synthèse bibliographique.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Le phosphore.....</b>	<b>6</b>
1.1. Le phosphore inorganique.....	7
1.2. Le phosphore organique.....	10
1.2.1. Les principales classes de phosphore organique .....	13
1.2.1.1. Phosphomonoesters .....	13
1.2.1.2. Phosphodiesters .....	13
1.2.1.3. Phosphonates .....	13
1.2.1.4. Phosphoanhydride et polyphosphates.....	13
1.2.2. Phosphates d'inositol.....	14
1.2.2.1. Stéréo-isomères des phosphates d'inositol .....	14
1.2.2.2. Phytate .....	15
1.3. Le cycle du phosphore dans le sol.....	15
<b>2. La nutrition phosphatée chez les plantes.....</b>	<b>16</b>
2.1. Importance du phosphore pour les plantes.....	16
2.2. Stratégie des plantes pour la nutrition phosphatée.....	17
2.2.1. Modification de la morphologie du système racinaire .....	17
2.2.2. Les transporteurs de phosphore inorganique.....	17
2.2.3. Les exsudats racinaires .....	18
2.2.4. Phosphatases intra et extracellulaires de plantes.....	18
2.2.5. Symbiose mycorhizienne.....	18
<b>3. Les phosphatases .....</b>	<b>18</b>
3.1. Classification des phosphatases .....	18
3.1.1. Selon le pH optimal .....	19
3.1.1.1. Les phosphatases acides.....	19
3.1.1.2. Les phosphatases alcalines.....	19
3.1.2. Selon le substrat.....	19
3.1.2.1. Phosphomonoesterase .....	20
3.1.2.2. Phosphodiésterase .....	20
3.1.2.3. Autres hydrolases.....	20
3.1.3. Les phytases.....	20
3.2. Origine des phosphatases dans les sols .....	21
3.2.1. Les phosphatases fongiques .....	21
3.2.2. Les phosphatases bactériennes .....	21
3.2.3. Les phosphatases racinaires.....	22
<b>4. Le sol.....</b>	<b>23</b>

4.1. Composants du sol .....	24
4.1.1. Composition minérale .....	25
4.1.1.1. Les phyllosilicates.....	25
4.1.1.2. Les oxydes, oxyhydroxydes et les hydroxydes.....	26
4.1.2. Composition organique .....	27
4.2. Caractéristiques physicochimiques .....	28
4.2.1. Taille des particules et texture du sol .....	28
4.2.2. Caractéristiques physico-chimiques .....	30
4.2.2.1. Capacité d'échange de cation (CEC) du sol .....	30
4.2.2.2. Surface spécifique du sol .....	31
4.2.2.3. Le pH du sol.....	32
4.3. Les sols tropicaux.....	32
<b>5. Interaction phosphatases-sol .....</b>	<b>33</b>
5.1. Propriétés enzymatiques.....	33
5.1.1. pH et température .....	35
5.1.2. Les inhibiteurs et les activateurs.....	35
5.2. Adsorption et activité .....	35
5.2.1. Adsorption des enzymes.....	35
5.2.1.1. Forces électrostatiques.....	36
5.2.1.2. Interaction hydrophobe .....	36
5.2.1.3. Forces de Van der Waals .....	36
5.2.1.4. Liaison hydrogène.....	37
5.2.1.5. La liaison covalente .....	37
5.2.1.6. Piégeage des enzymes entre les feuillets des minéraux argileux.....	37
5.2.1.7. Encapsulation des enzymes dans la matière organique .....	38
5.2.2. Effet de l'adsorption sur l'activité des enzymes.....	38
5.3. Modification de conformation et orientation du site actif de l'enzyme .....	40
<b>6. Activités catalytiques des phosphatases dans les sols.....</b>	<b>42</b>
6.1. Activités catalytiques comme sonde de qualité de sol.....	42
6.2. Expression d'activité catalytique d'enzymes apportées aux sols et minéraux des sols .....	44
<b>Références citées .....</b>	<b>46</b>

**Chapitre II: Diversity of adsorption affinity and catalytic activity of fungal phosphatases in contact with tropical soils. .... 58**

<b>1. Introduction .....</b>	<b>60</b>
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>61</b>
2.1. Preparation of acid phosphatases .....	61
2.2. Soil samples .....	61
2.3. Measurement of enzymatic activity .....	62

2.4. Data treatment .....	64
<b>3. Results.....</b>	<b>64</b>
3.1. Adsorption and activity of phosphatases in the presence of soil clay as a function of pH.....	64
3.1.1. Vmax for procedures A, B and C .....	64
3.1.2. Fraction not adsorbed and relative activity retained in the adsorbed state, F and R .....	67
3.2. Comparison of effect of various ferralsols on enzyme adsorption and activity .....	68
3.3. Effect of particle size of soil on adsorption of AcPases .....	70
3.4. Effect of chemical removal of soil coatings on phosphatase adsorption .....	71
3.5. Effect of soil particle size on relative catalytic activity of adsorbed phosphatases .....	72
3.6. Effect of chemical removal of organo-mineral coatings on relative activity in the adsorbed state .....	73
<b>4. Discussion .....</b>	<b>74</b>
4.1. pH dependence of affinity and adsorption mechanism .....	74
4.2. Surface area and affinity .....	75
4.3. Effect of organo-mineral coatings on enzyme affinity for surfaces.....	76
4.4. Relative activity of adsorbed phosphatase .....	76
4.5. Effect of organo-mineral coatings on adsorbed phosphatase activity.....	77
<b>Conclusion .....</b>	<b>78</b>
<b>References cited .....</b>	<b>79</b>

**Chapitre III: Evolution of catalytic activity of two acid phosphatases from ectomycorrhizal fungi incubated with three tropical soils .....** **84**

<b>1. Introduction .....</b>	<b>86</b>
<b>2. Materials and methods.....</b>	<b>87</b>
2.1 Phosphatase preparation.....	87
2.2 Soil and soil treatments .....	87
2.3 Soil microcosms preparation and incubation .....	88
2.4 Phosphatase activity measurements .....	88
2.5 Expression of results .....	88
2.6 Statistical analyses .....	88
<b>3. Results.....</b>	<b>90</b>
3.1. Evolution of Hc acid phosphatase activity in solution and in contact with soil .....	90
3.2. Evolution of Sc acid phosphatase activity in solution and in contact with soil .....	92

<b>4. Discussion .....</b>	<b>93</b>
4.1. Effect of soil on time-dependent phosphatase activity .....	93
4.2. Effect of soil sterilization on added phosphatase activity .....	94
4.3. Effect of organic matter on phosphatase activity .....	95
4.4 Native phosphatase activity .....	95
<b>Conclusion .....</b>	<b>96</b>
<b>Reference cited .....</b>	<b>97</b>

**Chapitre IV: Purification et caractérisation des phosphatases acides de *Suillus collinitus* et *Hebeloma cylindrosporum*..... 101**

<b>1. Introduction .....</b>	<b>102</b>
<b>2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>103</b>
2.1 Obtention des solutions de phosphatases .....	103
2.2. Séparation des phosphatases .....	103
2.3. Analyse des fractions collectées.....	104
2.4. SDS-PAGE et détection des phosphatases par la révélation d'activité .....	104
2.5. Gel d'électrophorèse 2D et détection des phosphatases par la révélation d'activité .....	105
<b>3. Résultats et discussion .....</b>	<b>105</b>
3.1. Séparation chromatographique des phosphatases de <i>Suillus collinitus</i> et <i>d'Hebeloma cylindrosporum</i> .....	105
3.2. Masse moléculaire.....	107
3.3. Point isoélectrique.....	109
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>109</b>
<b>Références citées .....</b>	<b>111</b>

**Chapitre V: Comparaison d'activité catalytique de phosphatases fongiques à différents degrés de purification en présence de kaolinite et de montmorillonite ..... 115**

<b>1. Introduction .....</b>	<b>117</b>
<b>2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>118</b>
2.1. Obtention des solutions de phosphatases .....	118
2.2. Purification et fractionnement des phosphatases .....	118
2.3. Préparation des argiles .....	119
2.4. Mesure de l'activité enzymatique .....	119
2.5. Traitements des données .....	120
2.6. Mesure de l'effet d'éventuels inhibiteurs de S1 .....	120
2.7. Adsorption et activité de S2 en fonction de la quantité de S2 ou de BSA... 120	
<b>3. Résultats .....</b>	<b>121</b>
3.1. Activité des échantillons de phosphatases en solution.....	121

3.2. Adsorption et activité des fractions de phosphatases en présence de minéraux argileux en fonction du pH .....	121
3.3. Adsorption et activité de S1 et/ou S2.....	124
3.4. Effet de différente quantité de BSA sur l'adsorption et l'activité de S2.....	125
3.5. Adsorption et activité de S2 en fonction de la quantité de S2 .....	125
<b>4. Discussion .....</b>	<b>127</b>
4.1. Affinité des phosphatases pour les surfaces minérales .....	127
4.2. Modification de l'activité catalytique des enzymes en présence des argiles	128
4.3. Effets comparés des deux argiles sur l'interaction avec les phosphatases...	130
<b>Conclusion .....</b>	<b>130</b>
<b>Références citées .....</b>	<b>132</b>
<b>Chapitre VI: Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>136</b>
<b>1. Conclusion générale.....</b>	<b>136</b>
1.1. Les propriétés du sol qui déterminent l'adsorption et l'activité catalytique des phosphatases .....	136
1.2. Les propriétés du sol qui déterminent la persistance des phosphatases .....	136
1.3. Purification des phosphatases sécrétées dans le milieu de culture.....	137
1.4. Comportement des fractions de phosphatases purifiées avec deux minéraux argileux .....	137
<b>2. Perspectives .....</b>	<b>138</b>
2.1. Effet des sols sur la stabilité des phosphatases .....	138
2.2. Analyses biochimiques complémentaires des phosphatases fongiques .....	138
2.3. Élucider l'hypothèse de dimérisation des phosphatases .....	138
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>139</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>143</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>145</b>

# **Introduction**

## Introduction générale

Le phosphore (P) est l'un des nutriments essentiels pour la croissance et le développement des plantes, et sa déficience est fréquemment un facteur qui limite la production des cultures dans plusieurs écosystèmes (Nziguheba and Bunemann, 2005). L'orthophosphate est considéré comme la seule forme assimilable par les plantes et se retrouve souvent complexé avec plusieurs constituants du sol, ce qui réduit considérablement sa diffusion dans la solution du sol et sa disponibilité (Hinsinger, 2001; Soon, 2008). Les sols tropicaux, généralement très altérés et dont la minéralogie est dominée par la kaolinite, les oxydes de fer et d'aluminium et autres minéraux argileux très altérés (Sanchez and Logan, 1992) sont particulièrement sujets à la déficience en Pi (Vance et al., 2003). Le phosphore organique (Po) qui représente entre 30 et 65% du phosphore total (Pt), bien que certains sols puissent contenir jusqu'à 90% de Po (Condrón and Tiessen, 2005), peut jouer un rôle important dans la nutrition phosphatée à condition qu'il soit minéralisé (Turner and Engelbrecht, 2011). Il peut être considéré comme la plus importante source potentielle de P pour les plantes dans les sols tropicaux recevant peu ou pas d'engrais phosphatés et où la solubilité du Pi est faible. Le Po peut être minéralisé par les phosphatases qui sont des enzymes produites et sécrétées dans le sol par plusieurs microorganismes dont les champignons ectomycorhiziens (Cairney, 2011). L'efficacité de ces enzymes après leur sécrétion dans les sols dépend de leur interaction avec les minéraux du sol (Quiquampoix, 1987a) ou les surfaces organo-minérales (Quiquampoix, 1987b), de leur activité catalytique après leur adsorption et de leur stabilité contre la dégradation microbienne et la détérioration chimique.

Comme les autres protéines, les enzymes ont une affinité pour les surfaces solides sur lesquelles elles sont souvent adsorbées (Norde and Lyklema, 1991). L'adsorption peut avoir plusieurs conséquences sur les enzymes et leur fonctionnement : (i) la réduction de l'affinité des enzymes pour le substrat, l'inhibition de l'activité catalytique par (ii) la modification de la conformation de l'enzyme ou (iii) l'orientation du site actif de l'enzyme vers la surface de contact avec l'adsorbant et (iv) la réduction de la mobilité de l'enzyme. L'adsorption des enzymes peut parfois être forte et l'inhibition de l'activité catalytique peut être irréversible. Néanmoins, l'adsorption peut aussi avoir des avantages pour les enzymes. Elle peut protéger les enzymes contre la dégradation microbienne (George et al., 2007a; Quiquampoix et al., 2002), leur procurer une plus grande stabilité thermique (Huang et al., 2005) ou augmenter leur rémanence dans les sols. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'adsorption des enzymes sur les surfaces organo-minérales notamment l'interaction électrostatique et hydrophobe, les forces de van der Waals, la liaison covalente et l'encapsulation des enzymes dans les micropores de la matière organique ou dans les feuillettes des minéraux argileux (George et al., 2007a; Nannipieri et al., 1996; Quiquampoix et al., 2002).

L'adsorption et l'activité catalytique des enzymes après adsorption dépendent fortement du pH, de la nature des surfaces organo-minérales adsorbantes mais aussi de l'origine et des caractéristiques biochimiques des enzymes. Les phosphatases acides des champignons ectomycorhiziens sont capables d'avoir différents comportements dans leur interaction avec une même surface solide. L'effet des surfaces minérales ou organo-minérales sur l'activité catalytique des enzymes a été étudié dans plusieurs travaux de recherches en utilisant des minéraux purs ou des complexes synthétiques pour simuler le sol naturel (Leprince and Quiquampoix, 1996; Rao et al., 1996; Rao et al., 1998; Sarkar et al., 1989; Shindo et al., 2002). Ces systèmes modèles peuvent être différents des complexes hétérogènes des sols naturels. Il s'avère nécessaire de comprendre tous les facteurs qui déterminent le fonctionnement des phosphatases dans les sols en utilisant des sols naturels pour une prédiction fiable du rôle de ces enzymes dans la mobilisation du Pi pour les plantes. Quand les conséquences des interactions entre enzymes et sol ne sont pas prises en compte, l'utilisation de champignons symbiotiques ou de plantes génétiquement modifiées capables de synthétiser d'importantes quantités de phosphatases s'avère décevante.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier divers facteurs qui peuvent déterminer l'efficacité des phosphatases ectomycorhiziennes dans le sol. Nous avons choisi de comparer des sols tropicaux, car la nutrition phosphatée est souvent très limitant dans ces sols et la minéralisation de phosphore organique peut jouer un rôle important. Nous avons concentré les recherches sur les phosphatases extracellulaires produites par deux champignons, *Suillus collinitus* et deux souches d'*Hebeloma cylindrosporum*. Dans un premier temps nous avons tenté d'élucider des propriétés du sol qui déterminent l'adsorption et le comportement catalytique de phosphatases à l'état adsorbé. Pour ce faire, l'activité a été mesurée en fonction du pH et les sols traités pour séparer des fractions granulométriques et pour enlever chimiquement des revêtements organo-minéraux. Ensuite nous avons étudié les facteurs du sol qui déterminent la persistance de l'activité dans le sol. Deux sols ont été incubés dans des conditions contrôlées d'humidité et de température, l'activité microbiologique diminuée par stérilisation ou non, et l'activité native distinguée de l'évolution de l'activité de phosphatases fongiques ajoutées. Dans la seconde étape de ce travail, nous avons essayé de mettre au point des techniques de purification des extraits fongiques contenant des phosphatases. Par la suite, nous avons comparé les propriétés d'adsorption et d'expression d'activité catalytique des différentes fractions de phosphatases en contact avec des argiles de référence.

## Références citées

- Cairney, J., 2011. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil* 344, 51-71.
- Condon, L.M., Tiessen, H., 2005. Interactions of organic phosphorus in terrestrial ecosystems, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 295-307.
- George, T.S., Quiquampoix, H., Simpson, R.J., Richardson, A.E., 2007. Interactions between phytases and soil constituents: implications for the hydrolysis of inositol phosphates, In: Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J. (Eds.), *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*. Cabi, Wallingford UK, pp. 221-241.
- Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237, 173-195.
- Huang, Q., Liang, W., Cai, P., 2005. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 209-214.
- Leprince, F., Quiquampoix, H., 1996. Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P., 1996. Humus and Enzyme Activity, In: Alessandro, P. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 293-328.
- Norde, W., Lyklema, J., 1991. Why proteins prefer interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 2, 183-202.
- Nziguheba, G., Bunemann, E.K., 2005. Organic phosphorus dynamics in tropical agroecosystems, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 243-268.
- Quiquampoix, H., 1987a. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a  $\beta$ -D-glucosidase on different mineral surfaces. *Biochimie* 69, 753-763.
- Quiquampoix, H., 1987b. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. II. Competitive effects on the adsorption of a  $\beta$ -D-glucosidase in mixed mineral or organo-mineral systems. *Biochimie* 69, 765-771.
- Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.H., 2002. Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 285-306.
- Rao, M.A., Gianfreda, L., Palmiero, F., Violante, A., 1996. Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. *Soil Science* 161, 751-760.

- Rao, M.A., Violante, A., Gianfreda, L., 1998. Interactions between tannic acid and acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 111-112.
- Sanchez, P., Logan, T., 1992. Myths and science about the chemistry and fertility of soils in the tropics, In: Lal, R., Sanchez, P. (Eds.), *Myths and Science of Soils of the Tropics*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 35-46.
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A., Bollag, J.-M., 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 223-230.
- Shindo, H., Watanabe, D., Onaga, T., Urakawa, M., Nakahara, O., Huang, Q.Y., 2002. Adsorption, activity, and kinetics of acid phosphatase as influenced by selected oxides and clay minerals. *Soil Science and Plant Nutrition* 48, 763-767.
- Soon, Y.K., 2008. Phosphorus cycle, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of soil science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 547-553.
- Turner, B.L., Engelbrecht, B.M.J., 2011. Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. *Biogeochemistry* 103, 297-315.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.

# **Chapitre I:**

## **Synthèse bibliographique**

## Chapitre I: Synthèse bibliographique

### 1. Le phosphore

Le phosphore (P) vient en dixième position d'abondance des éléments naturels dans la croûte terrestre de la terre avec une concentration moyenne de  $1\text{g.kg}^{-1}$  dont la plus grande réserve se trouve dans les sédiments et les roches (Soon, 2008). Il est l'un des 17 éléments nutritifs essentiels à la croissance des plantes (Raghothama, 1999), mais le moins mobile et disponible dans la plupart des sols. Seulement 1% du phosphore du sol est utilisé par les végétaux pendant une saison de croissance (Borie and Barea, 1981). Il est par conséquent le plus fréquent ou même le premier facteur limitant pour la croissance et le développement des plantes (Hinsinger, 2001; Vance et al., 2003). En effet, la surface agricole, à travers le monde, déficients en phosphore disponible pour le maintien de la production optimale des cultures a été estimée à 5,7 milliards d'hectares (Batjes, 1997). D'autres auteurs estiment que les rendements des cultures sont limités par la disponibilité du P sur 30 à 40% des terres arables du monde (Runge-Metzger, 1995; Von Uexküll and Mutert, 1995). La concentration de P total (Pt) dans la couche de surface du sol (notamment entre 0 et 15 cm de profondeur) varie considérablement entre régions du monde, avec des valeurs moyennes de 380 à 1330 mg/kg de sol, et avec les sols tropicaux ayant généralement des concentrations moins que la moitié de celles des sols tempérés (**Tableau I-1**). Le phosphore n'est pas disponible parce qu'il forme rapidement des complexes insolubles avec des cations, particulièrement les ions aluminium et fer dans les sols acides et les ions calcium dans les sols calcaires.

**Tableau I-1:** Phosphore total dans les surfaces de sols (Soon, 2008)

Pays	Total P (Pt)	
	Gamme ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	Moyenne ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )
Australie	220-1150	380
Brésil	40-1590	490
Canada	507-1510	980
Nouvelle Zélande	210-2560	1090
Nigeria	38-1170	385
Ecosse	900-2040	1330
USA	152-1200	543

Les sols acides lessivés des régions tropicales et subtropicales sont particulièrement sujets à la déficience en P (Vance et al., 2003). La faible disponibilité du P concerne aussi les sols des régions du bassin méditerranéen qui sont dominés par des sols calcaires et alcalins. La forte rétention des ions P sur les constituants solides des sols est favorisée par leur minéralogie particulière et leur géochimie (Hinsinger, 2001) et a pour conséquence une faible quantité d'ions P dans la solution de sol. Le phosphore est surtout concentré dans la partie superficielle du sol à cause de l'utilisation des fertilisants phosphatés dans les sols cultivés, des cycles biologiques et de l'accumulation de feuilles mortes et de détritiques dans les sols non

cultivés, et en partie à cause de la faible mobilité et la forte réactivité avec les colloïdes du sol (Soon, 2008). Le phosphore joue un rôle clé dans une série de processus, y compris la production d'énergie, la synthèse d'acides nucléiques, la photosynthèse, la glycolyse, la respiration, la synthèse et la stabilité des membranes, l'activation/inactivation des enzymes, les réactions d'oxydo-réduction, la signalisation, le métabolisme carbohydate et la fixation d'azote (Vance et al., 2003). La concentration de P dans les plantes est de 0,05 à 0,50% de la masse sèche. L'application d'engrais phosphatés, principalement obtenus à partir de roches phosphatées, est généralement le traitement recommandé pour l'amélioration de la quantité de P disponible dans les sols. Contrairement aux autres éléments nutritifs des plantes, le P est une ressource non renouvelable, comme le pétrole. A l'heure actuelle, le phosphore est principalement obtenu à partir des extraits de roches phosphatées. Des études démontrent qu'au rythme actuel d'extraction, les réserves mondiales de phosphate commercial seront épuisées dans 50 à 100 ans (Cordell et al., 2009; Runge-Metzger, 1995). Le potentiel de réserves restantes est de moindre qualité ou plus coûteux à extraire. De plus, dans les sols, le caractère non renouvelable des ressources en P disponible provient de l'appauvrissement continu des terres en P disponible sans apport d'engrais ou de matière organique, une condition très courante dans de nombreux pays en développement (Raghothama, 1999).

Le phosphore est présent dans le sol sous des formes minérales (Pi) ou organiques (Po) très variées, dont certaines ne sont pas bien caractérisées à cause des difficultés d'extraction et d'isolation.

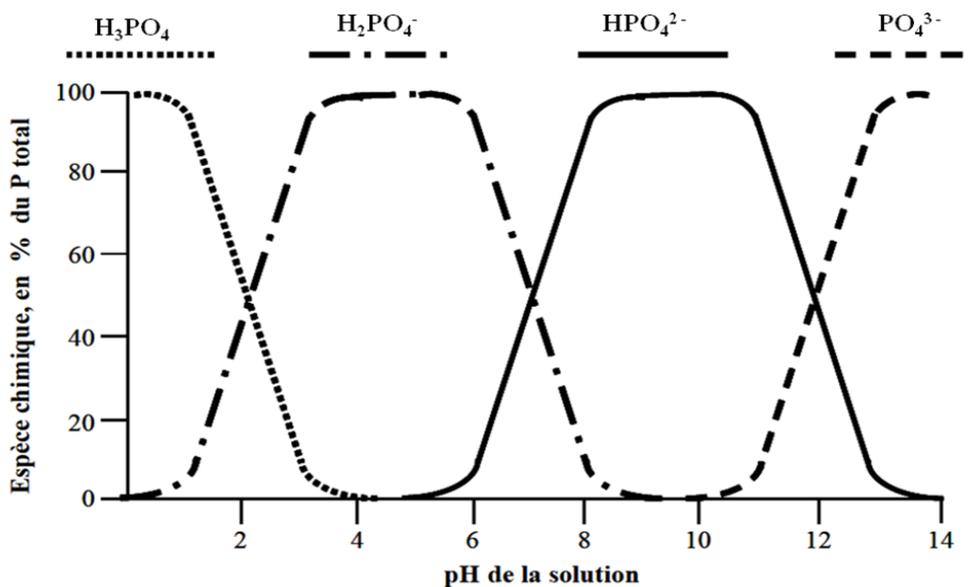
### 1.1. Le phosphore inorganique

L'absorption du phosphore par les racines des plantes se fait essentiellement sous la forme d'ions orthophosphates Pi ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ ) dont la concentration dans la solution du sol est très faible (Bielecki, 1973). Dans la plupart des sols, la concentration de Pi de la solution du sol est comprise entre 0,1 et 10  $\mu\text{M}$  (Hinsinger, 2001; Raghothama, 1999) alors que les plantes peuvent contenir 5 à 20 mM de Pi. De plus, il est peu mobile dans le sol et son déplacement s'effectue principalement par diffusion, un processus très lent et de faible amplitude. La faible mobilité du Pi dans la solution du sol, estimée de  $10^{-12}$  à  $10^{-15} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  (Schachtman et al., 1998), résulte de sa forte réactivité avec les constituants du sol. La fixation inorganique et la formation de complexes organiques du Pi dans le sol est la raison principale de sa faible disponibilité. Dans les sols acides où les ions aluminium prédominent et où le fer interagit fortement avec Pi, la fixation des phosphates augmente significativement. Environ 80% du Pi apporté comme fertilisants peut être indisponible pour les plantes (Holford, 1997). La forme d'ion sous laquelle Pi existe dans la solution de sol dépend du pH. Les formes de Pi proviennent de la dissociation de l'acide orthophosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) comme le résume le **Tableau I-2**. Les ions orthophosphates  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  sont les formes de Pi dominantes dans la plupart des sols où le pH mesuré est entre 4 et 8. L'ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  domine dans les sols acides tandis que  $\text{HPO}_4^{2-}$  est l'espèce majoritaire au-delà du pH 7,2. L'espèce  $\text{PO}_4^{3-}$  ne se forme qu'à partir du pH 10 comme l'illustre la **Figure I-1**.

**Tableau I-2:** Réactions de dissociation de l'acide orthophosphorique (Lindsay, 1979)

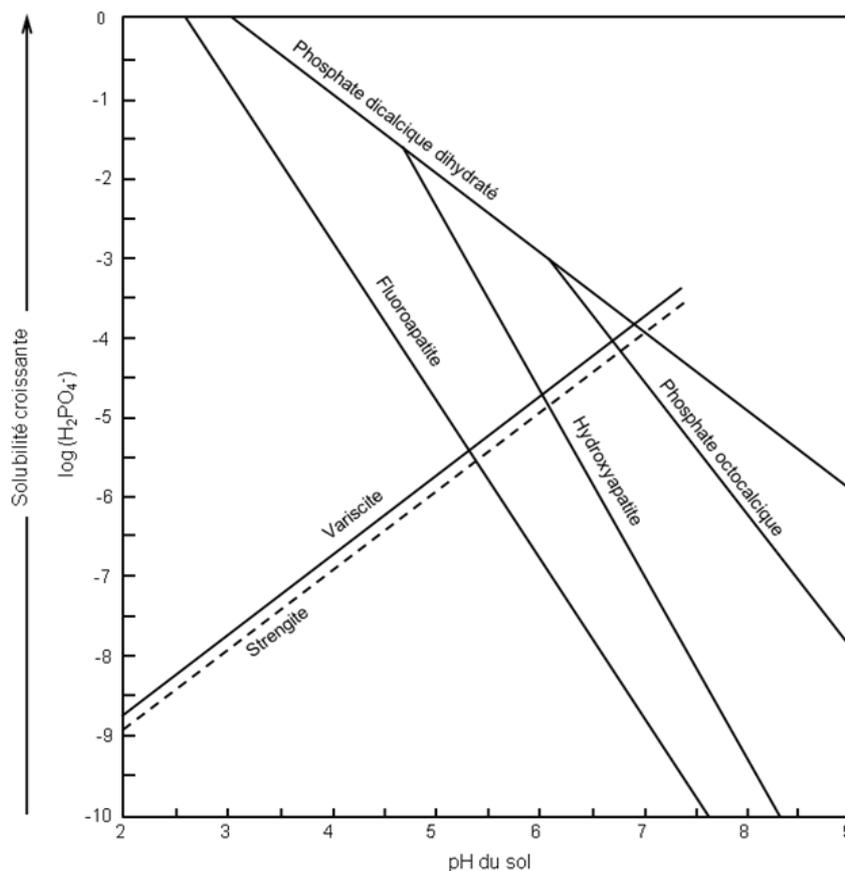
Réaction de dissociation	pKa
$\text{H}_3\text{PO}_4 \leftrightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}^+$	2,12
$\text{H}_2\text{PO}_4^- \leftrightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$	7,20
$\text{HPO}_4^{2-} \leftrightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+$	12,30

De plus, les ions orthophosphates sont des ligands inorganiques importants dans la solution du sol et ont donc une forte tendance à former des paires d'ions ou des complexes avec plusieurs cations métalliques, notamment avec Ca et Mg d'une part, et avec Fe et Al d'autre part. Cela dépend du pH de la solution de sol dans lequel se forment ces complexes. Dans les sols acides, à cause de la forte solubilité des oxydes de Fe et d'Al, les ions trivalent  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Al}^{3+}$  peuvent se trouver en forte quantité dans la solution du sol, alors qu'ils seront négligeables à pH neutre ou alcalin (Hinsinger, 2001; Lindsay, 1979). Inversement,  $\text{Ca}^{2+}$  et dans une moindre mesure  $\text{Mg}^{2+}$  seront les cations dominants dans la solution des sols neutres et alcalins.



**Figure I-1:** Distribution des ions orthophosphates en solution en fonction du pH. (Brady and Weil, 1996)

La **Figure I-2** présente le diagramme de solubilité des composés phosphatés dans le sol en fonction du pH à 25° C (Lindsay and Moreno, 1960). Ainsi l'interaction des ions orthophosphates avec le cation  $\text{Ca}^{2+}$  conduit à la formation de différents phosphates de calcium (**Tableau I-3**). On distingue parmi les phosphates de calcium, les apatites de formule  $\text{M}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$  où M est le cation  $\text{Ca}^{2+}$  et l'anion (X) peut être  $\text{F}^-$  (fluoroapatite),  $\text{Cl}^-$  (chloroapatite), ou  $\text{OH}^-$  (hydroxyapatite). Le calcium peut être remplacé par le magnésium, le manganèse, le césium ou d'autres cations (Paul and Clark, 1989).



**Figure I-2** : Diagramme de la solubilité des composés phosphatés dans le sol en fonction du pH (Lindsay and Moreno, 1960)

**Tableau I-3:** Quelques minéraux phosphatés dans le sol (Barber, 1984)

Phosphates de calcium	Phosphates d'aluminium	Phosphates de fer
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ Fluorapatite	$\text{AlPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ Variscite	$\text{FePO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ Strengite
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ Hydroxyapatite	$\text{H}_6\text{K}_3\text{Al}_5(\text{PO}_4)_8, 18\text{H}_2\text{O}$ Taranakite de potassium	
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Phosphate tricalcique	$\text{AlPO}_4$ Berlinite	
$\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3, 2,5\text{H}_2\text{O}$ Phosphate octocalcique		
$\text{CaHPO}_4$ Phosphate dicalcique		
$\text{CaHPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ Phosphate dicalcique dihydraté		

Les phosphates monocalciques dans un sol calcaire peuvent précipiter avec le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) pour donner des phosphates dicalciques dihydratés (Arvieu, 1974). Dans les sols alcalins ( $\text{pH} > 8$ ) les phosphates mono et dicalciques se transforment en phosphates tricalciques, puis en phosphates cristallisés de type apatite. Les phosphates mono et dicalciques sont très importants pour la nutrition des plantes à cause de leur facilité à se solubiliser dans la solution de sol. Les phosphates de Fe et d'Al proviennent de la réaction entre l'acide phosphorique et les ions  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ou de la précipitation du phosphate avec les oxydes /hydroxydes de Fe et Al. ces phosphates sont très stables et insolubles dans les sols acides (Brady and Weil, 1996).

## 1.2. Le phosphore organique

Le phosphore organique (Po) ou phosphore associé au carbone regroupe une multitude de composés organiques contenant du phosphore. La quantité de Po est très variable dans les sols, elle représente dans la plupart des sols entre 30% et 65% du phosphore total (Pt), bien que certains sols contiennent jusqu'à 90% de phosphore organique (Condrón and Tiessen, 2005; Harrison, 1987). La teneur en Po total du sol dépend du type de climat, de végétation, de sol et de leur usage (Harrison, 1987). Le Po provient principalement des résidus végétaux et des cellules microbiennes et fongiques. Dans les sols où la quantité de Po n'est pas négligeable, elle peut jouer un rôle important dans la nutrition phosphatée. Lorsque la solubilité du P minéral dans les sols est faible, la disponibilité du P peut être contrôlée par la minéralisation du Po (Tiessen et al., 1984). Par conséquent le Po s'avère très important pour les plantes. Il est considéré comme la plus importante source de P pour les plantes dans les sols tropicaux recevant peu ou pas d'engrais phosphatés et où la solubilité du  $\text{P}_i$  est faible. Certaines racines de plantes (Findenegg and Nelemans, 1993; Tarafdar and Jungk, 1987) et des microorganismes sont capables de synthétiser des enzymes pour dégrader le Po dans le sol (Harrison, 1987; Tarafdar et al., 1988; Ullah and Gibson, 1987).

Le Po est en majorité sous la forme d'ester (liaison C-O-P) incluant les phosphates d'inositol (phytate), les acides nucléiques et les phospholipides (Condrón and Tiessen, 2005). Les principales classes des composés de phosphate organique identifiés (Turner et al., 2005) sont les phosphomonoesters, les phosphodiester, les phosphoanhydrides (y compris les polyphosphates) et les phosphonates. On distingue les phosphomonoesters des phosphodiester par le nombre de liaisons ester qui relie le groupement phosphoré au groupement carboné. Les phosphomonoesters sont définis par une seule liaison ( $\text{R-O-PO}_3\text{H}_2$ ) et les phosphodiester par deux liaisons ( $\text{R-O-(PO}_2\text{H)-O-R'}$ ). Les phosphoanhydrides organiques sont caractérisés par la liaison P-O-P et les phosphonates par la liaison C-P. Une liste a été établie par Turner et al (2005) regroupant des composés organiques de phosphore qui ont été trouvés dans l'environnement, les complexes de phosphates inorganiques et les phosphates organiques synthétiques généralement utilisés dans les dosages d'activité de phosphatases **Tableau I-4**.

**Tableau I-4** : Principaux composés organiques du phosphore de l'environnement, y compris des complexes de phosphates inorganiques et des substrats synthétiques couramment utilisés dans les analyses de l'activité des phosphatases (Turner et al., 2005).

Composé	Formule chimique	Classe	Commentaires
Adenosine bisphosphate	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	monoester	
Adenosine 5'-monophosphate	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	monoester	
2-(5'-chloro-2'-phosphoryloxy-phenyl)-6-chloro-4-(3H)-quinazolinone	$C_{14}H_7C_{12}N_2O_5P$	monoester	Connu sous le nom ELFP, il est utilisé pour détecter l'activité de phosphatase par fluorescence
Choline phosphate (phosphorylcholine)	$C_5H_{14}NO_4P$	monoester	Provient de l'action de phospholipase C. Sur la phosphatidyl choline
Ethanolamine phosphate (o-phosphorylethanolamine)	$C_2H_8NO_4P$	monoester	Provient de l'action de phospholipase C. Sur la phosphatidyl ethanolamine
$\alpha$ -Glucose 1-phosphate	$C_6H_{13}O_9P$	monoester	Sucre phosphate trouvé dans plusieurs plantes
D-Glucose 6-phosphate	$C_6H_{13}O_9P$	monoester	Sucre phosphate commun
$\beta$ -Glycerophosphate	$C_3H_9O_6P$	monoester	Provient de l'hydrolyse alcaline de phosphatidyl choline.
myo-Inositol hexakisphosphate (acide phytique)	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Composant majeur de Po dans les plantes et plusieurs sols
D-chiro-Inositol hexakisphosphate	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Provient de l'activité microbienne
neo-Inositol hexakisphosphate	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Provient de l'activité microbienne
schyllo-Inositol hexakisphosphate	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Provient de l'activité microbienne
Methylumbelliferyl phosphate	$C_{10}H_9O_6P$	monoester	Substrat synthétique (pour fluorimétrie)
para-nitrophenyl phosphate	$C_6H_6NO_6P$	monoester	Substrat synthétique (pour colorimétrie)
Phosphoenolpyruvate	$C_3H_5O_6P$	monoester	Souvent présent dans les

Serine phosphate	$C_3H_8NO_6P$	monoester	plantes	Provient de l'action de phospholipase C. sur la phosphatidyl serine
Adenosine 3',5'-cyclique monophosphate	$C_{10}H_{12}N_5O_6P$	diester		
Acide désoxyribonucléique (ADN)	$C_2H_8NO_4P$	diester		
bis-Methylumbelliferyl phosphate	$C_{20}H_{15}O_8P$	diester		Substrat synthétique (pour fluorimétrie)
bis-para-nitrophenyl phosphate	$C_{12}H_9N_2O_8P$	diester		Substrat synthétique (pour colorimétrie)
L- $\alpha$ -phosphatidyl choline (lecithin)	$C_{10}H_{19}NO_8P(2R)a$	diester		Phospholipide souvent présent dans les plantes
L- $\alpha$ -phosphatidyl ethanolamine (cephalin)	$C_7H_{12}NO_8P(2R)a$	diester		Phospholipide souvent présent dans les microorganismes
L- $\alpha$ -phosphatidyl -L- serine	$C_8H_{12}NO_{10}P(2R)a$	diester		Phospholipide souvent présent dans les tissus des mammifères
Acide ribonucléique (ARN)		diester		
Acides teichoïques	divers	diester		Composant commun des parois cellulaire des plantes et des bactéries
Adenosine 5'-diphosphate	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	polyphosphate		
Adenosine 5'-triphosphate	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	phosphoanhydride		
Polyphosphate (linéaire)	$H_{2n}O_{3n+1}P_n$	phosphoanhydride		
Pyrophosphate	$H_4O_7P_2$	phosphoanhydride		
Acide 2-Aminoethyl phosphonique	$C_2H_8NO_3P$	phosphonate		présent dans plusieurs organismes
N-(phosphonométhyl) glycine (Glyphosate)		phosphonate		Herbicide
Phosphocréatine	$C_4H_{10}N_3O_5P$			Commun dans les muscles des vertébrés

### 1.2.1. Les principales classes de phosphore organique

#### 1.2.1.1. *Phosphomonoesters*

Les phosphomonoesters sont la classe la plus abondante des composés organiques du phosphore dans la majorité des sols avec souvent plus de 90% du Po total (Turner, 2005). Elle est principalement sous la forme de phosphate d'inositol. Les phosphates d'inositol constituent un groupe des phosphates organiques largement répandus dans l'environnement naturel, c'est pourquoi nous lui avons consacré un paragraphe (cf paragraphe 1.2.2.). La nature stable des phosphomonoesters tels que les phosphates d'inositol est bien connue (Turner et al., 2002). Williams et Anderson (1968) ont montré que les phosphates d'inositol sont plus résistants à la minéralisation que les autres fractions de Po du sol et, par conséquent sont faiblement disponible pour les plantes. D'autres phosphomonoesters, tels que les sucres phosphatés sont plus labiles comme le sont des phosphodiester incluant les acides nucléiques et les phospholipides à cause de leur hydrolyse rapide dans le sol et sous culture (Turner et al., 2003b).

#### 1.2.1.2. *Phosphodiester*

Les phosphodiester, tels que l'ADN et les phospholipides sont en petites quantités dont une proportion importante est contenue dans les microorganismes vivants (Turner, 2005). La proportion des phosphodiester est généralement inférieure à 10% bien qu'ils aient une proportion plus importante dans les sols à forte teneur en matière organique (Bedrock et al., 1994; Cade-Menun et al., 2000; Turner et al., 2003b). Les acides nucléiques et leurs dérivés représentent moins de 3% du Po total du sol et proviennent de la décomposition des microorganismes, des plantes et des animaux (Dalal, 1977). Les phospholipides peuvent représenter entre 0,5 et 7% du Po total du sol (Anderson and Malcolm, 1974; Sanyal and Datta, 1991) et sont d'origine microbienne, végétale ou animale. Les acides nucléiques et les phospholipides peuvent être rapidement dégradés dans les sols (Anderson and Malcolm, 1974). Les phosphodiester sont considérés comme étant plus facilement minéralisables et utilisables par les plantes dans les sols (Condrón et al., 1990; Hawkes et al., 1984).

#### 1.2.1.3. *Phosphonates*

Les phosphonates qui contiennent une liaison directe C-P, se trouvent en quantités mesurables dans des sols humides, froids et acides défavorables à la décomposition (Tate and Newman, 1982). Ils sont probablement synthétisés dans des sols calcaires à pH alcalin mais très rapidement dégradés (Turner et al., 2003b).

#### 1.2.1.4. *Phosphoanhydride et polyphosphates*

Les phosphoanhydrides tel que les pyrophosphates sont synthétisés dans le sol par des microorganismes mais peuvent aussi provenir de la dégradation des polyphosphates (Turner et al., 2003b). Le pyrophosphate est rapidement hydrolysé par les phosphatases, mais peut persister dans le sol pendant plusieurs mois suivant son adsorption.

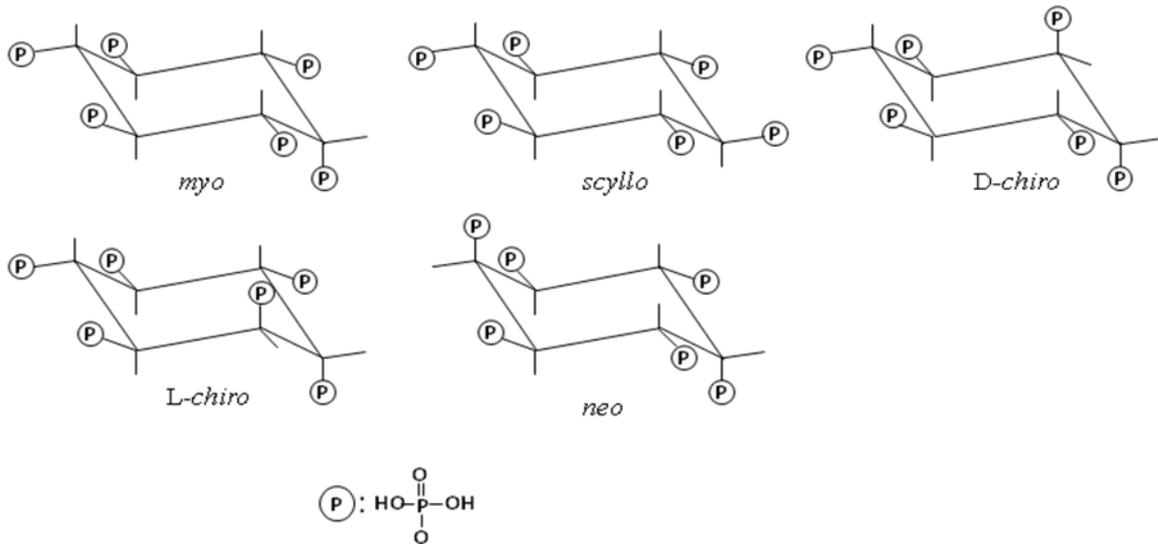
Les polyphosphates ont largement été identifiés dans les plantes d'ordre inférieur mais occasionnellement identifiés dans les feuilles d'épinard, les racines de maïs et dans les cuscutes (Bieleski, 1973; Tewari and Singh, 1964). Ils sont présents en quantité relativement faible dans les plantes d'ordre supérieur (1 à 4% du P total). Ils ont été identifiés dans les hyphes de champignons mycorhiziens sous forme granulaire (Solaiman et al., 1999).

### 1.2.2. Phosphates d'inositol

Les phosphates d'inositol sont synthétisés dans les écosystèmes par les plantes et sont fortement complexés dans le sol où ils s'accumulent pour former le groupe dominant des Po. Ainsi, ils présentent un intérêt important en terme de disponibilité pour les plantes (Hayes et al., 2000a). Le phosphate inorganique (Pi) est obtenu à partir des phosphates d'inositol par l'action de l'enzyme phytase. Le rôle des phosphates d'inositol dans le domaine biomédical et de la chimie alimentaire est bien compris et bien documenté, mais il existe encore des incompréhensions sur leur origine, leur forme chimique, leur biodisponibilité et leur mobilité dans l'environnement (Turner et al., 2002).

#### 1.2.2.1. Stéréo-isomères des phosphates d'inositol

Les phosphates d'inositol de formule brute  $C_6H_{18}O_{24}P_6$  existent sous plusieurs formes stéréo-isomères basées sur des stéréo-isomères de l'inositol (hexahydroxycyclohexane) : myo-, neo-, scyllo-, D-chiro-, L-chiro-, (**Figure I-3**). Le plus dominant des stéréo-isomères dans la nature est le myo-inositol hexakisphosphate appelé sous différents noms : « acide phytique » est le nom alternatif pour la forme libre acide, tandis que « phytate » se réfère au sel de l'acide phytique (Turner et al., 2002). La présence des formes D-chiro et myo a été établie dans les semences, les feuilles et les sols, prouvant ainsi une relation entre les phosphates d'inositol du sol et ceux de la plante (Brinch-Pedersen et al., 2002; L'Annunziata and Fuller, 1971; L'Annunziata et al., 1972). Les formes neo-, scyllo- et D-chiro sont présentes dans l'environnement terrestre et aquatique, et sont synthétisées par des microorganismes du sol (Cosgrove, 1980). Des études ont montré que les stéréo-isomères myo, scyllo-, D-chiro et neo- sont présents dans plusieurs types de sol à travers le monde dans des proportions similaires (Anderson and Malcolm, 1974; Turner et al., 2002). Ils sont généralement dans l'ordre suivant : myo > scyllo > D-chiro > neo, représentant respectivement jusqu'à 90%, entre 20 et 50%, environ 10% et environ 1% des phosphates d'inositol (McKercher and Anderson, 1968). Cependant une étude plus récente indique que la forme neo représente environ 7% des phosphates d'inositol dans un sol non cultivé du Sud-Est de l'Australie (Irving and Cosgrove, 1982).



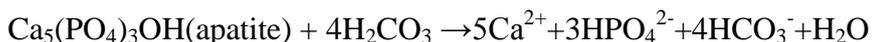
**Figure I-3:** Conformations des stéréo-isomères de l'hexaphosphate d'inositol (Cosgrove, 1980)

### 1.2.2.2. Phytate

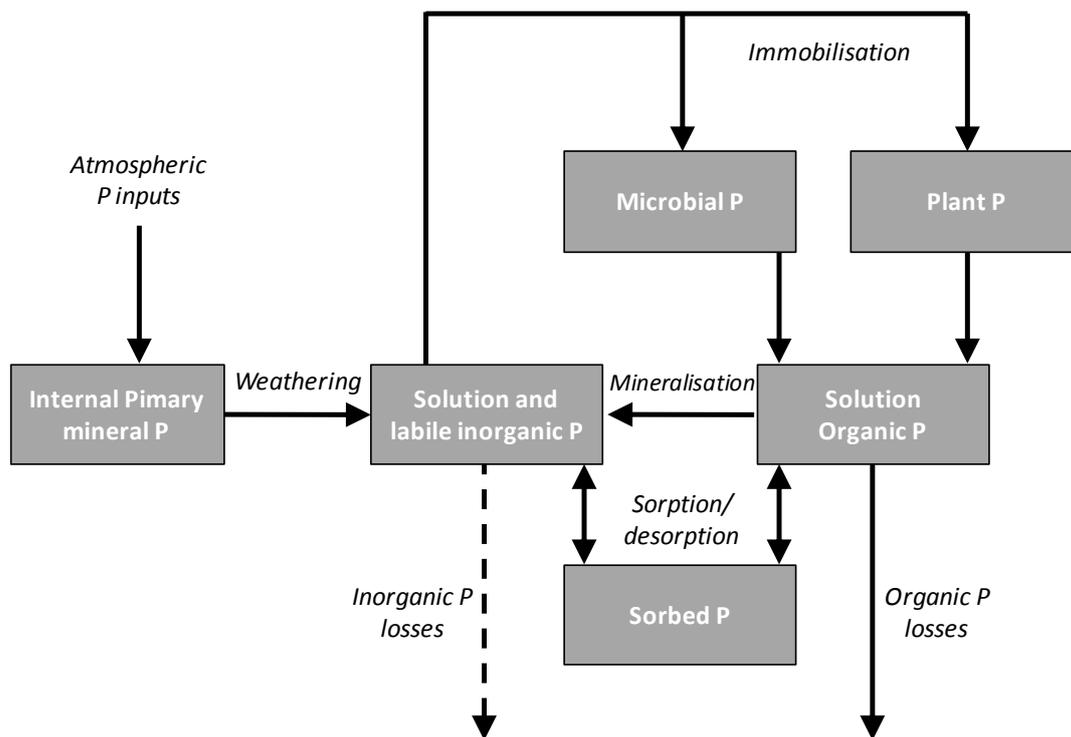
Le phytate est la forme de sel de l'acide phytique qui est le *myo*-inositol hexakisphosphate. Il est le phosphate d'inositol le plus important dans les sols (Dalal, 1977) à cause de sa stabilité chimique (Turner et al., 2002). Ce composé est présent dans la plupart des plantes et constitue le principal composant du stock de phosphore dans les graines des plantes (Brinch-Pedersen et al., 2002). Il s'adsorbe fortement à la surface des oxydes de fer (De Groot and Golterman, 1993) et des argiles, ce qui le rend indisponible pour les plantes (Greaves and Webley, 1969). Les complexes qu'il forme avec Fe, Al, Ca et les argiles ont une solubilité dépendant du pH, avec une plus grande stabilité aux pH < 5 et > 7,5 (Turner et al., 2002), et qui est régulée par le type de cation dans le sol (Celi et al., 2001).

## 1.3. Le cycle du phosphore dans le sol

Le cycle du phosphore se déroule exclusivement dans la biosphère. Il provient quasi totalement de l'altération de la roche mère et peut provenir parfois des intrants atmosphériques (sous forme de poussière) dans le cas de certains sols de désert (Neff et al., 2006). La **Figure I-4** résume le cycle du P dans les sols tropicaux. Aux premiers stades du développement du sol, la majorité du P est sous forme de minéral primaire (principalement les apatites de calcium) qui par des processus d'altération se dissout lentement suivant la réaction :



Les plantes et les microorganismes prélèvent le P produit dans la solution de sol pour la production de leur biomasse. Le P retourne au sol sous forme organique (Po) lorsque les plantes ou les microorganismes meurent. Les phosphatases produites par les plantes et les microorganismes catalysent la transformation du Po en Pi (Reed et al., 2011).



**Figure I-4:** Modèle conceptuel du cycle du P dans les sols tropicaux (Reed et al., 2011)

Le Po peut être aussi minéralisé en Pi suivant des transformations abiotiques telles que les réactions de photolyse et d'hydrolyse (Baldwin et al., 2005). La mobilité du Pi et du Po est affectée à cause de leur forte réaction avec les minéraux des sols, notamment les oxydes de Fe, d'Al et les minéraux argileux des sols tropicaux. Le P adsorbé peut être désorbé (solubilisé) par des acides organiques sécrétés par des organismes dans le sol (George et al., 2004; Hayes et al., 2000b). L'accumulation du P est limitée dans les écosystèmes à cause des pertes qui se produisent par drainage vers les ruisseaux. Malgré la forte capacité des sols tropicaux à retenir le phosphore, la combinaison de certains facteurs dont les conditions hydrologiques, les propriétés du sol, l'âge de la roche mère et la topographie peuvent conduire à une perte du phosphore des forêts tropicales (Reed et al., 2011).

## 2. La nutrition phosphatée chez les plantes

### 2.1. Importance du phosphore pour les plantes

Le phosphore est un nutriment important pour les plantes et constitue environ 0,2 % de la masse sèche de la plante. Le phosphore est une partie intégrante du métabolisme énergétique, un constituant des acides nucléiques et des membranes cellulaires chez les plantes. Par conséquent les plantes ne peuvent pas se développer sans un bon approvisionnement de ce nutriment (Schachtman et al., 1998). Les phosphates agissent généralement comme des vecteurs d'énergie dans plusieurs processus métaboliques. Les phospholipides jouent un rôle important dans la fonction et la rigidité des membranes. Les principaux processus biochimiques tels que la photosynthèse et la respiration sont activés par

le Pi ou ses dérivés organiques (Raghothama and Karthikeyan, 2005). Le symptôme typique du manque de P chez la plante est le changement graduel de la coloration du feuillage, allant du vert foncé chez les feuilles plus jeunes au pourpre chez les feuilles plus vieilles. La déficience de P induit aussi une réduction de la croissance, de la taille et du nombre de fleurs et de graines et réduit une grande partie de la productivité des plantes (Sanchez-Calderon et al., 2010).

## 2.2. Stratégie des plantes pour la nutrition phosphatée

La très faible disponibilité du phosphore dans la rhizosphère fait donc de lui le facteur limitant majeur de la croissance dans plusieurs écosystèmes (Barber et al., 1963). Ainsi, la faible quantité de Pi dans plusieurs sols pousse les plantes à développer des mécanismes pour l'acquisition des éléments nutritifs. Parmi ces mécanismes, on note (i) la modification de la morphologie du système racinaire, (ii) les transporteurs de Pi, (iii) la sécrétion des exsudats racinaires, (iv) les phosphatases intra et extracellulaires (v) la formation de symbiose mycorhizienne avec des champignons.

### 2.2.1. Modification de la morphologie du système racinaire

Les stratégies mises en œuvre par les plantes pour l'acquisition de Pi peuvent se démontrer par la modification de la morphologie et la prolifération des racines qui poussent plus dans des conditions de carence en Pi (Raghothama and Karthikeyan, 2005). Les facteurs associés aux racines tels que la morphologie des racines, l'architecture, la densité et la longueur des poils racinaires, le taux d'absorption des éléments nutritifs, la capacité à modifier la rhizosphère et la symbiose mycorhizienne peuvent fortement influencer sur l'acquisition de Pi (Raghothama, 1999). De nets changements dans la croissance et l'architecture des racines sont observés en cas de déficit de Pi (Wyss et al., 1999). Les plantes peuvent aussi concurrencer les microorganismes dans l'acquisition de Pi sous des conditions de carence en Pi.

### 2.2.2. Les transporteurs de phosphore inorganique

Les transporteurs de Pi ont été identifiés chez plusieurs espèces végétales telles que *Arabidopsis thaliana* (Smith et al., 1997), *Solanum tuberosum* (Rausch et al., 2001), *Lycopersicon esculentum* (Liu et al., 1998b), *Medicago truncatula* (Liu et al., 1998c) et *Oryza sativa* (Paszkowski et al., 2002). Ce sont des protéines qui se trouvent dans la membrane plasmique et sont responsables de l'absorption du Pi circulant dans la solution du sol. Ils interviennent dans l'absorption du P au niveau de l'interface racine/sol. La carence en phosphore provoque une augmentation de leur production chez les plantes (Paszkowski et al., 2002).

### 2.2.3. Les exsudats racinaires

Les exsudats racinaires, qui constituent un mélange de composés organiques et inorganiques complexes pouvant agir sur la disponibilité des éléments minéraux en solution, sont majoritairement des acides organiques ou ligands (citrique, malonique, oxalique, formique etc.), des enzymes, des ions inorganiques, des molécules gazeuses (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) et mineurement des métabolites comme les sucres, les vitamines, ou les acides aminés (Dakora and Phillips, 2002; Jones, 1998). Ils ont deux fonctions dans la mobilisation des éléments minéraux: soit mobiliser les éléments directement des constituants du sol (enzyme, anions organiques) soit modifier le pH du sol (ions inorganiques) pour augmenter leur mobilité chimique (Dakora and Phillips, 2002; Hinsinger, 2001).

### 2.2.4. Phosphatases intra et extracellulaires de plantes

Sous des conditions de déficience en Pi, les plantes sont capables de :

- sécréter des phosphatases acides extracellulaires pour mobiliser le Pi à partir du sol.
- ou de remobiliser et de recycler du Pi à partir des phosphomonoesters et anhydrides de leur cellule par leur phosphatases intracellulaires (Tran et al., 2010)

La régulation de l'activité des phosphatases intra et extracellulaires des plantes a longtemps été reconnue comme étant une caractéristique biochimique des plantes privées de Pi dans leur nutrition (Duff et al., 1994).

### 2.2.5. Symbiose mycorhizienne

En réponse à la persistance de la déficience en Pi dans le sol plusieurs plantes ont développé une relation symbiotique avec les champignons mycorhiziens. Les racines fines des plantes forment une association intime (appelée mycorhize) avec les hyphes des champignons. Dans cette symbiose, la plante fournit au champignon du carbone essentiellement sous forme de sucres élaborés par la photosynthèse et en retour le champignon fournit à la plante de l'eau et des éléments minéraux, notamment le phosphore (Smith and Read, 2008). Parmi les groupes de mycorhizes qui existent, on distingue les ectomycorhizes et les endomycorhizes. Dans les ectomycorhizes, les filaments mycéliens des champignons viennent s'agglomérer autour de la racine pour former un manchon mycélien appelé manteau fongique (Peterson and Bonfante, 1994). Les endomycorhizes se caractérisent par la pénétration profonde des filaments mycéliens dans la cellule du cortex racinaires des plantes hôtes.

## 3. Les phosphatases

### 3.1. Classification des phosphatases

### 3.1.1. Selon le pH optimal

L'activité enzymatique des phosphatases dans le sol est beaucoup influencée par certains facteurs dont le pH. L'efficacité de l'action catalytique des phosphatases dépend du pH, de leur milieu mais aussi de leur nature acide ou alcaline. Selon le pH optimal de leur activité enzymatique, les phosphatases sont dites acides (pH optimal <7) ou alcalines (pH optimal >7). Bien que dominées dans les sols par les phosphatases acides et alcalines, des phosphatases avec un pH optimal autour de 7 ont été identifiées (Turner, 2010).

#### 3.1.1.1. Les phosphatases acides

La plupart des phosphatases acides ont un pH optimal d'activité compris entre 4 et 6. Turner (2010) a observé par exemple que le pH optimal de certaines phosphomonoestérases était compris entre 4,5 et 6,5 en utilisant comme substrat le para-NitroPhenyl Phosphate (pNPP), et entre 4 et 6,5 en utilisant le MethylUmbelliferyl Phosphate (MUP). Certaines phosphatases acides ont la particularité de présenter plusieurs pics d'activité en fonction du pH. C'est le cas de la phosphatase acide identifiée chez le champignon *Lactarius* sp, avec deux pics d'activité à pH 4,5 et 5,5 (Antibus et al., 1992). Il y a aussi l'exemple des phytases sécrétées par le champignon *Aspergillus niger* qui présentent également deux valeurs de pH optimal d'activité aux valeurs 2,5 et 5,0 (Wyss et al., 1999). Les phosphatases acides, exceptées celles de bactéries, sont principalement sous forme extracellulaires (Antibus et al., 1986; Matumoto-Pintro, 1996) sécrétées par des plantes ou des microorganismes dans le sol. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (AM) possèdent des phosphatases acides dans les arbuscules matures, dans les hyphes intraradicales et dans les points d'entrée des hyphes (Joner et al., 2000).

#### 3.1.1.2. Les phosphatases alcalines

Le pH optimal des phosphatases alcalines est par définition supérieur à 7 et se situe le plus souvent entre les valeurs 8 et 10, bien qu'il puisse être parfois entre 9,5 et 11,5 pour certaines phosphomonoestérases alcalines (Turner, 2010). Les phosphatases alcalines prédominent dans les sols alcalins dont le pH est proche du pH alcalins de ces phosphatases. Dans les champignons mycorhiziens à arbuscules (AM), les phosphatases alcalines sont principalement présentes dans les vacuoles des cellules, mais aussi dans les arbuscules (Joner et al., 2000). Parmi les phosphatases alcalines, il y a des phosphatases spécifiques telles que les fructose bisphosphatases et les sucrose phosphatases (Turner, 2010).

### 3.1.2. Selon le substrat

Les phosphatases du sol sont aussi classées en fonction de leurs propriétés catalytiques, c'est-à-dire en fonction de la forme chimique de leurs substrats et des liaisons chimiques qu'elles attaquent (Burns, 1982; Duff et al., 1994). Les phosphatases sont des hydrolases au sein desquels on distingue des phosphomonoestérases, des phosphodiesterases, et d'autres hydrolases :

### 3.1.2.1. *Phosphomonoesterase*

Ces phosphatases catalysent la réaction d'hydrolyse d'un phosphomonoester et permettent de libérer de l'orthophosphate (Pi) dans le sol. Leur rôle consiste à faciliter la scission de la liaison ester entre le radical organique et orthophosphate. Ces phosphatases du sol sont composées de phosphatases non spécifiques dont les phosphatases acides (EC 3.1.3.2) et alcalines (EC 3.1.3.1), mais aussi de phytases (EC 3.1.3.8 et EC 3.1.3.26) qui hydrolysent spécifiquement les phytates (Oh et al., 2004; Wyss et al., 1999). Le phytate est largement répandu dans l'environnement naturel, et les enzymes qui les hydrolysent (phytases) constituent un groupe très important des phosphatases du sol, c'est pourquoi nous leur avons consacré un paragraphe entier (voir paragraphe 1.2.2.2.).

### 3.1.2.2. *Phosphodiésterase*

Elles désignent des phosphatases qui catalysent l'hydrolyse d'un composé phosphodiester pour donner un composé phosphomonoester et un radical organique. Certaines phosphatases catalysent à la fois l'hydrolyse des phosphomonoesters et des phosphodiesters (Bernard et al., 2002; Yoshida et al., 1989), se démarquant ainsi des phosphatases qui, en règle, ne peuvent hydrolyser qu'un seul type d'ester de phosphate. Le groupe des phosphodiesterases comprend plusieurs sous groupes dont les phospholipases qui hydrolysent les phospholipides et les nucléases qui hydrolysent les acides nucléiques. On note aussi des subdivisions dans les phospholipides selon le type de phospholipide hydrolysé. Les nucléases spécifiques tels que les exonucléases et les endonucléases agissent sur les chaînes polynucléotidiques d'ARN et d'ADN.

### 3.1.2.3. *Autres hydrolases*

Parmi les phosphatases du sol qui ne sont pas classées dans le groupe des estérases (hydrolyse des liaisons esters), on trouve des polyphosphatases (EC 3.6.1) qui hydrolysent les phosphoanhydrides, scindant la liaison entre deux phosphates. On note également dans le groupe des hydrolases les phosphatases (EC 3.11) qui agissent sur la liaison C-P des phosphonates.

### 3.1.3. Les phytases

Les phytases constituent une classe particulière des phosphomonoestérases qui catalysent l'hydrolyse des phytates en orthophosphate (Pi) (Wyss et al., 1999). L'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) et l'Union Internationale de Biochimie (IUB) ont déterminé deux types de phytases (Oh et al., 2004): la 3-phytase (EC 3.1.3.8) et la 6-phytase (EC 3.1.3.26). La 3-phytase ou encore *myo*-inositol hexakisphosphate-3-phosphohydrolase hydrolyse la liaison ester située à la troisième position du phosphate *myo*-inositol. La 6-phytase hydrolyse la liaison ester située à la sixième position du phosphate *myo*-inositol. La réaction d'hydrolyse qu'elles catalysent produit un orthophosphate et un noyau d'inositol avec cinq liaisons ester de phosphate (Vats and Banerjee, 2004). Les phytases sont des enzymes dont la masse moléculaire peut varier de 35 à 700 kDa selon leurs origines. Leur

température optimale de fonctionnement est élevée et dépend aussi de leur origine. Elle est estimée être entre 45 et 60°C pour diverses phytases de bactéries, de champignons, de levures, de plantes et d'animaux (Liu et al., 1998a), bien que des auteurs aient trouvé des températures optimales plus élevées (77°C pour la phytase de la levure *Schwanniomyces castellii* (Segueilha et al., 1992).

### 3.2. Origine des phosphatases dans les sols

#### 3.2.1. Les phosphatases fongiques

Les champignons des symbioses mycorhiziennes ont un effet bénéfique sur la nutrition phosphatée des plantes hôtes dont elles stimulent la croissance par divers mécanismes dont la sécrétion de phosphatases qui dégradent les phosphates organiques en Pi (Joner et al., 2000; Matumoto-Pintro, 1996; Quiquampoix and Mousain, 2005). Beaucoup de champignons du sol produisent des phosphatases sous forme d'enzymes intracellulaires et extracellulaires. Tarafdar et Marschner (1994) ont étudié l'activité des phosphatases de champignons dans la rhizosphère du blé mycorhizé et non mycorhizé. Ils ont trouvé une forte corrélation entre l'activité phosphatasique et la longueur des hyphes de champignons autour des racines du blé mycorrhizé. Ils ont conclu que les champignons ont produit des phosphatases qui ont permis une utilisation plus efficace du phosphore organique. Les champignons ectomycorhiziens tels que *Aspergillus fumigatus* (Tarafdar et al., 1988) et *Hebeloma cylindrosporum* (Matumoto-Pintro, 1996) sont connus pour leur forte capacité à produire des phosphatases.

#### 3.2.2. Les phosphatases bactériennes

Les phosphatases dans le sol peuvent être produites par un certain nombre d'espèces de bactéries, surtout celles qui sont associées aux plantes dans la rhizosphère (Rodríguez and Fraga, 1999). Ces bactéries exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes par des mécanismes dont la production d'enzymes pour la minéralisation du Po. Par conséquent, leur utilisation comme des biofertilisants et agents de contrôle pour l'amélioration des cultures a été l'objet de recherches (Glick, 1995; Lemanceau, 1992). On trouve parmi ces bactéries nommées "plant growth promoting rhizobacteria" (PGPR) par Kloepper et Schroth (1978) des souches de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Rodríguez and Fraga, 1999). Le rôle des bactéries dans l'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes a fait l'objet de nombreuses controverses. Certains auteurs ont trouvé que la quantité de phosphates solubilisés sous l'action des bactéries est négligeable par rapport à l'augmentation de rendement observée au champ (Rodríguez and Fraga, 1999). D'autres auteurs ont même montré que des plantes, cultivées en sol stérile, prélèvent plus de phosphates et présentent un poids supérieur à celles cultivées en sol non stérile (Benians and Barber, 1974). Cependant la présence de bactéries minéralisatrices de Po du sol a été observée dans la rhizosphère de certaines plantes (Abdalla, 1994; Bishop et al., 1994). A l'heure actuelle, il existe des preuves appuyant la contribution fondamentale des bactéries à

l'amélioration des performances de croissance des végétaux par la solubilisation du phosphate et la minéralisation du Po (Rodríguez and Fraga, 1999). Des exemples de bactéries du sol capables de produire des enzymes pour hydrolyser plusieurs formes de Po sont donnés dans le **Tableau I-5**.

**Tableau I-5:** Exemples d'enzymes de bactérie de sol hydrolysant les substrats organiques (Rodríguez and Fraga, 1999)

Souches de bactérie	Substrat	Type d'enzyme
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Pseudomonas</i> sp.	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Burkholderia cepacia</i>	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Enterobacter cloacae</i>	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Citrobacter freundii</i>	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Proteus mirabilis</i>	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Serratia marcescens</i>	Non-spécifique	Phosphatase acide
<i>Bacillus subtilis</i>	Phosphate d'Inositol	Phytase
<i>Pseudomonas putida</i>	Phosphate d'Inositol	Phytase
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Phosphate d'Inositol	Phytase
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Phosphonoacétate	Phosphonoacetate hydrolase
<i>Bacillus licheniformis</i>	D- $\alpha$ -glycerophosphate	D- $\alpha$ -glycerophosphatase
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Phosphonates	C-P Lyase

### 3.2.3. Les phosphatases racinaires

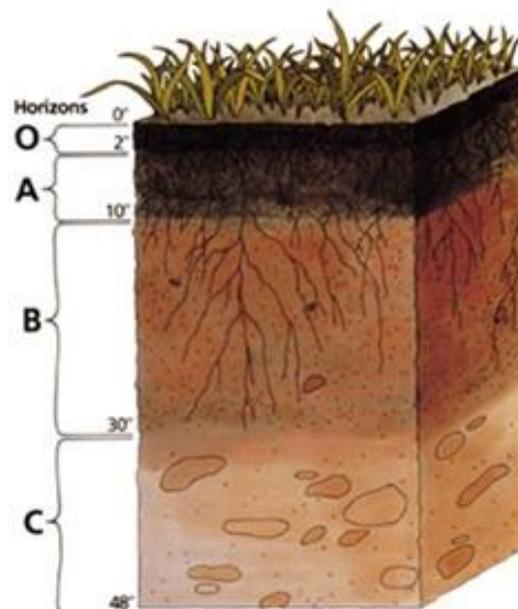
Une corrélation positive a été trouvée entre l'activité des phosphatases autour des racines de plantes et la distribution et la biomasse des systèmes racinaires (Harrison, 1987). En effet, face à la faible disponibilité du Pi dans les sols, certaines plantes sécrètent par les racines des phosphatases acides pour hydrolyser le Po autour de ces racines (Duff et al., 1994). Des études biochimiques et moléculaires suggèrent fortement que la sécrétion des phosphatases acides constitue une partie intégrante des mécanismes de réponse des plantes à la faible disponibilité en P des sols comme mentionné au paragraphe 2.2.4.

#### 4. Le sol

Représentant la couche superficielle de la croûte terrestre, le sol est le milieu de développement des végétaux et la base de la vie des animaux et des hommes. Schoerer définit le sol comme étant le produit de la transformation, sur une très longue période, de substances minérales et organiques à la surface de la terre, sous l'influence de facteurs environnementaux et ayant une organisation et une morphologie définies (Schroeder, 1984).

Le profil du sol est composé d'une série d'horizons plus ou moins parallèles à la surface du sol. Les pédologues distinguent par des lettres ces horizons (**Figure I-5**) dont les trois horizons majeurs sont A (arable), B (sous sol) et C (roche mère). On distingue pour certains sols l'horizon O (litière), mais cet horizon peut être enfoui dans l'horizon A. C'est l'horizon de surface qui est formée de débris d'animaux et végétaux récemment tombés ou en début de décomposition. L'horizon A est composé à la fois de matière organique et minérale et renferme la majorité de la vie animale et végétale du sol. L'horizon B, qui contient peu de matière organique, mais plusieurs substances nutritives provenant de la couche arable, est l'horizon où plongent les racines des plantes. L'horizon C est constitué de la roche mère qui subi une modification due à l'érosion et la désagrégation (Arbestain et al., 2008) qui permet le développement des couches qui la surmontent.

La zone du sol, directement formée et influencée par les racines des plantes et les microorganismes associés, est la rhizosphère. C'est un lieu d'intenses échanges entre le végétal et le substrat minéral.



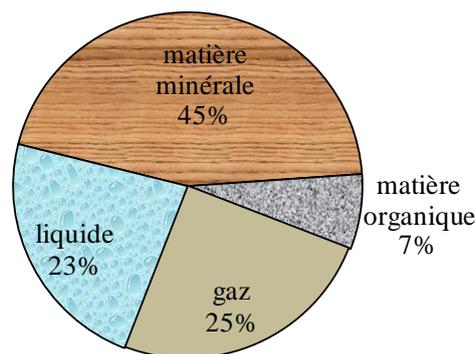
**Figure I-5:** Exemple de profil du sol (<http://soils.usda.gov/education/resources/lessons/profile/>)

#### 4.1. Composants du sol

Le sol est un mélange variable de substances solides, gazeuses et liquides formant un système à trois phases. Selon Arbestain et al., (2008) le sol est principalement composé en quantité variable de :

- substances inorganiques, cristallines ou amorphes, particulièrement les aluminosilicates, les oxydes de fer et les carbonates ;
- matière organique des organismes vivants et morts ;
- solution aqueuse de complexes inorganique et organique, d'ions et de molécules ;
- une phase gazeuse contenant les composants usuels de l'atmosphère terrestre.

Les proportions des composants principaux varient selon les caractéristiques du sol. La **Figure I-6** nous donne l'exemple de la composition d'un sol de prairie (Schroeder, 1984). La phase minérale (Dixon and Schulze, 2002) des sols est généralement séparée en trois fractions selon la taille des particules : les particules dont le diamètre est inférieur à 2  $\mu\text{m}$ , compris entre 2 et 50  $\mu\text{m}$ , et supérieur à 50  $\mu\text{m}$  constituent respectivement les fractions argileuses, limoneuses et sableuses (voir paragraphe 4.2.1). Plusieurs réactions chimiques importantes se déroulent sur la fraction argileuse à cause de sa grande surface spécifique, ses charges de surface et à ses propriétés d'adsorption. Les principaux composants de cette fraction sont les phyllosilicates et les oxydes de fer (goethite, hématite et ferrihydrite), de manganèse (birnessite), d'aluminium (gibbsite) et de silicium (allophane et immogolite) (Loeppert, 2008). Les phyllosilicates et les oxydes de fer et d'aluminium sont plus détaillés dans le paragraphe suivant à cause de leur rôle dans notre étude. Les fractions limoneuses et sableuses, quant à elles, contiennent des minéraux tels que le quartz, le feldspath, le mica, la calcite et le gypse.



**Figure I-6:** Composition d'un sol de prairie (% en volume)

La phase organique des sols provient des plantes, des animaux, de la biomasse microbienne et de l'action de l'homme par l'utilisation des pesticides, des hydrocarbures, des plastiques et d'autres produits industriels (Loeppert, 2008). La composition de la matière organique dans le sol comprend la biomasse du vivant (plantes et animaux), les simples

molécules organiques (telles que les acides organiques, acides aminés et les carbohydrates) et les complexes de polymères (acides humiques et fulviques) résultant de la décomposition des plantes et des animaux morts (Stevenson, 1994). Plus de détails sont donnés sur la matière organique des sols dans le paragraphe 4.1.2.

La phase liquide contient les composants organiques et inorganiques (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, orthophosphate) dissous et constitue la source immédiate des éléments nutritifs des plantes. Les molécules d'eau dans le sol sont retenues par adsorption sur des particules du sol et dans les pores ayant un diamètre inférieur à 10µm (Schroeder, 1984). La concentration des composés organiques dissous et inorganiques complexés par les composants organiques dans les solutions de sol peut être plus élevée aux alentours des racines des plantes (rhizosphère) à cause de l'exsudation de composés organiques par les racines des plantes (Loeppert, 2008). La composition de l'air (phase gazeuse) dans le sol diffère de celle de l'atmosphère à cause de la respiration des racines des plantes, qui consomment l'oxygène O<sub>2</sub> et produisent le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>. La concentration de O<sub>2</sub> est plus faible, et celle de CO<sub>2</sub> est plus élevée, dans l'air du sol comparé à l'air de l'atmosphère. L'échange de gaz entre le sol et l'atmosphère se fait essentiellement par diffusion, et est causée par la différence de pression partielle de O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> entre le sol et l'atmosphère. Dans l'atmosphère, la pression partielle de O<sub>2</sub> est plus élevée et celle de CO<sub>2</sub> moins élevée, donc l'oxygène pénètre dans le sol et le dioxyde de carbone en sort (Schroeder, 1984): c'est la respiration du sol. Les phases liquides et gazeuses occupent les espaces des pores non occupés par la phase solide (minérale et organique).

#### 4.1.1. Composition minérale

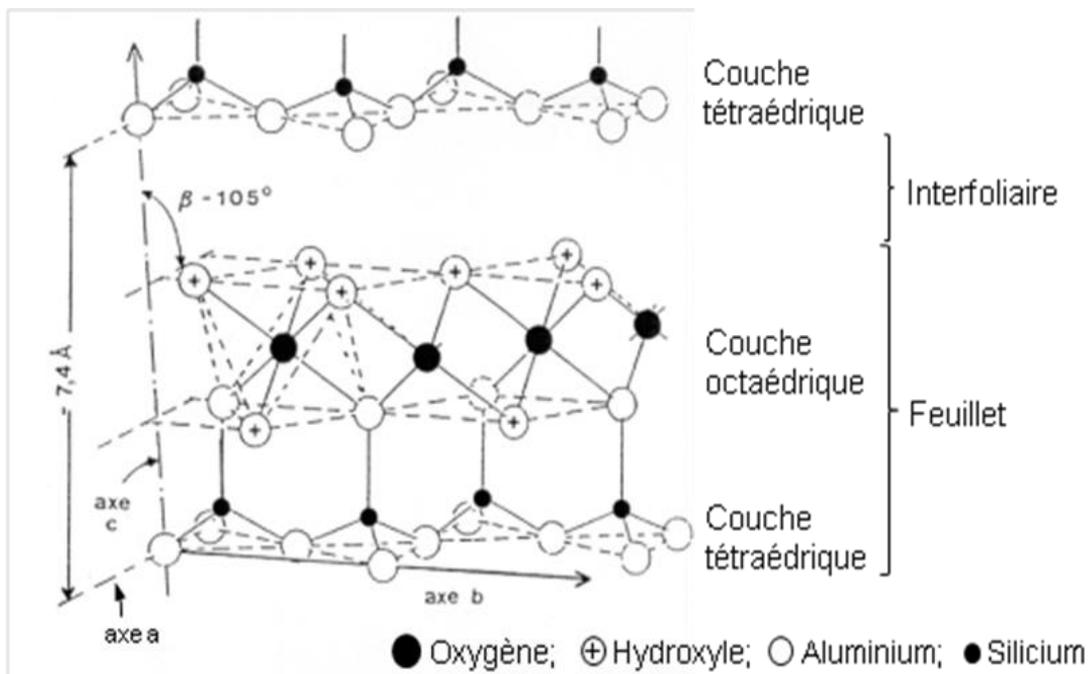
##### 4.1.1.1. Les phyllosilicates

Les phyllosilicates constituent le groupe le plus important des minéraux argileux cristallisés et font partie des minéraux silicatés. Les phyllosilicates sont constitués d'un empilement de feuillets séparés par des espaces interfoliaires. Les feuillets sont formés par la superposition de couches tétraédriques (T) et octaédrique (O). Les couches tétraédriques (T) sont composées de tétraèdres de SiO<sub>4</sub> liés entre eux par trois de leurs quatre sommets (ion O<sup>2-</sup>) pour former un feuillet avec un réseau pseudo-hexagonal dans le plan cristallographique *ab* (Olson et al., 2000). Le quatrième sommet (O<sup>2-</sup> apical) du tétraèdre est relié à une couche octaédrique dont les octaèdres sont formés au centre par différents cations (Al<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, etc.) et aux sommets par les anions O<sup>2-</sup> et OH<sup>-</sup> (**Figure I-7**). Selon l'organisation et le nombre de couches, on distingue dans les phyllosilicates, les minéraux de type 1:1 (ou T-O) et 2:1 (ou T-O-T). Parmi les minéraux argileux de type 1:1 on peut citer la kaolinite et l'halloysite.

Il y a souvent des substitutions isomorphiques correspondant au remplacement de Si<sup>4+</sup> par Al<sup>3+</sup> et Fe<sup>3+</sup> dans les tétraèdres et au remplacement de Al<sup>3+</sup> par Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup> ou de Fe<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> par Li<sup>+</sup> dans les octaèdres. Ces substitutions de cations par des cations de valence plus faible créent un déficit de charge qui peut être compensé par les cations localisés

dans l'espace interfoliaire ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ). Ce déficit de charge causé par les substitutions confère aux argiles des charges négatives sur les faces basales des feuillets, qui sont des charges permanentes ou structurelles. Des charges variables, dépendantes du pH peuvent se formées, soit aux extrémités des feuillets (atomes d'oxygène), soit sur les surfaces extérieures plates (groupements OH des feuillets) des argiles (Sposito, 1984). Ces charges électriques se manifestent essentiellement lors de l'ionisation des groupes fonctionnels des particules d'argile, lorsque l'argile est en suspension dans l'eau.

Il existe aussi d'autres minéraux argileux cristallisés, les minéraux interstratifiés, caractérisés par le type d'empilement des feuillets (ordre ou désordre de la succession) et les minéraux à pseudo-feuillets et à faciès fibreux.



**Figure I-7:** Notion de feuillets, couches T et O pour un minéral de type 1:1 (Traoré, 2003)

#### 4.1.1.2. Les oxydes, oxyhydroxydes et les hydroxydes.

Ces minéraux dont les composés de fer, d'aluminium et de manganèse sont les plus fréquents, se trouvent dans de nombreux sols. Désignés parfois par le thème sesquioxides, ces minéraux sont cristallisés et présents dans la fraction inférieure à 2  $\mu m$  des sols (Calvet, 2003). Les composés du fer et d'aluminium les plus répandus sont la goéthite ( $\alpha-FeOOH$ ), l'hématite ( $\alpha-Fe_2O_3$ ) et la gibbsite ( $\gamma-Al(OH)_3$ ). Le groupement hydroxyle de ces composés et ceux des feuillets des minéraux argileux représentent le groupement fonctionnel le plus abondant et la surface la plus réactive des sols (Goldberg et al., 2000; Sposito, 1984). Le groupement hydroxyle dans la plupart des oxydes minérales est amphotère, présentant des charges positives à de faibles pH et des charges négatives à des pH élevés. Ils sont pour cela

mentionnés comme des minéraux à charges variables du sol. Les oxydes d'aluminium sont le produit d'altération des aluminosilicates et sont abondants dans les sols tropicaux. La goethite est l'hydroxyde de fer le plus stable et le plus commun dans les sols tempérés, subtropicaux et tropicaux. Les oxy/hydroxydes de fer et d'aluminium jouent un rôle important dans l'adsorption des ions, la stabilisation des agrégats et la floculation des particules du sol (Goldberg et al., 2000).

#### 4.1.2. Composition organique

La matière organique du sol est la somme de tous les composants organiques vivants, morts ou en stade de décomposition qu'on trouve dans le sol. Selon Saiz-Jimenez (1996), la matière organique du sol peut être classée en substances humiques et substances non humiques. Les substances non humiques comprennent les substances dont les caractéristiques chimiques sont reconnaissables tels que les polysaccharides, protéines, acides nucléiques, les lipides, etc. Les substances humiques sont, par contre, considérés comme le produit de transformation de substances dont ils ont perdu les caractéristiques chimiques. Cet auteur note, cependant, qu'en pratique il est difficile de distinguer ces types de matières organiques lorsqu'elles sont extraites du sol. Les substances humiques sont des macromolécules stables, résistant à la biodégradation, hétérogènes, physico-chimiquement actives qui représentent la plus grande partie de la matière organique du sol (Almendros, 2008). Ils sont distingués selon leur solubilité en acides humiques (soluble dans les solutions alcalines et non dans les solutions acides), acides fulviques (soluble dans les solutions acides et alcalines) et humines (insoluble dans les solutions acides et alcalines) (Duchaufour and Jacquin, 1975). Bien que n'étant pas essentielle pour la croissance et le développement des plantes, la matière organique du sol est bénéfique pour la production des cultures et la conservation des sols. Elle peut affecter la fertilité du sol indirectement à travers plusieurs mécanismes (Chen, 1996; Oertli, 2008) tels que:

- fournir aux racines des plantes des minéraux, notamment N, P, K et des micronutriments. La décomposition de la matière organique par les microorganismes libère les nutriments qui sont ensuite disponibles pour les plantes.
- améliorer la structure du sol. En effet la matière organique est un agent liant important à travers lequel les particules élémentaires du sol se joignent pour former de grands agrégats, ce qui améliore la porosité du sol, augmente le rapport eau-sol dans la rhizosphère, améliore l'aération et la pénétration des racines.
- augmente la population microbienne du sol y compris ceux qui sont bénéfiques pour les plantes. Plusieurs espèces de microorganismes interfèrent avec les espèces ravageuses et les agents pathogènes, ce qui est un aspect important de la fertilité du sol.

- augmenter la CEC et la capacité à tamponner le pH du sol. La matière organique est un échangeur d'ions aussi important que l'argile, et qui peut retenir une grande quantité de nutriments. Elle contient des sites d'échanges de cations (plus important) et d'anions.

Les substances humiques sont en majorité chargées négativement à cause de la présence des groupements carboxyles (COOH) et phénoliques (OH) (Pefferkorn, 1997). Ceci fait d'eux de potentiels sites d'adsorption aussi bien pour les ions que pour les protéines. Les substances humiques peuvent, par exemple, adsorber les enzymes par échange d'ion, liaison covalente ou liaison hydrogène (Nannipieri et al., 1996). Par contre, leur présence peut altérer sensiblement la capacité d'adsorption des colloïdes du sol (Huang et al., 2003). La matière organique a diverses structures avec des micropores où peuvent se loger les enzymes (Naidja et al., 2000). Elle a donc un effet protecteur sur les enzymes contre les microorganismes et les protéinases de gros poids moléculaire (George et al., 2005) grâce à ses micropores.

## 4.2. Caractéristiques physicochimiques

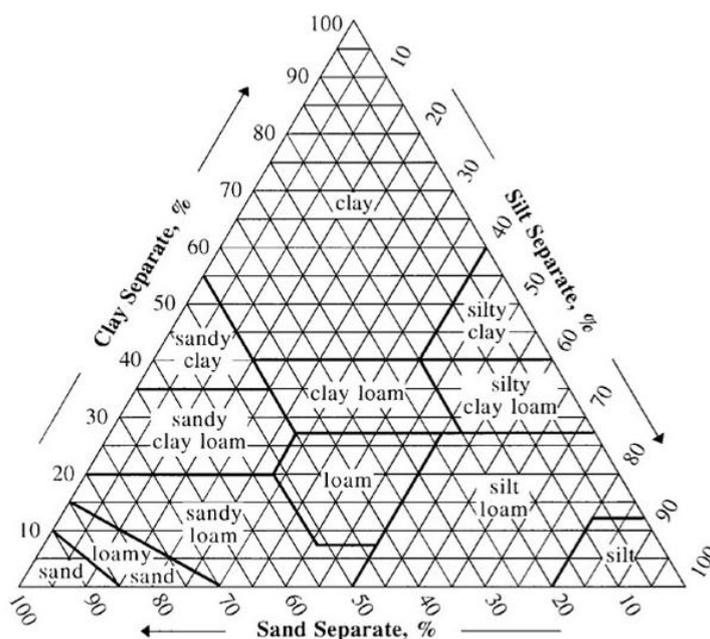
### 4.2.1. Taille des particules et texture du sol

La distribution statistique des tailles des particules du sol (granulométrie) permet de définir plusieurs propriétés physiques du sol dont la texture. La plupart des systèmes de classification des sols utilise la distribution des tailles des particules comme un critère (Steinhardt, 2008). La gamme des tailles des particules du sol est très large (des cailloux aux argiles fines) et les particules sont généralement classées par une échelle logarithmique. Les critères de cette classification varient selon les pays et les disciplines. Le **Tableau I-6** présente les critères de classification du système Français et celui du Département Américain d'Agronomie (USDA) basés sur le sol fin (< 2 mm de diamètre). Les différentes fractions des sols sont obtenues par tamisage et par sédimentation. La fraction sableuse et ses différentes fractions (fin, moyen, grossier, très grossier) sont séparées des fractions limoneuse et argileuse par tamisage. Les fractions limoneuse et argileuse sont séparées par sédimentation (Steinhardt, 2008). Cependant, le limon fin peut être séparé du limon grossier par tamisage à 20 µm (Barthès et al., 2008). Des prétraitements des échantillons de sols sont faits avant le fractionnement tel que la destruction de la matière organique et la dispersion des colloïdes par du métaphosphate de sodium (Steinhardt, 2008).

Le sol est un mélange de particules de différentes tailles et la proportion relative des fractions (sables, limon et argiles) permet de les décrire et définir leur texture. Plusieurs classes de texture sont proposées par différents pays. Les classes de texture proposées par l'USDA sont représentées par le triangle de la **Figure I-8**. Les classes de texture portent généralement le nom de la fraction dominante ou de la combinaison des fractions les plus dominantes. L'expression « loam » est utilisée pour la texture équilibrée avec une certaine proportion de sable, de limon et d'argile (Steinhardt, 2008).

**Tableau I-6:** Classification de la taille des particules dans le système USDA (<http://soils.usda.gov/technical/handbook/contents/part618.html>) et Français (Steinhardt, 2008)

Nom des classes	Taille (mm)	Taille (mm)
	USDA	France
argile, total	<0.002	<0.002
Limon, total	0.002-0.05	0.002-0.05
Limon fin	0.002-0.02	0.002-0.02
Limon grossier	0.02-0.05	0.02-0.05
Sable, total	0.05-2.00	0.05-2.00
sable très fin	0.05-0.10	
Sable fin	0.10-0.25	0.05-0.20
Sable moyen	0.25-0.50	
Sable grossier	0.50-1.00	0.20-2.00
Sable très grossier	1.00-2.00	



**Figure I-8:** Diagramme de classification texturale des sols (avec les particules < 2 mm) proposé par USDA (<http://soils.usda.gov/technical/aids/investigations/texture/>)

La teneur en eau, en air et en nutriment d'un sol est liée à sa texture, et peut donc déterminer sa fertilité. Par exemple, les sols sableux ont une bonne conductivité de l'eau, une faible capacité en eau, généralement peu de nutriment, une faible capacité d'adsorption, et ils sont bien aérés et faciles à travailler. En revanche, les sols argileux ont une forte capacité en eau, généralement une forte teneur en nutriment, une forte capacité d'adsorption, et sont faiblement drainés, faiblement aérés et difficiles à travailler (Schroeder, 1984).

#### 4.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

##### 4.2.2.1. Capacité d'échange de cation (CEC) du sol

La capacité d'échange cationique d'un sol, est la quantité de cations qu'il peut adsorber, exprimée en milliéquivalent par 100 grammes (meq /100 g) de sol ou en centimole de charge positive par kilogramme sachant qu'un cmole(+)/kg est égale à un meq/100g. Les sols sont capables de retenir de façon réversible des cations par les charges négatives de leurs minéraux argileux et de leurs substances organiques (Schroeder, 1984). Les cations, capables d'être échangés de façon réversible, existent surtout entre les couches internes mais aussi sur les surfaces externes des minéraux argileux. Les phyllosilicates montrent une préférence pour les cations, malgré le caractère réversible de leur adsorption, dans l'ordre décroissant suivant :  $Al^{3+} > Ba^{2+} > Ca^{2+} > K^+ > Mg^{2+} > Na^+ > Li^+$  (Loeppert, 2008).

La matière organique du sol, en particulier les substances humiques et fulviques qui ont une forte concentration des groupements carboxyle (COOH) et hydroxyle phénolique (OH) peuvent avoir des charges négatives en fonction du pH. Quand le pH augmente, les ions  $H^+$  se dissocient des groupements COOH et OH en créant des charges négatives et donc augmentent la capacité d'échange cationique de la matière organique (Schroeder, 1984). La capacité de la matière organique à fixer les cations métalliques décroît selon l'ordre approximatif suivant :  $Cu > Ni > Co > Zn > Fe > Mn > Ca > Mg$  (Stevenson, 1994). Des exemples de valeurs de CEC de sols et de constituants de sols sont dans le **Tableau I-7**.

**Tableau I-7:** (a) Exemples de CEC mesurées avec des argiles de sols d'Europe centrale (Schroeder, 1984). (b) valeurs représentatives de CEC mesurées avec des sols des Etats Unis à pH 7 (Sposito, 2000).

	CEC (cmol/kg)
Kaolinite	5-15a
Illite	20-50 a
Montmorillonite	80-120 a
Substances humiques	200-500 a
Oxisol	5 b
Vertisols	37 b
Histosols	140 b

Le sol peut aussi avoir une capacité d'échange anionique (CEA), à cause de ses charges positives sur les minéraux argileux, les hydroxydes et les substances organiques qui sont très faibles comparés aux charges négatives. La capacité d'échange anionique est donc moins importante dans le sol que la capacité d'échange cationique (Schroeder, 1984).

#### 4.2.2.2. Surface spécifique du sol

La surface spécifique d'un sol est la surface réelle par opposition à la surface apparente de ce sol. Elle tient compte de la surface de chacun de ses composants. Les contributions individuelles des composants minéraux et organiques d'un sol à sa surface spécifique peuvent se superposer ou s'annuler (Skopp, 2000). La surface spécifique est un facteur important dans la propriété d'adsorption d'un sol. Les matériaux amorphes et la matière organique d'un sol possèdent de grandes surfaces spécifiques comme indiqué dans le **Tableau I-8**, et peuvent influencer la valeur du sol entier. La surface spécifique du sol est aussi influencée par la distribution de la taille des particules et du type d'argile dominant dans le sol. La fraction argileuse ( $< 2 \mu\text{m}$ ) a une surface spécifique plus élevée que les fractions les plus grossières, et possède également une capacité d'adsorption plus élevée. La surface spécifique est une grandeur qui s'exprime en surface par unité de masse ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ), mais peut aussi s'exprimer en surface par unité de volume ( $\text{m}^2\text{m}^{-3}$ ).

**Tableau I-8:** Exemple de gamme de surfaces spécifiques de quelques argiles, composants et fraction de sol resumé par Skopp (2000)

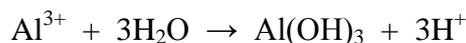
Composants organo-minérale et granulométrique des sols	Surface spécifique ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ )
Kaolinite	15-20
Illites	80-100
Montmorillonite	280-500
Matière organique	560-800
Oxydes de fer cristallins	116-184
Oxydes de fer amorphes	305-412
Sable	$<10$
Sable et limons (loams)	5-20
Argile (loams)	15-40
Argile	$>25$

#### 4.2.2.3. Le pH du sol

Le pH d'un sol caractérise son acidité (présence d'ions  $H^+$ ) ou sa basicité. Il définit la concentration d'ions  $H^+$  dans la phase liquide du sol. On mesure le pH du sol dans une suspension avec un certain rapport sol/eau ou dans une solution de sel (1 M KCl ou 0,01 M  $CaCl_2$ ) comme c'est souvent le cas dans les pays européens. En pratique, tous les sols ont un pH compris entre 3 et 9 avec des pH extrêmes rares de 2 et 11 (Oertli, 2008). On peut classer les sols selon leur acidité de la manière suivante:

- pH < 4,5 : sols très acides ;
- 4,5 < pH < 6 : sols acides ;
- 6 < pH < 7 : sols peu acide ;
- pH > 7 : sols alcalins.

Le pH est un facteur important qui influence tous les processus chimiques, physiques et biologiques dans le sol. Il est un indicateur de la fertilité du sol et sa connaissance est nécessaire pour comprendre la disponibilité des nutriments pour les plantes. Les ions  $H^+$  et  $Al^{3+}$  adsorbés sur les sites d'échanges cationiques sont de potentiels acidificateurs car lorsqu'ils sont libérés dans la solution, ils contribuent à acidifier le milieu. Les ions  $Al^{3+}$  contribuent à acidifier le sol à cause de la production d'ions  $H^+$  par sa réaction avec les molécules d'eau :



Le dioxyde de carbone, de l'air ou celui produit par la respiration des organismes du sol ou des racines dans la solution du sol, augmente l'acidité par la libération de protons :



Les substances humiques et fulviques (avec le groupement COOH), les fertilisants, et l'oxydation de composés inorganiques tels que le sulfure de fer (FeS) en acide sulfurique ou l'azote (N) en acide nitrique, contribuent à acidifier les sols (Oertli, 2008; Schroeder, 1984):

Dans les sols où le pH est supérieur à 7, les carbonates sont présents et leur concentration augmente avec le pH (Rowell, 1988). Les carbonates de calcium exercent une influence significative sur le pH du sol en la tamponnant. Quant aux sols alcalins, ils sont dominés par la présence des ions échangeables  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et  $Na^+$ . L'ion  $Al^{3+}$  est un tampon acidifiant qui peut contrôler le pH du sol et par conséquent peut influencer les charges des colloïdes du sol (Loeppert, 2008).

### 4.3. Les sols tropicaux

La définition (du point de vue thermique) de la zone tropicale est la zone où la température moyenne du mois le plus froid (moyenne mensuelle) ne descend jamais en-

dessous de 18°C. Les régions tropicales sont composées de différents climats, types de forêts et divers types de sols. Ces sols sont généralement considérés comme acides dont 36% sont dominés par des sols avec de faibles réserves de nutriments (Sanchez and Logan, 1992). Les sols des régions tropicales sont généralement altérés (lessivés). Parmi les douze sols qui définissent l'ordre d'altération des sols établi dans le système de classification des sols de l'USDA, onze proviennent des forêts tropicales (Reed et al., 2011). Des informations sur la teneur en P de sept (les plus communs) d'entre ces sols sont regroupées dans le **Tableau I-9**. Les Alfisols et les Mollisols représentent deux des sols les plus fertiles des tropiques et contiennent relativement de grandes quantités de minéraux et de P disponible. Une grande partie des cultures tropicales les plus productives se fait sur ces sols. En revanche les sols les plus altérés, les Ultisols et les Oxisols, sont caractérisés par une faible disponibilité relative du phosphore (**Tableau I-9**). Ces deux sols sont présents dans plus de 50% des forêts tropicales (Palm et al., 2007; Reed et al., 2011; Vitousek and Sanford, 1986). La minéralogie des sols tropicaux est dominée par la kaolinite, les oxydes de fer et d'aluminium. Les fortes teneurs en sesquioxides dans les sols argileux des tropiques à de fortes conséquences sur la disponibilité des nutriments pour les plantes. Par exemple lorsque dans un sol argileux le rapport oxyde de fer/argile est supérieur à 0,2 une large quantité de phosphore apporté se fixe dans les sols. Cette contrainte est importante dans les sols tropicaux (Sanchez and Logan, 1992) notamment dans les Ultisols et les Oxisols.

## 5. Interaction phosphatases-sol

### 5.1. Propriétés enzymatiques

L'activité d'une enzyme s'exprime par la mesure de la vitesse de réaction enzymatique qui correspond à la quantité de produit formé en fonction du temps. Les activités enzymatiques sont exprimées en katal (kat), dans le Système international (SI), et correspond à la mole de produit formé par seconde (mol/s). L'activité catalytique spécifique s'exprime en kat par masse de protéine (kat/g). La cinétique de réaction enzymatique est décrite par plusieurs modèles dont le plus utilisé est celui de Michaelis-Menten. Ce modèle relie la vitesse initiale de réaction, la concentration du substrat et les paramètres caractéristiques de l'enzyme  $V_{\max}$  et  $K_m$  selon la relation :

$$V = \frac{V_{\max}[S]_0}{K_m + [S]_0}$$

$V_{\max}$  est la vitesse maximale de la réaction enzymatique obtenue avec un large excès de substrat.  $K_m$  est la constante de Michaelis et traduit l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Elle est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Cette constante correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale est égale à  $V_{\max}/2$

**Tableau I-9:** Répartition des sols de forêts tropicales appartenant à l'ordre d'altération des sols et quantités de P associées (Reed et al., 2011). La correspondance des sols dans le système FAO-UNESCO (1974).

Sol USDA	Surface		Echantillons testés (nombre)	Po total (µg/g)	P total (Pt) (µg/g)	Po/Pt	Equivalent dans le système FAO-UNESCO (1974)
	(106 ha)	(%)					
Ultisols	654	27,0	7(8)	80,7±19,6	203,6±38,6	0,40	Alisols/Acrisols/Nitisols/Lixisols
Oxisols	649	26,8	1(3)	152	321,3±60,9	0,47	Ferralsols
Inceptisols	416	17,2	5(9)	131,9±20,2	753,6±155,8	0,18	Cambisols
Entisols	244	10,1	2	36±11	684,5±80,5	0,05	Gleysols
Alfisols	234	9,7	12	83,8±11	365,8±101,5	0,23	Planosols
Vertisols	71	2,9	3	57,5±12,5	529,3±130,1	0,11	Vertisols
Mollisols	63	2,6	34(38)	109,1±8,2	594,2±101,9	0,18	Chernozems/phaeozems/Greyzems/Kastanozems
Andisols	37	1,5					Andosols
Aridisols	26	1,1					Solonchaks/Luvisols
Histosols	26	1,1					Histosols
Spodosols	5	0,2					Podzols

Les valeurs de P labile et de P total sont seulement disponibles pour sept des huit Ultisols et cinq des neufs Inceptisols. Les valeurs de Po total sont seulement disponibles pour l'un des trois Oxisols et les valeurs de Po total et P total sont seulement disponibles pour 34 des 38 Mollisols.

### 5.1.1. pH et température

Les enzymes sont sensibles au pH et à la température qui influencent fortement leur activité. Le pH a pour effet soit de modifier la structure secondaire et tertiaire de l'enzyme, soit modifier les charges électriques des radicaux des acides aminés du site actif (Raisonnier, 2002). Lorsque le pH est défavorable à l'enzyme elle modifie sa structure et la dénature, et lorsque le pH est favorable, l'enzyme est dans des conditions optimales et son activité est maximale. Les enzymes possèdent une activité optimale à une certaine valeur de la température. Des activités phosphatasiques maximales ont été mesurées pour des températures de 60-70°C (Antibus et al., 1986; Wannet et al., 2000) ou de 35°C (Huang et al., 2005).

### 5.1.2. Les inhibiteurs et les activateurs

Il existe plusieurs inhibiteurs et activateurs des enzymes qui influencent plus ou moins leur activité. Les composés phénoliques tels que les tanins et les acides humiques ont des effets inhibiteurs sur l'activité des phosphatases dans les sols (Allison, 2006; Joannis et al., 2007; Rao et al., 1998). D'autres corps comme les anions polyvalents (phosphate, molybdate, arsenate, bicarbonate etc.), les ions métalliques ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) et les agents chélateurs (EDTA, 8-hydroxyquinoline, tartrate, oxalate, etc.) sont aussi des inhibiteurs pour les phosphatases et les phytases (Louche et al., 2010; Quiquampoix and Mousain, 2005; Yoshida et al., 1989). Les phosphatases acides et les phytases peuvent être aussi inhibées par des composés fluorés et le molybdate (Bernard et al., 2002). Des composés comme le phénylglyoxal et le 1,2-cyclohexadione modifient la conformation de la phytase au niveau du site actif par interaction avec l'arginine et inhibent ainsi l'activité enzymatique (Ullah et al., 2000).

Par contre, plusieurs phosphatases et certaines phytases sont activées par les ions métalliques divalents. Ces ions peuvent réactiver l'enzyme après qu'elle ait été désactivée par des inhibiteurs. Certaines enzymes peuvent nécessiter ces ions pour leur activité. (Quiquampoix and Mousain, 2005).

## **5.2. Adsorption et activité**

### 5.2.1. Adsorption des enzymes

L'adsorption sur les colloïdes du sol, est l'un des facteurs auxquels sont soumises les enzymes dans le sol, et qui peuvent influencer leur activité ou leur stabilité. Les enzymes, comme les autres protéines, sont des macromolécules qui ont une forte affinité pour les surfaces solides. Les protéines sont composées d'un ou de plusieurs acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Les chaînes latérales des acides aminés qui constituent la chaîne peptidique peuvent être hydrophobes ou hydrophiles, et avoir des charges électriques négatives, neutres ou positives. A cause de ces propriétés, les enzymes sont capables d'interagir de façon très variée avec les surfaces solides et s'adsorber sur ces surfaces. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer l'adsorption des enzymes sur les

surfaces : (i) l'interaction coulombienne (ou électrostatique), (ii) l'interaction hydrophobe, (iii) la liaison de Van der Waals, (iv) la liaison hydrogène, (v) la liaison covalente (Quiquampoix et al., 2002). Outre ces mécanismes d'adsorption liés en partie aux propriétés des enzymes, on note aussi ceux liés aux structures des colloïdes du sol sur lesquels les enzymes s'immobilisent : (vi) le piégeage des enzymes entre les feuillets des minéraux argileux (George et al., 2007a) ou (vii) l'encapsulation des enzymes dans la matière organique (Nannipieri et al., 1996).

#### *5.2.1.1. Forces électrostatiques*

L'interaction électrostatique se produit entre les charges électriques des enzymes et celles des surfaces minérales (argiles, oxyhydroxydes). Les charges électriques des protéines proviennent de l'ionisation des groupements fonctionnels carboxylique, tyrosyl, amine, imine et imidazole sur les chaînes peptidiques. Ces interactions sont considérées comme fortes. Des interactions électrostatiques peuvent se produire par le chevauchement des doubles couches électriques (doubles couches diffuses) des protéines et des surfaces. Ces doubles couches électriques se forment autour des macromolécules et des surfaces minérales par des ions en solution (Quiquampoix et al., 2002). Différents modèles de doubles couches ont été développés dont celui de Gouy-Chapman-Stern qui est la version améliorée et actuellement utilisée.

#### *5.2.1.2. Interaction hydrophobe*

L'interaction hydrophobe peut se produire entre les protéines et des surfaces hydrophobes. Elle peut être qualitativement comprise comme une interaction qui pousse deux entités hydrophobes à se regrouper. Cette attraction est considérée comme forte et de portée plus longue que celles des attractions qui pourraient s'exercer entre les composés hydrophobes, soit dans le vide, soit dans le milieu en l'absence d'hydratation (Gerschel, 1995). Cette interaction est responsable de la faible solubilité des solutés non polaires, de l'adhésion entre surfaces hydrophobes et de la floculation des particules solides (Meyer et al., 2006). Il est généralement admis que plus la surface est hydrophobe plus l'adsorption est forte. On retrouve, parmi les corps hydrophobes, des gaz inertes, des hydrocarbures, les huiles, les composés fluorocarbonés dont les molécules sont neutres et non polaires.

#### *5.2.1.3. Forces de Van der Waals*

La liaison de Van der Waals est une interaction de faible intensité entre atome ou molécule (électriquement neutre). L'attraction entre les particules est entièrement due aux forces de dispersion qui sont des forces créées par les interactions de dipôles permanents ou instantanés. Le fondement théorique de cette liaison de Van der Waals est l'échange de particules virtuelles et se comprend mieux dans le domaine de la physique quantique. Elle est la somme de trois types de forces dont l'énergie diminue avec la distance qui sépare les particules mis en évidence dans cette interaction. Ces trois types de forces sont :

*Les forces de Keesom ou effets d'orientation* qui sont dues à l'interaction entre deux groupements (atomes ou molécules) polaires. Cette interaction dipôle-dipôle est beaucoup plus faible qu'une attraction ion-dipôle parce qu'elle se produit entre charges partielles.

*Les forces de Debye ou effets d'induction* qui sont dues à l'interaction entre une molécule polaire et une molécule non polaire. Lorsqu'une molécule non polaire est placée dans le champ électrique créée par une molécule polaire, elle acquiert un moment dipolaire induit.

*Les forces de London ou effets de dispersion* qui sont dues à l'attraction entre dipôles instantanées de deux molécules non polaires. Il peut exister à un moment donné, un moment dipolaire d'une molécule, dû aux fluctuations des électrons dans les couches électroniques, qui peut induire des dipôles dans les molécules voisines.

#### *5.2.1.4. Liaison hydrogène*

La liaison hydrogène peut se produire entre les groupements carboxyles et phénoliques des composés humiques du sol et les protéines. La spectroscopie infrarouge a permis de mettre en évidence cette liaison entre une enzyme et l'acide humique (Nannipieri et al., 1996). Cette interaction est d'intensité plus faible que la liaison covalente mais plus forte que celle de Van der Waals. Elle nécessite un donneur d'hydrogène composé de hétéroatomes (N, O, F) porteur de H (-COOH ; -OH ; -NH<sub>2</sub>) et un accepteur composé de hétéroatomes porteurs de doublets électroniques.

#### *5.2.1.5. La liaison covalente*

La liaison covalente entre les acides aminés de l'enzyme et les composants des substances organiques, est évoquée dans l'étude de formation de complexes substances organiques-enzymes, pour caractériser la nature des liaisons formant les complexes (Nannipieri et al., 1996). La liaison covalente est une liaison dans laquelle deux atomes liés mettent en commun un électron d'une de leurs couches externes afin de former un doublet d'électrons liant les deux atomes. Ainsi l'atome d'oxygène du groupement quinone des composés organiques peut former une liaison covalente avec l'acide aminé de l'enzyme dans le complexe substance organique-enzyme.

#### *5.2.1.6. Piégeage des enzymes entre les feuillets des minéraux argileux*

L'intercalation des enzymes entre les feuillets de certaines argiles telles que les smectites peut se produire, en particulier lorsque l'argile est saturée par les ions H<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> donnant un espace basal relativement large. Les enzymes peuvent aussi s'intercaler entre les feuillets des smectites saturées par des cations divalents et trivalents, mais à un degré moindre. Cette intercalation des enzymes semble se produire pour un rapport enzyme/argile (en masse) dépassant 1/5. En dessous de cette valeur, l'intercalation des enzymes n'a pas été observée (Nannipieri et al., 1996).

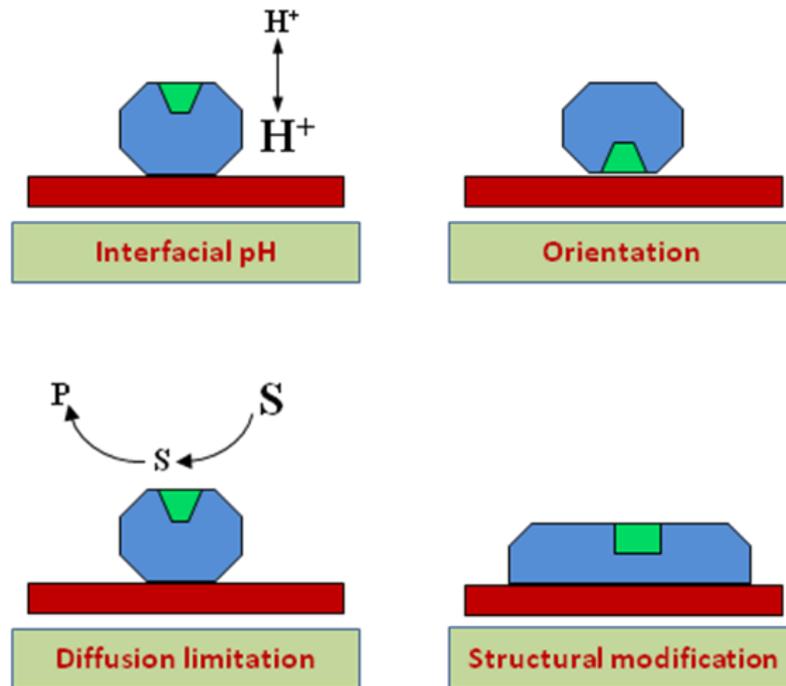
#### 5.2.1.7. Encapsulation des enzymes dans la matière organique

Parmi les mécanismes évoqués qui pourraient expliquer l'immobilisation des enzymes sur les colloïdes du sol, il y a l'encapsulation des enzymes dans les pores de la matière organique. Tout comme la liaison covalente et l'échange d'ions, il contribue à la stabilité des complexes substances humiques-enzymes (George et al., 2007a). Les pores des matières organiques servent de refuge aux enzymes de faible poids moléculaire contre les protéinases de gros poids moléculaire et sont ainsi protégées de la dégradation microbienne tout en ayant accès au substrat (Nannipieri et al., 1996).

#### 5.2.2. Effet de l'adsorption sur l'activité des enzymes

L'adsorption des enzymes sur les colloïdes du sol a de fortes conséquences sur leur mobilité et leur activité, mais aussi sur leur stabilité et leur rémanence (George et al., 2007a). L'adsorption des enzymes sur les colloïdes du sol peut inhiber fortement leur activité, dans certains cas de façon irréversible. L'interaction des enzymes avec les colloïdes du sol, notamment les argiles peut affecter les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique, avec une diminution de la vitesse de réaction. Les paramètres cinétiques de Michaelis-Menten de la réaction enzymatique peuvent donc changer, avec une diminution de  $V_{max}$  et une augmentation de  $K_m$  (Quiquampoix, 2000). Néanmoins, il a été difficile de tirer des conclusions après des études de l'effet de l'interaction des phosphatases avec la phase solide du sol sur l'activité des phosphatases natives dans le sol. En effet, il est impossible, de déterminer séparément les paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $K_m$  des phosphatases natives libres et des phosphatases natives adsorbées. Dans des études de système modèle phosphatase-argile, permettant de comparer les phosphatases libres à celles qui sont adsorbées, les résultats indiquent en général une perte d'activité suivie d'une diminution de  $V_{max}$  et une augmentation de  $K_m$  (Quiquampoix and Mousain, 2005).

L'adsorption de phosphatases acides sur une argile comme la montmorillonite peut modifier le pH optimal d'activité de ces enzymes vers des pH plus alcalines. C'est ce qu'ont observé Leprince et Quiquampoix (1996) en étudiant l'interaction entre deux phosphatases acides purifiées secrétées par le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* et la montmorillonite. Ce comportement des enzymes adsorbés a été souvent observé (Durand, 1964; Pflug, 1982; Ramirez-Martinez and McLaren, 1966) et peut s'expliquer (i) soit par une différence entre le pH de surface des particules adsorbantes et le pH mesuré dans la solution aqueuse, lié à une accumulation de protons pour compenser les charges négatives des surfaces (**Figure I-9**), (ii) soit par une modification de la structure de l'enzyme sur la surface adsorbante (Leprince and Quiquampoix, 1996).



**Figure I-9:** Mécanismes possible des interactions entre enzymes et les surfaces minérales qui pourraient expliquer la différence entre l'activité catalytique en solution et celle à l'état adsorbé. Rouge = surface minérale, bleu = enzyme, vert site actif de l'enzyme, S = substrat et P= produit de la réaction enzymatique (Quiquampoix and Burns, 2007)

La modification de la structure des enzymes (**Figure I-9**), suivant l'adsorption sur les surfaces solides principalement due aux interactions électrostatiques, dépend du pH et affecte l'activité catalytique des enzymes (voir paragraphe 5.3.).

Une autre conséquence de l'adsorption des enzymes peut être leur inactivation ou leur dégradation dans les sols. Les enzymes extracellulaires relâchées dans les sols par les microorganismes peuvent ne pas rester actives longtemps à cause de leur adsorption et leur inactivation par des colloïdes du sol ou parce qu'elles peuvent servir de substrats aux microorganismes protéolytiques (Nannipieri et al., 1996). Par contre, les enzymes libres dans le sol ont une courte durée de vie et leur immobilisation sur des supports solides peut permettre d'augmenter leur stabilité (Nannipieri and Bollag, 1991). L'immobilisation peut donc aussi protéger les enzymes de la dégradation physique et peuvent leur permettre de rester actives plus longtemps dans les sols. L'effet d'inactivation ou dégradation d'une part et de protection d'autre part des surfaces solides sur lesquelles sont immobilisées les enzymes dépend de la nature de ces surfaces solides. Par exemple, les argiles pures comme la montmorillonite ont un fort effet sur la modification de la conformation des enzymes alors que les complexes formés par les oxydes de fer et d'aluminium sur la montmorillonite réduisent l'effet d'inhibition de la montmorillonite pure (Quiquampoix and Mousain, 2005). La présence également de la matière organique sur les argiles a aussi un effet protecteur des enzymes. (Rao et al., 1996; Rao et al., 2000). Une explication de l'effet protecteur de la

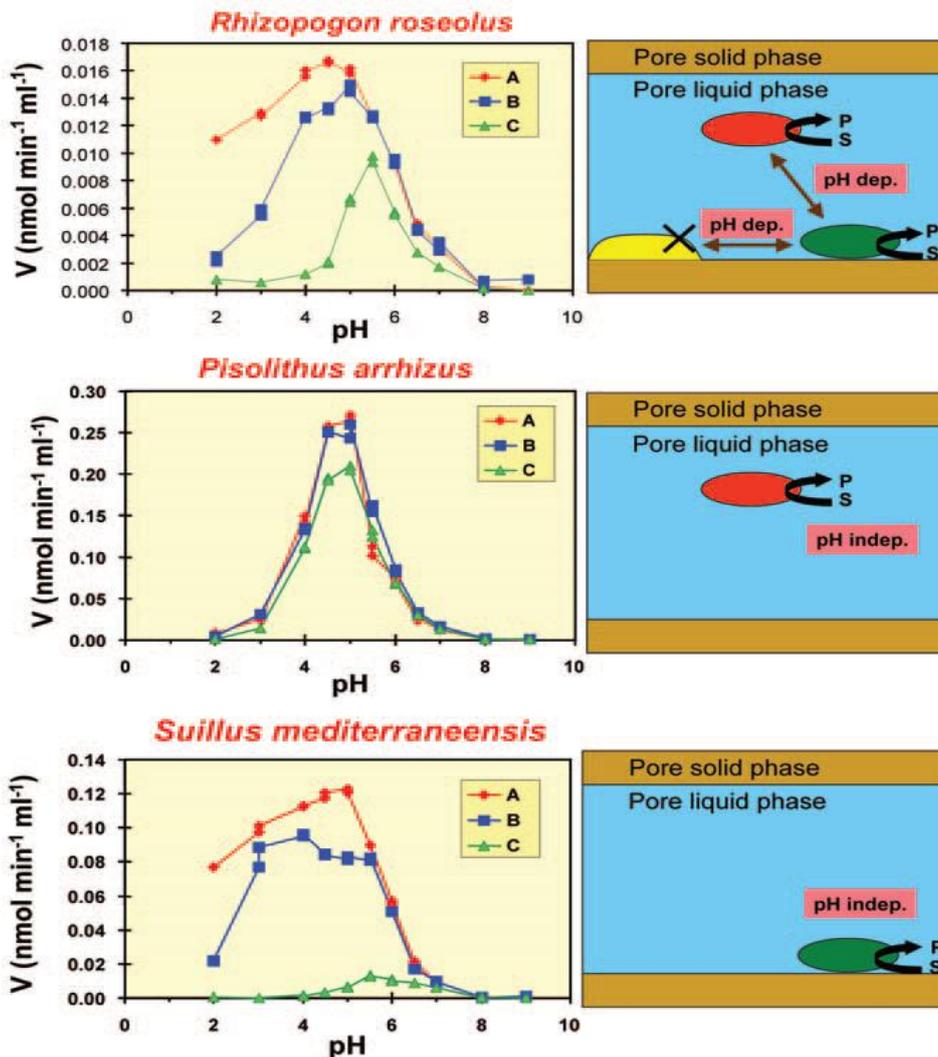
matière organique est que les enzymes sont adsorbées sur des complexes organo-minéraux en étant retenues dans les pores de la matière organique qui sont assez larges pour permettre le passage des substrats et du produit mais pas des microorganismes protéolytiques de gros poids moléculaires (Nannipieri et al., 1996).

L'adsorption des enzymes dans les sols peut réduire leur affinité pour le substrat (**Figure I-9**) et donc réduire l'efficacité de leur activité (George et al., 2007a). Elle réduit, en outre, la mobilité des enzymes dans le sol. Ce qui a pour conséquence une zone d'action limitée pour les enzymes. La non immobilisation des enzymes dans le sol est une propriété favorable qui non seulement permet à l'enzyme de ne pas être perturbée dans son activité catalytique, mais aussi de largement diffuser dans le sol.

L'adsorption et la modification d'activité des phosphatases peuvent aussi dépendre des caractéristiques biochimiques de la phosphatase. Une étude de l'adsorption de plusieurs phosphatases de champignons ectomycorrhiziens sur la montmorillonite et leurs conséquences sur l'activité catalytique, a montré des comportements différents entre phosphatases de même espèce de champignon et d'espèces différentes (travaux non publiés d'Abadie et al). Différents types de comportements ont été observés avec ces phosphatases. Certaines phosphatases s'adsorbaient avec une modification de leur activité, alors que d'autres s'adsorbaient sans que leur activité soit modifiée. D'autres phosphatases encore, s'adsorbaient très peu, voire pas, et n'avaient donc pas leur activité modifiée (**Figure I-10**) (Quiquampoix and Burns, 2007). Ces différences de comportements des phosphatases face aux surfaces solides sont surtout liées à leur caractéristiques biochimiques (Quiquampoix and Mousain, 2005).

### **5.3. Modification de conformation et orientation du site actif de l'enzyme**

L'adsorption des enzymes sur les surfaces solides, principalement due aux interactions électrostatiques et dépendantes du pH, peut affecter la stabilité de la structure à trois dimensions de l'enzyme (protéine) et conduire à une modification de sa conformation. (Quiquampoix, 2000). Cette modification de conformation, dépendante du pH, a pour conséquence d'affecter l'activité catalytique de l'enzyme. La modification de conformation d'une protéine après adsorption sur des surfaces de latex chargées négativement a été rapportée par Hayes et al (1994). Actuellement, il n'existe pas de méthode qui permette de mesurer directement la conformation des protéines à l'état adsorbé. Les seules méthodes adaptées à la détermination de la structure tertiaire des protéines, la diffraction des rayons X et la spectroscopie à résonance magnétique (RMN), ne peuvent être utilisées quand les protéines sont adsorbées (Quiquampoix, 2008). C'est probablement la structure secondaire des protéines adsorbées qui peut être le plus facilement déterminée. Dans ce sens, Quiquampoix et collaborateurs ont pu observer une modification de conformation dépendante du pH de l'albumine de sérum de bœuf (BSA) sur la montmorillonite en utilisant la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)  $^{31}\text{P}$  (1992) et la spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (1993).



**Figure I-10:** Activités de phosphatases de trois champignons ectomycorhiziens en contact avec la surface de la montmorillonite en fonction du pH. A= Activité catalytique en solution en absence de surfaces adsorbantes, B= Activité catalytique en présence de surfaces adsorbantes (l'enzyme est adsorbée en proportion variable dépendant du pH), C= Activité catalytique après l'élimination des enzymes adsorbées (pour mesurer la contribution des enzymes non adsorbées de l'activité mesurée en B). La phosphatase de *Rhizopogon roseolus* montre le schéma le plus complexe: l'adsorption et l'activité catalytique à l'état adsorbé dépendent du pH, et une partie de l'activité est perdue après adsorption. La phosphatase de *Pisolithus arrhizus* affiche un comportement simple: il n'y a pas d'interaction avec la surface de l'argile. La phosphatase de *Suillus mediterraneensis* est aussi simple: l'adsorption est complète et dépendant du pH, mais l'activité catalytique n'est pas affectée par l'adsorption (Quiquampoix and Burns, 2007).

L'adsorption des protéines sur les surfaces minérales est un phénomène qui implique les fonctions d'état thermodynamiques enthalpie et entropie. Elle résulte de plusieurs interactions qui entraînent la diminution de l'énergie libre du système ( $\Delta_{ads}G$ ), condition nécessaire pour une adsorption spontanée. L'énergie libre du système se définit comme suit :

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S$$

Avec  $T$ ; température absolue,  $\Delta_{\text{ads}}$ : changement de la fonction d'état thermodynamique,  $H$  enthalpie et  $S$  entropie du système.

L'effet enthalpie ( $\Delta_{\text{ads}}H$ ) est lié aux interactions électrostatiques et aux forces de Lifshitz–van der Waals entre les charges de la protéine et celles de la surface. L'effet entropie ( $\Delta_{\text{ads}}S$ ) est provoqué par la réorganisation de la protéine dans l'interaction hydrophobique et au changement de conformation. (Quiquampoix, 2000). Lorsque l'enzyme s'étale sur la surface de l'argile lors de l'adsorption, les points de contact avec le solide augmentent et l'entropie de conformation augmente à cause de l'augmentation des degrés de liberté de la chaîne peptidique qui accompagne le désordre de la structure secondaire de l'enzyme (Haynes and Norde, 1994; Leprince and Quiquampoix, 1996). Les acides aminés hydrophobes des chaînes latérales de l'enzyme (protéine), en contact avec l'eau se replient à l'intérieur de la molécule de protéine et pourrait avoir interagi avec une surface hydrophobe de siloxane de la couche tétraédrique des argiles (Staunton and Quiquampoix, 1994). Le retour à la conformation initiale peut nécessiter une énergie d'activation plus grande que l'énergie thermique disponible dans le système. Ce qui pourrait expliquer l'irréversibilité de la perte d'activité catalytique observée après l'adsorption de l'enzyme sur les surfaces argileuses (Leprince and Quiquampoix, 1996).

Un autre facteur qui pourrait expliquer la réduction d'activité des enzymes adsorbées est l'orientation du site actif vers la surface adsorbante lors de l'adsorption. Le côté de l'enzyme qui sera préférentiellement orienté vers la surface chargée négativement des argiles sera celui dont la densité de charge positive est la plus élevée. Si le site actif se trouve sur ce côté plus chargé positivement alors il y aura une inhibition complète de l'activité catalytique du fait que le site actif sera masqué (**Figure I-9**). Par contre, il n'y aura pas de réduction d'activité si le site actif se trouve sur le côté opposé de celui qui est en contact avec la surface adsorbante. Des situations intermédiaires peuvent aussi se produire si le site actif n'est ni totalement masqué ni totalement exposé au solvant (ou accessible au substrat).

## **6. Activités catalytiques des phosphatases dans les sols**

### **6.1. Activités catalytiques comme sonde de qualité de sol**

Au vu de l'importance de l'activité catalytique dans les cycles biogéochimiques des sols, l'activité de quelques classes majeures d'enzymes est parfois proposée comme sonde de qualité des sols. En effet, si les stress et perturbations physiques ou chimique subis par un sol sont trop importants, l'activité microbiologique peut être impactée négativement, et donc la production d'enzymes réduite.

Les phosphatases (y compris les phytases) sont nécessaires pour la minéralisation du Po dans les sols. Des phosphatases de diverses origines sont produites dans l'environnement du sol pour répondre à un besoin en Pi pour les plantes. Elles sont extracellulaires ou intracellulaires, d'origine végétale ou microbienne. En dépit d'études approfondies, la relation

entre l'activité phosphatasique mesurée et la minéralisation du Po n'est pas bien comprise (Condrón and Tiessen, 2005). Bien que des conclusions d'une étude (Adams, 1992) n'aient pas trouvé de relation entre l'activité des phosphatases dans le sol et la minéralisation du Po, et qui ont tendance à supposer que l'activité des phosphatases n'est pas un facteur limitant dans la minéralisation du Po, le rôle des phosphatases dans l'hydrolyse du Po du sol est important (Chen et al., 2008). Plusieurs études ont établi un lien entre la forte activité des phosphatases du sol et la diminution de la quantité de Po extraites par NaOH (Chen et al., 2002; Liu et al., 2005; Liu et al., 2004).

Les phosphatases, comme d'autres enzymes, contribuent à la fertilisation des sols. Elles contribuent de ce fait, à la qualité du sol d'un point de vue agronomique. Ces enzymes du sol interviennent dans les grands cycles biogéochimiques et leurs activités sont parfois utilisées pour estimer la fertilité des sols (Chaussod, 1996). Les activités enzymatiques sont des indicateurs très sensibles des changements liés à des pratiques de gestion des sols, aux variations climatiques et aux contaminations, raison pour laquelle elles ont été considérées dans l'établissement des indices agronomiques et non agronomiques de qualité des sols (Bastida et al., 2008). Par exemple, Qu et al (2011) ont montré que l'activité enzymatique du sol pourrait constituer un bon indicateur de la qualité du sol pour les sols pollués par le plomb et le zinc. Les phosphatases acides ont été les seules enzymes, sur les trois enzymes qui mobilisent les éléments N, P et C, à être identifiées dans les travaux de Sandoval-Pérez et al (2009) comme étant un indicateur potentiel de l'effet de l'utilisation du sol sur la fertilité des sols. L'activité catalytique des phosphatases, étudiée sur trois types d'utilisation de sol (sol de forêt primaire, secondaire et pâturage), était généralement plus élevée dans les sols les plus fertiles (Sandoval-Pérez et al., 2009). Cependant, la fertilité d'un sol ne peut pas être déterminée que par la mesure d'activité d'une seule enzyme à cause de la grande spécificité enzymatique dans les sols. Les enzymes dans les sols sont libres ou adsorbées et ont une durée de vie et une activité qui varient largement selon les propriétés physico-chimiques de leur environnement. Leur activité peut aussi dépendre des besoins en nutriments dans les sols. Par exemple, l'activité des phosphatases dépend de la richesse du sol en Pi et dont l'abondance peut inhiber la biosynthèse des phosphatases. Plusieurs études suggèrent que l'activité des enzymes impliquées dans la minéralisation des éléments nutritifs du sol peut diminuer avec des niveaux croissants des formes inorganiques de ces nutriments (Dick, 1996; Gregorich et al., 1994). Les métaux lourds, les ions métalliques dans la solution du sol peuvent avoir des effets variables sur l'activité enzymatique. Pan et Yu (2011) ont montré que la population microbienne du sol et l'activité des enzymes diminuaient significativement avec des taux croissants de cadmium (Cd) et/ou de plomb (Pb). Il ont rapporté que plusieurs éléments traces Cu(I), Ag(I), Cd(II), Cu(II), Zn(II), Mn(II), Sn(II), Ni(II), Pb(II), Fe(II), Cr(III), Fe(III), B(III), Al(III), V(IV), et Se(IV) ont des effets inhibiteurs sur l'activité de phosphatase et que cette inhibition peut augmenter avec l'acidité du sol (Juma and Tabatabai, 1977). Il a été aussi noté que la réduction d'activité enzymatique avec l'augmentation de l'acidité du sol pourrait être due en partie au taux croissants de  $Al^{3+}$  dans la solution du sol (Sollins et al., 1996).

Gianfreda et al (1993) ont aussi montré que l'activité enzymatique pouvait diminuer avec des concentrations croissantes des espèces OH-Al, surtout en présence d'acide tannique. Plusieurs autres constituants du sol, comme mentionné au paragraphe 5.1.2 peuvent affecter l'activité des enzymes dans les sols. Aussi, les activités enzymatiques constituent un élément important à prendre en compte dans l'évaluation de la qualité agronomique d'un sol.

## **6.2. Expression d'activité catalytique d'enzymes apportées aux sols et minéraux des sols**

Comprendre l'interaction des enzymes, notamment les phosphatases, avec des surfaces solides et son effet sur leur activité, pour une bonne prédiction de l'utilisation des enzymes dans le domaine de l'agriculture, a été le centre d'intérêt de plusieurs travaux de recherches. Des études de l'interaction des phosphatases avec les surfaces solides ont été faites avec des sols naturels, des minéraux argileux, ou avec des surfaces synthétiques (Giaveno et al., 2010; Huang et al., 2005; Huang et al., 2003; Leprince and Quiquampoix, 1996; Matumoto-Pintro, 1996; Pilar et al., 2009; Rao et al., 1996; Rao et al., 2000; Rosas et al., 2008; Zhu et al., 2010). Les phosphatases utilisées pour ces études, sont des phosphatases de champignons obtenues par culture *in vitro* ou des phosphatases de bactéries. Pour la plupart de ces études, l'activité catalytique des phosphatases et leur stabilité est influencée à divers degré par leur immobilisation sur des surfaces solides, et dépend fortement de la nature de ces surfaces solides. Par exemple, Rao et al (2000) ont étudié l'influence sur l'activité et la stabilité d'une phosphatase acide de pomme de terre de plusieurs complexes formés d'une part par la phosphatase acide et d'autre part par des minéraux (montmorillonite, hydroxydes d'Al et  $\text{Al}(\text{OH})_{18}$ ), des substances organiques (acide tannique) ou des composés organo-minéraux. Ils en ont conclu que l'activité catalytique de la phosphatase peut changer après son immobilisation, dépendant fortement de la nature du support sur lequel elle est immobilisée. En effet, ces résultats ont montré une forte perte d'activité en fonction du pH de la phosphatase avec la montmorillonite (20% d'activité relative), et des pertes allant dans le sens décroissant avec: acides tanniques > hydroxydes d'aluminium > complexe acide tannique- $\text{Al}(\text{OH})_{18}$  > complexe acide tannique- $\text{Al}(\text{OH})_{18}$ -montmorillonite > complexe  $\text{Al}(\text{OH})_{18}$ -montmorillonite (l'activité relative est respectivement de 33, 45, 48, 55 et 58%). la présence des espèces  $\text{Al}(\text{OH})_x$  dans les complexes inorganiques et/ou organiques sur lesquels est immobilisée la phosphatase réduit l'inhibition causée par son immobilisation. Cette observation est en accord avec celle faite par Rao et al (1996), montrant une augmentation du niveau d'activité des phosphatases adsorbées sur les complexes  $\text{Al}(\text{OH})_x$ -montmorillonite avec une augmentation de la quantité de  $\text{Al}(\text{OH})_x$  dans les complexes. Aussi, la montmorillonite intercalée avec des composés organiques a un effet positif sur l'activité et la stabilité des phosphatases immobilisées (Kelleher et al., 2004). Une grande majorité des quelques études de l'interaction des phosphatases avec les sols naturels, ont été faites avec la fraction argileuse de ces sols, considérant que les enzymes ont plus d'affinité avec la fraction argileuse comparée aux fractions plus grossières. Huang et al. (2005) ont même distingué les argiles fines (< 0,2  $\mu\text{m}$ ) des argiles grossières (0,2-2  $\mu\text{m}$ ) d'un ultisol en comparant leur

influence (sans ou avec la matière organique) sur l'adsorption et l'activité d'une phosphatase acide à celles d'autres minéraux tels que la kaolinite, la goethite. Il en ressort que les argiles fines du sol adsorbaient beaucoup plus de phosphatase que les argiles grossières, et les complexes argilo-humiques plus que les argiles. Par contre, il y avait plus de phosphatases adsorbées avec la goethite et moins avec la kaolinite qu'avec toutes les fractions argileuses de ce sol. L'activité relative des phosphatases adsorbées était plus élevée avec les argiles fines qu'avec les argiles grossières, et la forte stabilité thermique des phosphatases étaient due à la présence de la matière organique dans ces argiles.

L'effet des surfaces solides sur l'immobilisation et sur l'activité des phosphatases peut varier en fonction des composés organo-minéraux avec lesquels ils forment un complexe ou avec lesquels ils sont en compétition dans l'adsorption des phosphatases. En effet, plusieurs ligands inorganiques et organiques tels que les phosphates organiques et acides organiques, qui sont abondants dans le sol peuvent exercer un effet important sur l'adsorption des phosphatases. Par exemple, les ions oxalate, phosphate et tartrate diminuent l'adsorption des phosphatases sur des colloïdes du sol quand leur concentration augmente (Huang et al., 2003). Malgré ces nombreuses études pour comprendre l'interaction des phosphatases avec les colloïdes du sol, il existe très peu d'étude sur l'interaction des phosphatases avec les fractions des sols prenant en compte des fractions plus grossières (<200  $\mu\text{m}$ ).

## Références citées

- Abdalla, M.H., 1994. Use of organic phosphorus by rhizobium-leguminosarum biovar viceae phosphatases. *Biology and Fertility of Soils* 18, 216-218.
- Adams, M.A., 1992. Phosphatase activity and phosphorus fractions in Karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 14, 200-204.
- Allison, S., 2006. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry* 81, 361-373.
- Almendros, G., 2008. Humic substances, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of soil science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 315-322.
- Anderson, G., Malcolm, R.E., 1974. The nature of alkali-soluble soil organic phosphates. *Journal of Soil Science* 25, 282-297.
- Antibus, R.K., Kroehler, C.J., Linkins, A.E., 1986. The effects of external pH, temperature, and substrate concentration on acid-phosphatase-activity of ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 64, 2383-2387.
- Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L., Linkins, A.E., 1992. Phosphatase-activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 70, 794-801.
- Arbestain, M.C., Macias, F., Chesworth, W., 2008. Soil, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of soil science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 629-634.
- Arvieu, J.C., 1974. Les processus chimiques de l'évolution des phosphates en sols calcaires, *Bulletin AFES*, pp. 207-224.
- Baldwin, D.S., Howitt, J.A., Beattie, J.K., Publishing, B.I.P.C., 2005. Abiotic degradation of organic phosphorus compounds in the environment, 75-88 pp.
- Barber, S.A., 1984. Phosphorus, Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 201-228.
- Barber, S.A., Walker, J.M., Vasey, E.H., 1963. Mechanisms for Movement of Plant Nutrients from Soil and Fertilizer to Plant Root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 11, 204-207.
- Barthès, B.G., Kouakoua, E., Larré-Larrouy, M.-C., Razafimbelo, T.M., de Luca, E.F., Azontonde, A., Neves, C.S.V.J., de Freitas, P.L., Feller, C.L., 2008. Texture and sesquioxide effects on water-stable aggregates and organic matter in some tropical soils. *Geoderma* 143, 14-25.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., García, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 159-171.
- Batjes, N.H., 1997. A world dataset of derived soil properties by FAO–UNESCO soil unit for global modelling. *Soil Use and Management* 13, 9-16.
- Bedrock, C.N., Cheshire, M.V., Chudek, J.A., Goodman, B.A., Shand, C.A., 1994. Use of  $^{31}\text{P}$ -NMR to study the forms of phosphorus in peat soils. *Science of the Total Environment* 152, 1-8.

- Benians, G.J., Barber, D.A., 1974. Uptake of phosphate by barley plants from soil under aseptic and non-sterile conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 6, 195-200.
- Bernard, M., Mouyna, I., Dubreucq, G., Debeaupuis, J.P., Fontaine, T., Vorgias, C., Fuglsang, C., Latge, J.P., 2002. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology-Sgm* 148, 2819-2829.
- Bieleski, R.L., 1973. Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 225-252.
- Bishop, M.L., Chang, A.C., Lee, R.W.K., 1994. Enzymatic mineralization of organic phosphorus in a volcanic soil in Chile. *Soil Science* 157, 238-243.
- Borie, F., Barea, J.M., 1981. Ciclo del fósforo: I. Formas del elemento en los suelos y su disponibilidad para plantas y microorganismos. *Anales de Edafología y Agrobiología* 40, 2351-2364.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 1996. *The nature and properties of soils*. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, xi + 740 pp.
- Brinch-Pedersen, H., Sørensen, L.D., Holm, P.B., 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in Plant Science* 7, 118-125.
- Burns, R.G., 1982. Enzyme-activity in soil - location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 423-427.
- Cade-Menun, B.J., Berch, S.M., Preston, C.M., Lavkulich, L.M., 2000. Phosphorus forms and related soil chemistry of Podzolic soils on northern Vancouver Island. I. A comparison of two forest types. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 30, 1714-1725.
- Calvet, R., 2003. *Le sol: propriétés et fonctions*. Editions France Agricole.
- Celi, L., Presta, M., Ajmore-Marsan, F., Barberis, E., 2001. Effects of pH and electrolytes on inositol hexaphosphate interaction with goethite. *Soil Science Society of America Journal* 65, 753-760.
- Chaussod, R., 1996. *La qualité biologique des sols: évaluation et implications*. Etude et Gestion des Sols 3.
- Chen, C.R., Condon, L.M., Davis, M.R., Sherlock, R.R., 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology and Biochemistry* 34, 487-499.
- Chen, C.R., Condon, L.M., Xu, Z.H., 2008. Impacts of grassland afforestation with coniferous trees on soil phosphorus dynamics and associated microbial processes: A review. *Forest Ecology and Management* 255, 396-409.
- Chen, Y., 1996. Organic matter reactions involving micronutrients in soils and their effect on plants, In: Alessandro, P. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 507-529.
- Condon, L.M., Frossard, E., Tiessen, H., Newman, R.H., Stewart, J.W.B., 1990. Chemical nature of organic phosphorus in cultivated and uncultivated soils under different environmental-conditions. *Journal of Soil Science* 41, 41-50.

- Condrón, L.M., Tiessen, H., 2005. Interactions of organic phosphorus in terrestrial ecosystems, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 295-307.
- Cordell, D., Drangert, J.O., White, S., 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* 19, 292-305.
- Cosgrove, D.J., 1980. Inositol hexakisphosphates, In: Cosgrove, D.J. (Ed.), *Inositol phosphates. Their chemistry, biochemistry and physiology*. Elsevier Scientific, Amsterdam, Oxford, New York, pp. 26-43.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245, 35-47.
- Dalal, R.C., 1977. Soil organic phosphorus. *advances in Agronomy* 29, 83-117.
- De Groot, C.J., Golterman, H.L., 1993. On the presence of organic phosphate in some Camargue sediments: evidence for the importance of phytate. *Hydrobiologia* 252, 117-126.
- Dick, R.P., 1996. Soil enzyme activities as indicators of soil quality, In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America Special Publication 35, Madison, WI pp. 107-124.
- Dixon, J.B., Schulze, D.G., 2002. *Soil mineralogy with environmental applications*. Soil Science Society of America Inc., Madison, 866 pp.
- Duchaufour, P., Jacquin, F., 1975. Comparaison des processus d'humification dans les principaux types d'humus forestiers. *Bulletin A.F.E.S* 1, 29-36.
- Duff, S.M.G., Sarath, G., Plaxton, W.C., 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* 90, 791-800.
- Durand, G., 1964. Modifications of urease activity in the presence of bentonite. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 259, 3397-3400.
- Findenegg, G.R., Nelemans, J.A., 1993. The effect of phytase on the availability of P from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant and Soil* 154, 189-196.
- George, T.S., Quiquampoix, H., Simpson, R.J., Richardson, A.E., 2007. Interactions between phytases and soil constituents: implications for the hydrolysis of inositol phosphates, In: Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J. (Eds.), *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*. Cabi, Wallingford UK, pp. 221-241.
- George, T.S., Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Simpson, R.J., 2004. Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: growth and P nutrition in laboratory media and soil. *Plant, Cell & Environment* 27, 1351-1361.
- George, T.S., Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2005. Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 977-988.
- Gerschel, A., 1995. *Liaison intermoléculaires. Les forces en jeu dans la matière condensée*. Inter Editions et CNRS Editions.

- Gianfreda, L., Rao, M.A., Violante, A., 1993. Interactions of invertase with tannic acid, hydroxy-aluminium (OH-Al) species or montmorillonite. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 671-677.
- Giaveno, C., Celi, L., Richardson, A.E., Simpson, R.J., Barberis, E., 2010. Interaction of phytases with minerals and availability of substrate affect the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 491-498.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant-growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
- Goldberg, S., Lebron, I., Suarez, D.L., 2000. Soil colloidal behavior, In: Sumner, M.E. (Ed.), *Handbook of Soil Science*. CRC Press, pp. B 195-B 240.
- Greaves, M.P., Webley, D.M., 1969. The hydrolysis of myoinositol hexaphosphate by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 37-43.
- Gregorich, E.G., Monreal, C.M., Carter, M.R., Angers, D.A., Ellert, B.H., 1994. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 74, 367-385.
- Harrison, A.F., 1987. *Soil organic phosphorus. A review of world literature*. CAB International, Wallingford, Oxon. UK, 257pp. pp.
- Hawkes, G.E., Powlson, D.S., Randall, E.W., Tate, K.R., 1984. A P-31 nuclear magnetic-resonance study of the phosphorus species in alkali extracts of soils from long-term field experiments. *Journal of Soil Science* 35, 35-45.
- Hayes, J., Simpson, R., Richardson, A., 2000a. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil* 220, 165-174.
- Hayes, J.E., Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2000b. Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biology and Fertility of Soils* 32, 279-286.
- Haynes, C.A., Norde, W., 1994. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, 517-566.
- Haynes, C.A., Sliwinsky, E., Norde, W., 1994. Structural and electrostatic properties of globular proteins at a polystyrene-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* 164, 394-409.
- Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237, 173-195.
- Holford, I.C.R., 1997. Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research* 35, 227-239.
- Huang, Q., Liang, W., Cai, P., 2005. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 209-214.
- Huang, Q., Zhao, Z., Chen, W., 2003. Effects of several low-molecular weight organic acids and phosphate on the adsorption of acid phosphatase by soil colloids and minerals. *Chemosphere* 52, 571-579.

- Irving, G.C.J., Cosgrove, D.J., 1982. The use of gas-liquid-chromatography to determine the proportions of inositol isomers present as pentakisphosphates and hexakisphosphates in alkaline extracts of soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 13, 957-967.
- Joanisse, G.D., Bradley, R.L., Preston, C.M., Munson, A.D., 2007. Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: the case of *Kalmia angustifolia*. *New Phytologist* 175, 535-546.
- Joner, E.J., van Aarle, I.M., Vosatka, M., 2000. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant and Soil* 226, 199-210.
- Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – A critical review. *Plant and Soil* 205, 25-44.
- Juma, N.G., Tabatabai, M.A., 1977. Effects of Trace Elements on Phosphatase Activity in Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, 343-346.
- Kelleher, B.P., Willeford, K.O., Simpson, A.J., Simpson, M.J., Stout, R., Rafferty, A., Kingery, W.L., 2004. Acid phosphatase interactions with organo-mineral complexes: influence on catalytic activity. *Biogeochemistry* 71, 285-297.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., 1978. Plant growthpromoting rhizobacteria on radishes., In: *Phyto-bacteriologie, S.d.P.v.e. (Ed.)*, 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Tours: Gilbert-Clary, pp. 379-382.
- L'Annunziata, M.F., Fuller, W.H., 1971. Soil and plant relationships of inositol phosphate stereoisomers; the identification of D-Chiro- and muco-inositol phosphates in a desert soil and plant system1. *Soil Science Society of America Journal* 35, 587-595.
- L'Annunziata, M.F., Fuller, W.H., Brantley, D.S., 1972. D-Chiro-inositol phosphate in a forest soil1. *Soil Science Society of America Journal* 36, 183-184.
- Lemanceau, P., 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas spp* fluorescents. *Agronomie* 12, 413-437.
- Leprince, F., Quiquampoix, H., 1996. Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- Lindsay, W.L., 1979. Chemical equilibria in soils. *Chemical equilibria in soils.*, 449pp.
- Lindsay, W.L., Moreno, E.C., 1960. Phosphate Phase Equilibria in Soils1. *Soil Science Society of America Journal* 24, 177-182.
- Liu, B.-L., Rafiq, A., Tzeng, Y.-M., Rob, A., 1998a. The Induction and Characterization of Phytase and Beyond. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 415-424.
- Liu, C., Muchhal, U.S., Uthappa, M., Kononowicz, A.K., Raghothama, K.G., 1998b. Tomato Phosphate Transporter Genes Are Differentially Regulated in Plant Tissues by Phosphorus. *Plant Physiology* 116, 91-99.
- Liu, H., Trieu, A.T., Blaylock, L.A., Harrison, M.J., 1998c. Cloning and Characterization of Two Phosphate Transporters from *Medicago truncatula* Roots: Regulation in Response

- to Phosphate and to Colonization by Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 14-22.
- Liu, Q., Loganathan, P., Hedley, M.J., 2005. Influence of Ectomycorrhizal Hyphae on Phosphate Fractions and Dissolution of Phosphate Rock in Rhizosphere Soils of *Pinus radiata*. *Journal of Plant Nutrition* 28, 1525-1540.
- Liu, Q., Loganathan, P., Hedley, M.J., Skinner, M.F., 2004. The mobilisation and fate of soil and rock phosphate in the rhizosphere of ectomycorrhizal *Pinus radiata* seedlings in an Allophanic soil. *Plant and Soil* 264, 219-229.
- Loeppert, R.H., 2008. Soil chemistry, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of soil science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 637-641.
- Louche, J., Ali, M.A., Cloutier-Hurteau, B., Sauvage, F.-X., Quiquampoix, H., Plassard, C., 2010. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 323-335.
- Matumoto-Pintro, P.T., 1996. Rôle des phosphatases dans l'utilisation du phosphore organique par les champignons ectomycorhiziens et leurs associations avec le pin laricio de Corse. Influence des surfaces adsorbantes sur l'activité des phosphatases. , *Sciences Agronomiques*. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, pp. 57-70.
- McKercher, R.B., Anderson, G., 1968. Characterisation of inositol penta- and hexaphosphate fractions of a number of Canadian and Scottish soils. *Journal of Soil Science* 19, 302-310.
- Meyer, E.E., Rosenberg, K.J., Israelachvili, J., 2006. Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15739-15746.
- Naidja, A., Huang, P.M., Bollag, J.-M., 2000. Enzyme-clay interactions and their impact on transformations of natural and anthropogenic organic compounds in soil. *Journal of Environmental Quality* 29, 677-691.
- Nannipieri, P., Bollag, J.-M., 1991. Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. *Journal of Environmental Quality* 20, 510-517.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P., 1996. Humus and enzyme activity, In: Alessandro, P. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 293-328.
- Neff, J., Reynolds, R., Sanford, R., Fernandez, D., Lamothe, P., 2006. Controls of bedrock geochemistry on soil and plant nutrients in southeastern Utah. *Ecosystems* 9, 879-893.
- Oertli, J.J., 2008. Soil fertility, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of soil science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 656-668.
- Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O., Oh, T.K., 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 362-372.

- Olson, C.G., Thompson, M.L., Wilson, M.A., 2000. Phyllosilicates, In: Sumner, M.E. (Ed.), Handbook of Soil Science. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. F77-F123.
- Palm, C., Sanchez, P., Ahamed, S., Awiti, A., 2007. Soils: A contemporary perspective, Annual Review of Environment and Resources. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 99-129.
- Pan, J., Yu, L., 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. Ecological Engineering 37, 1889-1894.
- Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C., Briggs, S.P., 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 99, 13324-13329.
- Paul, E.A., Clark, F.E., 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego, CA, 273 pp.
- Pefferkorn, E., 1997. Structure and stability of natural organic matter/soil complexes and related synthetic and mixed analogues. Advances in Colloid and Interface Science 73, 127-200.
- Peterson, R.L., Bonfante, P., 1994. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. Plant and Soil 159, 79-88.
- Pflug, W., 1982. Soil enzymes and clay-minerals .2. effect of clay-minerals on the activity of polysaccharide cleaving soil enzymes. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 145, 493-502.
- Pilar, M.C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., Busto, M.D., 2009. Alkaline phosphatase-polyresorcinol complex: characterization and application to seed coating. journal of agricultural and food chemistry 57, 1967-1974.
- Qu, J., Ren, G., Chen, B., Fan, J., E, Y., 2011. Effects of lead and zinc mining contamination on bacterial community diversity and enzyme activities of vicinal cropland. Environmental Monitoring and Assessment 182, 597-606.
- Quiquampoix, H., 2000. Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil, In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 171-206.
- Quiquampoix, H., 2008. Enzymes and proteins, interactions with soil-constituent surfaces, In: Chesworth, W. (Ed.), Encyclopedia of Soil Science. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 210-216.
- Quiquampoix, H., Burns, R.G., 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. Elements 3, 401-406.
- Quiquampoix, H., Mousain, D., 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), Organic phosphorus in the environment. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 89-112.
- Quiquampoix, H., Ratcliffe, R.G., 1992. A  $^{31}\text{P}$  NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation  $\text{Mn}^{2+}$ : modification of conformation with pH. Journal of Colloid and Interface Science 148, 343-352.

- Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.H., 2002. Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 285-306.
- Quiquampoix, H., Staunton, S., Baron, M.H., Ratcliffe, R.G., 1993. Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 75, 85-93.
- Raghothama, K., Karthikeyan, A., 2005. Phosphate acquisition. *Plant and Soil* 274, 37-49.
- Raghothama, K.G., 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 665-693.
- Raisonnier, A., 2002. Cours: Enzymologie élémentaire, Faculté de Médecine - Université Paris VI.
- Ramirez-Martinez, J.R., McLaren, A.D., 1966. Some factors influencing the determination of phosphatase activity in native soils and in soils sterilized by irradiation. *Enzymologia* 31, 23-38.
- Rao, M.A., Gianfreda, L., Palmiero, F., Violante, A., 1996. Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. *Soil Science* 161, 751-760.
- Rao, M.A., Violante, A., Gianfreda, L., 1998. Interactions between tannic acid and acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 111-112.
- Rao, M.A., Violante, A., Gianfreda, L., 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1007-1014.
- Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N., Bucher, M., 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414, 462-470.
- Reed, S.C., Townsend, A.R., Taylor, P.G., Cleveland, C.C., 2011. Phosphorus cycling in tropical forests growing on highly weathered soils, In: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.), *Phosphorus in Action*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 339-369.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319-339.
- Rosas, A., de la Luz Mora, M., Jara, A.A., López, R., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2008. Catalytic behaviour of acid phosphatase immobilized on natural supports in the presence of manganese or molybdenum. *Geoderma* 145, 77-83.
- Rowell, D.L., 1988. Soil acidity and alkalinity, Wild, Alan ed. Longman scientific & technical, UK, 844-898 pp.
- Runge-Metzger, A., 1995. Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security, In: Tiessen, H. (Ed.), *Phosphorus In The Global Environment*. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 27-42.

- Saiz-Jimenez, C., 1996. The chemical structure of humic substances: recent advances, In: Alessandro, P. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 1-44.
- Sanchez-Calderon, L., Chacon-Lopez, A., Perez-Torres, C.-A., Herrera-Estrella, L., 2010. Phosphorus: plant strategies to cope with its scarcity, In: Hell, R., Mendel, R.-R. (Eds.), *Cell Biology of Metals and Nutrients*, Heidelberg, Germany, pp. 173-198.
- Sanchez, P., Logan, T., 1992. Myths and science about the chemistry and fertility of soils in the tropics, In: Lal, R., Sanchez, P. (Eds.), *Myths and Science of Soils of the Tropics*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 35-46.
- Sandoval-Perez, A.L., Gavito, M.E., Garcia-Oliva, F., Jaramillo, V.J., 2009. Carbon, nitrogen, phosphorus and enzymatic activity under different land uses in a tropical, dry ecosystem. *Soil Use and Management* 25, 419-426.
- Sanyal, S.K., Datta, S.K.d., 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soil. *Advances in Soil Science* 16, 1-20.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., Ayling, S.M., 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology* 116, 447-453.
- Schroeder, D., 1984. *Soils - Facts and Concepts*. Englische Ausgabe von: *Bodenkunde in Stichworten*. Int. Potash Institut, CH-3048 Worblaufen/Bern 1984, 140 S., 18,- SFr. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 147, 797.
- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., Galzy, P., 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74, 7-11.
- Skopp, J.M., 2000. Physical properties of primary particles, In: Sumner, M.E. (Ed.), *Handbook Of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. A3-A17.
- Smith, F.W., Ealing, P.M., Dong, B., Delhaize, E., 1997. The cloning of two Arabidopsis genes belonging to a phosphate transporter family. *The Plant Journal* 11, 83-92.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed. Academic Press, London, UK.
- Solaiman, M.Z., Ezawa, T., Kojima, T., Saito, M., 1999. Polyphosphates in intraradical and extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5604-5606.
- Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B.A., 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma* 74, 65-105.
- Soon, Y.K., 2008. Phosphorus cycle, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 547-553.
- Sposito, G., 1984. *The surface chemistry of soils*. Oxford University Press, New York, 234 pp.
- Sposito, G., 2000. Ion exchange phenomena, In: Sumner, M.E. (Ed.), *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. B241-B263.

- Staunton, S., Quiquampoix, H., 1994. Adsorption and conformation of bovine serum albumin on montmorillonite: modification of the balance between hydrophobic and electrostatic interactions by protein methylation and pH variation. *Journal of Colloid and Interface Science* 166, 89-94.
- Steinhardt, G.C., 2008. Particle-size distribution, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia Of Soil Science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 505-510.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley and Sons, New York, 496 pp.
- Tarafdar, J.C., Jungk, A., 1987. Phosphatase-activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils* 3, 199-204.
- Tarafdar, J.C., Marschner, H., 1994. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 387-395.
- Tarafdar, J.C., Rao, A.V., Bala, K., 1988. Production of phosphatases by fungi isolated from desert soils. *Folia Microbiologica* 33, 453-457.
- Tate, K.R., Newman, R.H., 1982. Phosphorus fractions of a climosequence of soils in new-zealand tussock grassland. *Soil Biology & Biochemistry* 14, 191-196.
- Tewari, K.K., Singh, M., 1964. Acid soluble and acid insoluble inorganic polyphosphates in *Cuscuta reflexa*. *Phytochemistry* 3, 341-347.
- Tiessen, H., Stewart, J.W.B., Cole, C.V., 1984. Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis I. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 853-858.
- Tran, H.T., Hurley, B.A., Plaxton, W.C., 2010. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science* 179, 14-27.
- Traoré, K., 2003. Frittage à basse température d'une argile kaolinitique du Burkina Faso. Transformations thermiques et réorganisations structurales, Ecole Doctorale n° 258 : Sciences - Technologie - Santé, Faculté des Sciences et Techniques. Université de Limoges, Limoges.
- Turner, B.L., 2005. Organic phosphorus transfer from terrestrial to aquatic environments, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 269-294.
- Turner, B.L., 2010. Variation in pH Optima of Hydrolytic Enzyme Activities in Tropical Rain Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6485-6493.
- Turner, B.L., Chudek, J.A., Whitton, B.A., Baxter, R., 2003. Phosphorus composition of upland soils polluted by long-term atmospheric nitrogen deposition. *Biogeochemistry* 65, 259-274.
- Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S., 2005. Appendix :Organic phosphorus compounds in the environment, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic Phosphorus In The Environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 381-388.
- Turner, B.L., Paphazy, M.J., Haygarth, P.M., McKelvie, I.D., 2002. Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 357, 449-469.

- Ullah, A.H.J., Gibson, D.M., 1987. Extracellular phytase (EC 3.1.3.8) from *aspergillus-ficuum* nr1 3135 - purification and characterization. *Preparative Biochemistry* 17, 63-91.
- Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Lei, X.G., Mullaney, E.J., 2000. Biochemical Characterization of Cloned *Aspergillus fumigatus* Phytase (phyA). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275, 279-285.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.
- Vats, P., Banerjee, U.C., 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 3-14.
- Vitousek, P.M., Sanford, R.L., 1986. Nutrient cycling in moist tropical forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17, 137-167.
- Von Uexküll, H.R., Mutert, E., 1995. Global extent, development and economic-impact of acid soils. *Plant and Soil* 171, 1-15.
- Wannet, W.J.B., Wassenaar, R.W., Jorissen, H., van der Drift, C., Op den Camp, H.J.M., 2000. Purification and characterization of an acid phosphatase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 77, 215-222.
- Williams, C.H., Anderson, G., 1968. Inositol phosphates in some Australian soils. *Australian Journal of Soil Research* 6, 121-130.
- Wyss, M., Brugger, R., Kroenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Osterhelt, G., Lehmann, M., van Loon, A., 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 367-373.
- Yoshida, H., Oikawa, S., Ikeda, M., Reese, E.T., 1989. A novel acid-phosphatase excreted by *penicillium-funiculosum* that hydrolyzes both phosphodiester and phosphomonoesters with aryl leaving groups. *Journal of Biochemistry* 105, 794-798.
- Zhu, J., Huang, Q., Pigna, M., Violante, A., 2010. Immobilization of acid phosphatase on uncalcined and calcined Mg/Al-CO<sub>3</sub> layered double hydroxides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 77, 166-173.

## **Chapitre II:**

**Diversity of adsorption affinity and catalytic activity of fungal phosphatases in contact with tropical soils.**

## **Chapitre II: Diversity of adsorption affinity and catalytic activity of fungal phosphatases in contact with tropical soils.**

---

### *Avant propos*

Le phosphore étant un élément nutritif essentiel, sa déficience est un facteur limitant pour la croissance et la production des plantes, surtout dans les régions tropicales. Bien que la seule forme assimilable par les plantes soit l'orthophosphate (Pi), la forme la plus répandue dans les sols est la forme organique (Po) qui peut être utile dans la nutrition phosphatée à condition d'être minéralisée. Les phosphatases sont des enzymes capables de minéraliser le Po et sont produites et sécrétées dans le sol par plusieurs microorganismes dont les champignons ectomycorhiziens. Cependant, une fois relâchées dans le sol, les phosphatases sont soumises à plusieurs facteurs qui influencent leur fonctionnement. L'adsorption sur les particules du sol est un facteur qui peut entraîner une inhibition de l'activité enzymatique qui est due soit au changement de conformation de l'enzyme, soit à l'orientation de son site actif vers la surface limitant ainsi l'accès au substrat. L'adsorption et l'activité des enzymes dépendent fortement du pH et de la nature minérale et organique des surfaces adsorbantes du sol, mais peut aussi dépendre de l'origine et des caractéristiques biochimiques de l'enzyme. L'adsorption est un facteur important qui mérite d'être pris en compte dans la prédiction du rôle des enzymes dans le sol. Plusieurs études de l'adsorption et de son effet sur l'activité des enzymes par les composants du sol ont été très souvent conduites avec des surfaces organiques et/ou minérales synthétiques, mais plus rarement avec les sols naturels.

L'objectif de ce chapitre était d'étudier le rôle de différentes fractions de sols tropicaux naturels d'origines diverses sur l'adsorption et l'activité enzymatique après adsorption de phosphatases acides sécrétées par des champignons ectomycorhiziens en fonction du pH. Les phosphatases utilisées proviennent de la solution nutritive de culture *in vitro* d'une souche de *Suillus collinitus* et de deux souches de *Hebeloma cylindrosporum*. Les fractions de sol utilisées sont notamment la fraction argileuse, la fraction sableuse et les fractions traitées chimiquement pour la destruction de la matière organique et l'extraction des oxydes de fer et d'aluminium de cinq sols tropicaux dont un vertisol et des sols ferrallitiques différents. Un protocole bien établi et plusieurs fois publié a permis d'évaluer les quantités d'enzymes adsorbées et le taux d'activité d'enzymes à l'état adsorbées. Les travaux de ce chapitre ont fait l'objet d'un projet de publication accepté au journal *Soil Biology and Biochemistry*.

## **Diversity of adsorption affinity and catalytic activity of fungal phosphatases in contact with tropical soils.**

Authors: Brice Kedi<sup>a,b</sup>, Josiane Abadie<sup>a</sup>, Joseph Sei<sup>b</sup>, Hervé Quiquampoix<sup>a</sup>, Siobhán Staunton<sup>a</sup>

Affiliation: <sup>a</sup>INRA, UMR Eco & Sols, INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France; and <sup>b</sup>LCMI, UFR SSMT, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Correspondence: Siobhán Staunton, tel : 33(0)499 61 23 31, fax : 33(0)499 61 30 88, [staunton@montpellier.inra.fr](mailto:staunton@montpellier.inra.fr)

### **Abstract**

Extracellular phosphatases from ectomycorrhizal fungi may contribute to plant nutrition, particularly in highly weathered tropical soils where available phosphorus is limited. However, the expression of their catalytic activity may be influenced by many factors including adsorption on organo-mineral surfaces of soils. We have investigated the pH-dependent adsorption and the resulting change in catalytic activity of trace amounts of extracellular fungal acid phosphatases in contact with various tropical soils. Different size fractions and the effect of chemical extraction of soil organo-mineral coatings were studied for acid phosphatases secreted by two *Hebeloma cylindrosporum* and one *Suillus collinitus* strains. Enzymes differed in their affinity for soil, but only *Suillus* phosphatase had markedly different affinities for the soils. In general, activity was largely conserved in the adsorbed state. *Suillus* phosphatases was more sensitive to soil and soil physical and chemical fractionation. There was no relationship between the affinity of an enzyme for a surface and the resulting change in activity after adsorption. *Suillus* phosphatases showed more pH dependence of both affinity for soil and loss of activity after adsorption than the *Hebeloma* enzymes. These results highlight the variability of the interaction of fungal phosphatases with soil.

### **Highlights**

- Affinity of fungal phosphatases for soil depended more on the enzymes than soils
- Activity after adsorption was generally completely maintained.
- No relationship between affinity of enzyme for soil and activity after adsorption

**Keywords:** adsorption; enzymatic activity; acid phosphatases; ectomycorrhizal fungi; ferralsol; oxisol; vertisol; *Suillus collinitus*; *Hebeloma cylindrosporum*

## 1. Introduction

Phosphorus is an essential nutrient but the proportion of phosphorus in soils that is readily available is very small since most mineral phosphorus is sparingly soluble. Organic P may constitute a large proportion of soil P in many soils (30-65%, but up to >90 %) and may thus play an important role in P nutrition, particularly in highly weathered tropical soils (Harrison, 1987). However it must be hydrolysed to inorganic P before it can be available to biological systems. In addition to the size of the stocks of organic P in soil, the supply of P is determined by the catalytic activity of phosphatases in soil. The catalytic activity of extracellular phosphatases is one of the mechanisms whereby ectomycorrhizal fungi contribute to the nutrition of higher plants (Cairney, 2011). Phosphatases may be produced and released into soil by various micro-organisms, including ectomycorrhizal fungi (Quiquampoix and Mousain, 2005).

After their release into soil, enzymes are submitted to various conditions that may influence the expression of their catalytic activity : (i) adsorption on soil components may lead to inhibition or loss of catalytic activity ; (ii) microbial and abiotic proteolytic breakdown will limit their effective lifespan ; (iii) they may be inhibited by organic and inorganic components in soil solution (Allison, 2006; George et al., 2007a). Adsorption may favour conformational changes that modify catalytic activity and may favour orientation of the active site towards the surface thereby restricting access to substrate or towards the solution thus enhancing substrate accessibility (Leprince and Quiquampoix, 1996). The physical protection afforded by adsorption may protect the enzymes against microbial breakdown (George et al., 2007a; Quiquampoix et al., 2002) or give enzymes a greater thermal stability (Huang et al., 2005). Various mechanisms have been proposed to explain the extent of adsorption of enzymes on organo-mineral surfaces, including electrostatic forces and hydrophobic interactions, van der Waals forces, covalent bonds and intercalation of enzymes in interlayer spaces of swelling clays (George et al., 2007a; Quiquampoix, 2000; Quiquampoix et al., 2002). Some authors state that the extent of the interaction between enzymes and mineral surfaces depends strongly on the nature of the surface. For example, it has been reported that in general more catalytic activity is lost in contact with 2:1 type minerals than 1:1 minerals (Nannipieri et al., 1996) and that less activity is lost when organic matter coats surfaces than when enzymes are adsorbed on clays or aluminium oxides (Rao et al., 2000). A greater loss of activity of fungal phytases has been observed in contact with phyllosilicates than with iron oxides (Giaveno et al., 2010). Both adsorption and changes in activity depend strongly upon pH. A shift in optimal pH towards alkaline pH is often observed in the presence of mineral surfaces (Leprince and Quiquampoix, 1996; McLaren and Estermann, 1957; Quiquampoix, 1987a).

Many of the studies of the effect of mineral and organo-mineral surfaces on catalytic activity of enzymes have been carried out using pure minerals or synthetic complexes (Rao and Gianfreda, 2000; Rao et al., 1996; Rosas et al., 2008) chosen to simulate natural soil.

Such model systems may be very different to the complex heterogeneous complexes in soils containing clay minerals, inorganic and organic particles and coatings (Rowell, 1994).

The objective of this study was to investigate the pH-dependent adsorption and the resulting change in catalytic activity of extracellular fungal acid phosphatases in contact with various fractions of contrasting natural tropical soils. In particular we have studied the effect of particle size fractions and the chemical extraction of organic and mineral coatings.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Preparation of acid phosphatases

Three strains of ectomycorrhizal fungi were used to produce extracellular phosphatases: one strain of *Suillus collinitus*, (laboratory code J3.15.35) referred to as Sc and two strains of *Hebeloma cylindrosporum* (laboratory codes D3.25.2 and D2) referred to as Hc1 and Hc2. All strains were selected from the collection maintained by the Eco & Sols unit and have been used in previous studies. They were grown on sterile agar gel (16 g/L) in Petri dishes at 25°C in the dark for 25 days. Plugs were taken and grown under sterile conditions in 25 mL liquid culture at 25°C in the dark for 30 days. The sterilised (autoclaved at 120°C for 20 minutes) nutritive solution contained NaCl (0.1 mM), KNO<sub>3</sub> (4 mM), KCl (1 mM), NH<sub>4</sub>Cl (2 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), thiamine- HCl (0.3 µM), ferric citrate (1%), glucose (10 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.4 mM) and trace elements as recommended by Morizet et Mingeau (1976). At the end of the culture period the thalli were removed, the solutions filtered using a Vileda-Mop membrane, pooled, divided into smaller containers and frozen until required. Protein assays using the Bradford method (Bradford, 1976) indicated that the total protein concentrations were <15 mg/L (below the detection limit).

### 2.2. Soil samples

Five tropical soils were chosen from the collection maintained by the Eco & Sols unit, all of which have been studied previously. All had been sampled from a depth of 0-10 cm. Some of their properties and references to publications are given in **Tableau II-1**. The soils were gently crushed and sieved < 200 µm. The clay sized fraction, < 2µm was obtained by sedimentation, and sand-sized fraction, 50 – 200 µm by wet sieving after sonification. The clay-sized fraction was stored refrigerated as a suspension 10 g/L until required. The sand-sized fraction was dried before storage. Subsamples of the sieved soils were also chemically treated to remove mineral oxides (citrate-bicarbonate-dithionite, (Mehra and Jackson, 1960)) or organic matter (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Lavkulich and Wiens)). Chemically treated samples were washed in CaCl<sub>2</sub> (1 M) to remove chemical residues and then rinsed in water to remove excess salt. The amount of Fe removed by the CBD treatment was measured by analysing the metal content of the extraction solution by Atomic Absorption Spectroscopy. The carbon content of the soils before and after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was measured by dry combustion using Fisons-EA-1108 CHNS-O Element Analyzer®. The specific surface area of samples was measured using the BET method (Micromeritics-ASAP 2020®)

### 2.3. Measurement of enzymatic activity

Three procedures were used to distinguish activity in solution, extent of adsorption and catalytic activity in the adsorbed state, as described by Quiquampoix (1987a, b):

- Procedure A - enzymatic activity in solution, in the absence of soil material
- Procedure B – enzymatic activity in suspension containing 1 g/L soil material
- Procedure C – enzymatic activity in the supernatant solution of the above suspension.

The contact period between soil and enzyme in suspension prior to addition of substrate was 1 hour. Soil and solution were separated (prior to addition of substrate for procedure C and after the enzymatic reaction for Procedure B) by centrifugation at 23 000 g for 15 minutes.

Enzymatic activity was measured in solutions or suspensions buffered to the required pH using sodium acetate buffer (300 mM). The substrate was *para*-nitrophenyl phosphate (pNPP), with an initial concentration of 6.7 mM. After 20 minutes at 25°C the reaction was stopped by addition of glycine buffer [glycine (133 mM); NaOH (125 mM); NaCl (67 mM); Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mM) at pH 10.5]. The concentration of the product was measured at 405 nm in a microplate spectrophotometer (DIALAB-ELx808). All measurements were carried out in triplicate. Appropriate blanks and controls were measured. Suspensions were centrifuged immediately after addition of stop buffer to avoid coloration due to the release of humic substances from soil in alkaline solution.

**Tableau II-1:** Origin and some properties of the selected soils

Soil	Sampling Depth (cm)	0-2 $\mu$ m (g kg <sup>-1</sup> )	2-20 $\mu$ m (g kg <sup>-1</sup> )	50-200 $\mu$ m (g kg <sup>-1</sup> )	Corg (after H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (g kg <sup>-1</sup> )	Fe-CBD (g kg <sup>-1</sup> )	pH (eau)	Classification	Localisation	Reference
V	0-10	563	184	112	31.2 (23.5)	15.74	6.25	Smectitic Leptic Hapludert <sup>a</sup> ( <i>Eutric Vertisol</i> ) <sup>d</sup>	Martinique	(Chevallier et al., 2000)
F1	0-10	411	403	117	45.7 (14.3)	45.02	5.93	Andic Dystrustept <sup>c</sup> <i>Ferralsol</i> <sup>e</sup>	Madagascar	(Razafimbelo et al 2007)
F2	0-10	768	1526	36	28.2 (11.3)	65.27	4.82	Typic Haplorthox <sup>b</sup> ( <i>Orthic Ferralsol</i> ) <sup>e</sup>	Congo	(Barthès et al., 2008; Kouakoua et al., 1997)
F3	0-10	495	339	140	29.5 (16.2)	71.84	5.33	Typic Hapludox <sup>b</sup> ( <i>Orthic Ferralsol</i> ) <sup>e</sup>	Brésil	(Razafimbelo et al., 2006)
F4	0-10	800	190	10	34.6 (31.7)	81.19	7.1	Haplorthox <sup>c</sup> ( <i>Rhodic Ferralsol</i> ) <sup>e</sup>	Brésil	(Kouakoua et al., 1999)

## 2.4. Data treatment

The reaction velocities were calculated for each procedure,  $V_A$ ,  $V_B$  and  $V_C$  at each pH and expressed relative to the maximum value in solution at the optimum pH, for ease of comparison between enzymes. The non parametric statistical Kolmogorov-Smirnov (KS) tests were applied to compare series of  $V$  with respect to pH. For a given soil the data of  $V_A$ ,  $V_B$  and  $V_C$  were compared and either  $V_B$  or  $V_C$  for different soils or soil treatments were compared using the KS test. When series of data were found to be significantly different the following parameters were also calculated. The fraction of enzyme free in solution after contact with soil,  $F$  was calculated as

$$F = V_C / V_A \quad 1).$$

The activity in the adsorbed state, relative to that of the same amount of enzyme in solution at the same pH,  $R$ , was calculated (Leprince and Quiquampoix, 1996; Quiquampoix, 1987a) as

$$R = (V_B - V_C) / (V_A - V_C) \quad 2).$$

## 3. Results

The biomass production of thallus was 0.3 - 0.5 g par thallus and the maximum catalytic activity in the range 10 and 20 nKatal/ g fresh mass thallus depending on the fungal strain. The optimal pH values were in the range 4.5 - 5.5 as expected for acid phosphatases. The specific surface area of the size fraction and sieved soils before and after physical fractionation and chemical treatments to remove organic and mineral coatings on mineral surfaces are given in **Tableau II-2**

**Tableau II-2:** Specific surface area (BET,  $m^2/g$ ) measured without or after chemical treatments

Soil	Treatments				
	Clay	Sand	Sieved	DCB	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Vertisol	72.0	6.3	20.5	3.1	54.3
Ferralsol (F1)	67.6	5.0	51.0	44.4	79.1

### 3.1. Adsorption and activity of phosphatases in the presence of soil clay as a function of pH

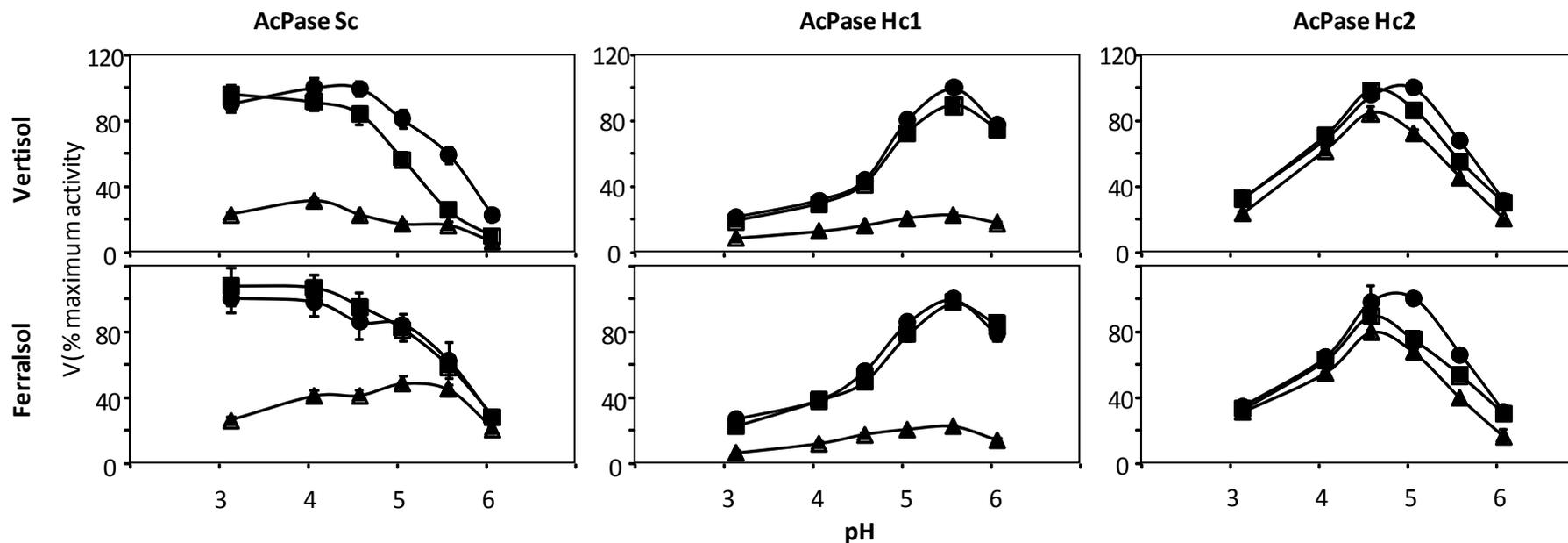
#### 3.1.1. $V_{max}$ for procedures A, B and C

**Figure II-1** shows the catalytic activity of each of the three phosphatases as a function of pH in solution ( $V_A$ ), in suspension of the clay-sized fractions of the vertisol or one of the ferralsols, F1 ( $V_B$ ) or in the supernatant solution of those suspensions, after separation of the soil and solution ( $V_C$ ). A comparison of  $V_A$ , and  $V_C$  indicates the affinity of the enzyme for

the organo-mineral surface. When  $V_C$  tends towards 0, adsorption was complete. When  $V_A$ , and  $V_C$  are close, there was little adsorption and it is numerically impossible to calculate  $R$  with certainty. When  $V_A$ , and  $V_C$  were significantly different, namely adsorption occurred, the comparison of  $V_A$ , and  $V_B$  indicates the extent to which activity was retained in the adsorbed state. Each enzyme followed very similar trends in contact with either soil. Large contrasts were observed between enzymes. **Tableau II-3** gives the results of the KS tests comparing pairs of curves for each soil clay and each enzyme. Curves  $V_A$ , and  $V_C$  were significantly different for both Sc and Hc1 in the presence of both soils, indicating adsorption. In addition, curves  $V_B$  and  $V_C$  were significantly different for both Sc and Hc1 in the presence of both soils, indicating some activity in the adsorbed state. Furthermore curves  $V_A$  and  $V_B$  for these combinations of enzyme and soil clay were not significantly different, suggesting that activity was completely maintained in the adsorbed state, namely  $R \approx 1$ . The behaviour of the enzyme obtained from the other *Hebeloma* strain, Hc2 was marked different. For both soil clays, the curves  $V_A$ ,  $V_B$  and  $V_C$  were not significantly different, thus  $F \sim 1$  and  $R$  thus could not be calculated with any certainty.

**Tableau II-3:** Probability that curves of  $V$  as a function of pH is significantly different obtained using the Kolmogorov-Smirnov test.

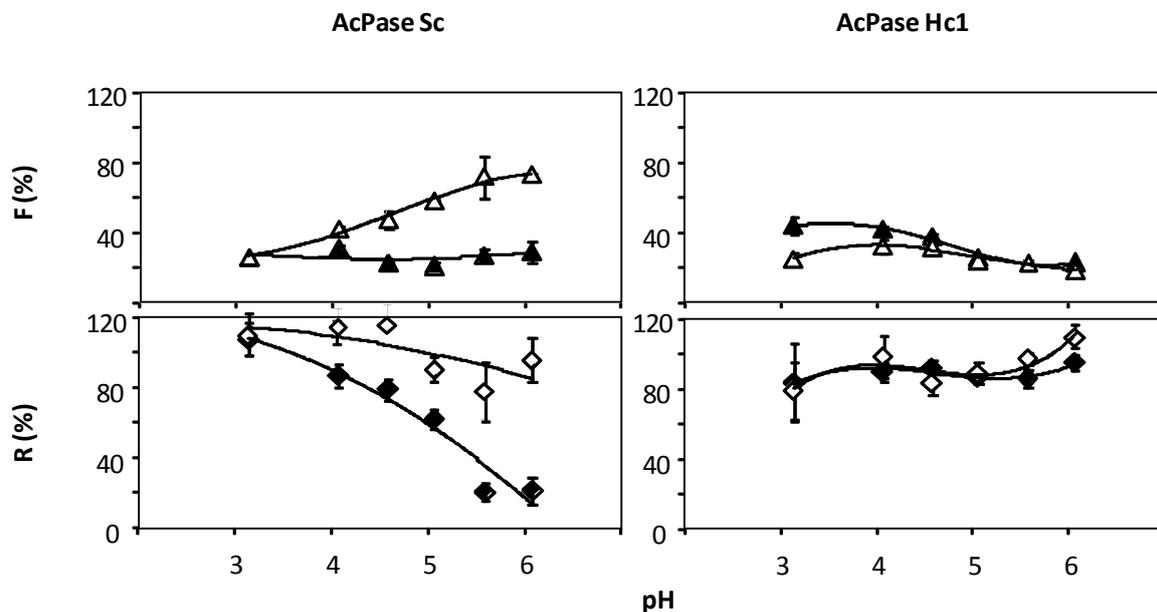
Soil	Curve	Enzyme		
		Sc	Hc1	Hc2
Vertisol (V)	$V_A$ vs $V_B$	0.503	0.231	0.764
	$V_A$ vs $V_C$	< 0.0001	< 0.0001	0.245
	$V_B$ vs $V_C$	0.0004	< 0.0001	0.267
Ferralsol (F1)	$V_A$ vs $V_B$	0.75	0.968	0.272
	$V_A$ vs $V_C$	0.0004	< 0.0001	0.266
	$V_B$ vs $V_C$	0.0004	< 0.0001	0.764



**Figure II-1:** Effect of soil clays on the pH dependence of catalytic activity of acid phosphatases from three ectomycorrhizal fungi, *Suillus* (Sc) and *Hebeloma* (Hc1 and Hc2): catalytic activity in solution V<sub>A</sub> (●), in suspension of soil clay V<sub>B</sub> (■) and in the supernatant solution of soil clay suspension V<sub>C</sub> (▲). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible, given the symbol size.

3.1.2. Fraction not adsorbed and relative activity retained in the adsorbed state, F and R

**Figure II-2** shows the values of the parameters F and R calculated from the raw data in **Figure II-1** for both soils and for the enzymes Sc and Hc1. Although the statistical test indicated that  $V_A$  and  $V_C$  for Hc2 in contact with either soil were not significantly different, F was calculated to be about 80% for both soils throughout the pH range. However the proportion of adsorbed enzyme was too small for R to be reliably calculated. R was about 100% at all pH for Hc1 on either soil and for Sc on the ferralsol ( $V_A \sim V_B$ ). The contrasting behaviour of the enzymes deduced from the raw data is confirmed in this presentation but differences between the two soils in adsorption and modification of activity in the adsorbed state of *Suillus* phosphatase are more apparent. The free fraction of Hc1 decreased two-fold from about 50% as pH was increased from 3 to 6, whereas the value of R was independent of pH at about 100 (activity in suspension was not significantly different from solution). The free fraction of *Suillus* phosphatases in the presence of the vertisol remained constant at about 25% over the pH range, whereas this fraction increased three-fold from about 25% to 75% in the presence of the ferralsol. The value of R calculated for this enzyme remained constant at 100% in the presence of the ferralsol, but decreased markedly from 100% to 20% in contact with the vertisol.



**Figure II-2:** Non-adsorbed enzyme fraction (F) and relative activity of the adsorbed enzyme (R) calculated from data presented in Figure 1. Closed symbols represent vertisol clay and open symbols ferralsol clay. Bars show experimental variability between triplicates

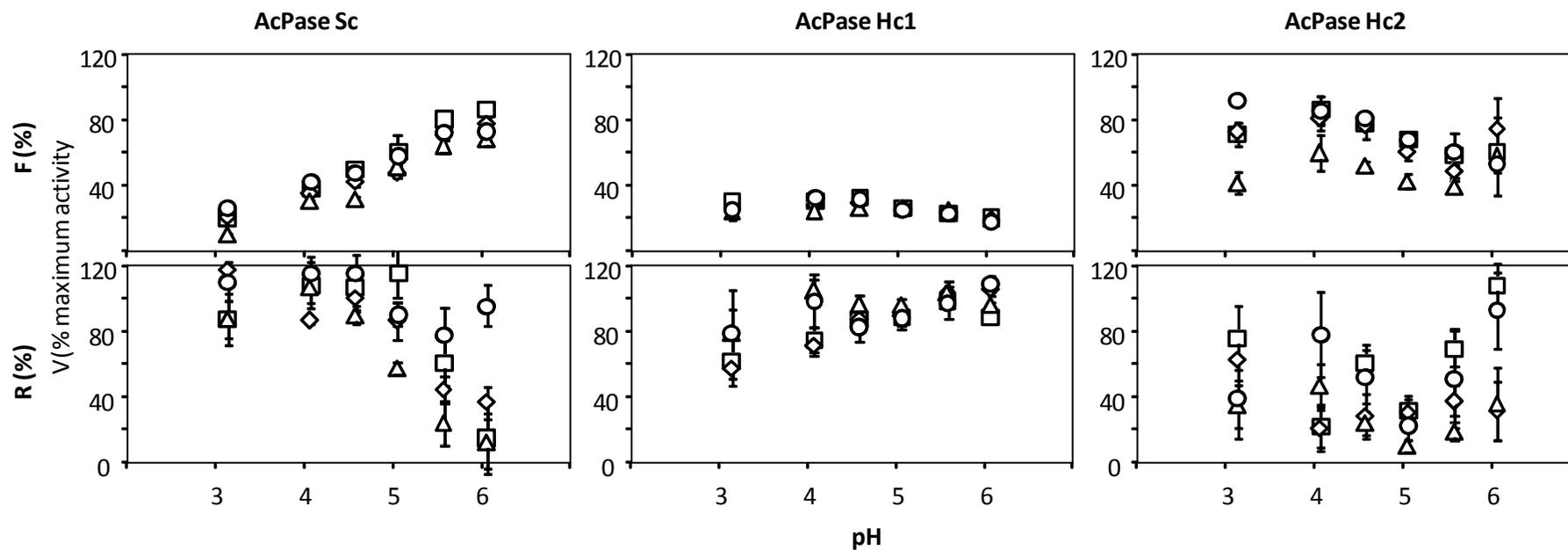
### 3.2. Comparison of effect of various ferralsols on enzyme adsorption and activity

The effect of each of the four ferralsols was similar as seen from the comparison of curves of either  $V_B$  or  $V_C$  as a function of pH for Sc, Hc1 and Hc2 in the presence of either ferralsol F1 or one of the other ferralsols, F2, F3 or F4 (**Tableau II-4**). The trends in either  $V_B$  or  $V_C$  for either Sc or Hc1 as a function of pH were not significantly different in contact with any of the ferralsols. However, the statistical test detected a significant probability for Hc2 that  $V_B$  differed between F1 and both F3 and F4, and  $V_C$  between F1 and F4. In all cases all curves of  $V_B$  and  $V_C$  followed similar trends with pH, showing maximum values near pH 4.5, as in solution. In contrast to F1, there was detectable adsorption of Hc2 on F3 and F4 with almost complete loss of activity with respect to the solution phase ( $V_B \sim V_C$ ).

**Tableau II-4:** Probability that curves of V as a function of pH are significantly different obtained using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparison of F1 with other ferralsols

Curve	Soil	Enzyme		
		Sc	Hc1	Hc2
$V_C$	F2	0.781	0.972	1.000
	F3	0.132	0.972	0.781
	F4	0.132	0.972	0.021
$V_B$	F2	0.972	0.762	0.132
	F3	0.972	0.972	0.056
	F4	0.503	0.972	0.0004

**Figure II-3** shows the values of F and R calculated from the curves  $V_A$ ,  $V_B$  and  $V_C$ . The affinities of the phosphatases for each of the ferralsols showed the same pH dependence, namely an increase in the free fraction, hence decrease in affinity, with increasing pH for *Suillus* phosphatases and no pH dependence for the *Hebeloma* phosphatases. There was little difference in affinity between soils for the Sc and Hc1 enzymes. However the average value of F for Hc2 was 90% for F1, about 80% for F2 and F3 and about 50 % for F4. The trends of R also showed some differences. While R for Sc in contact with F1 was fairly constant at about 100 throughout the pH range, the values of R fell sharply at pH above 4.5 or 5 with increasing pH for the other ferralsols.

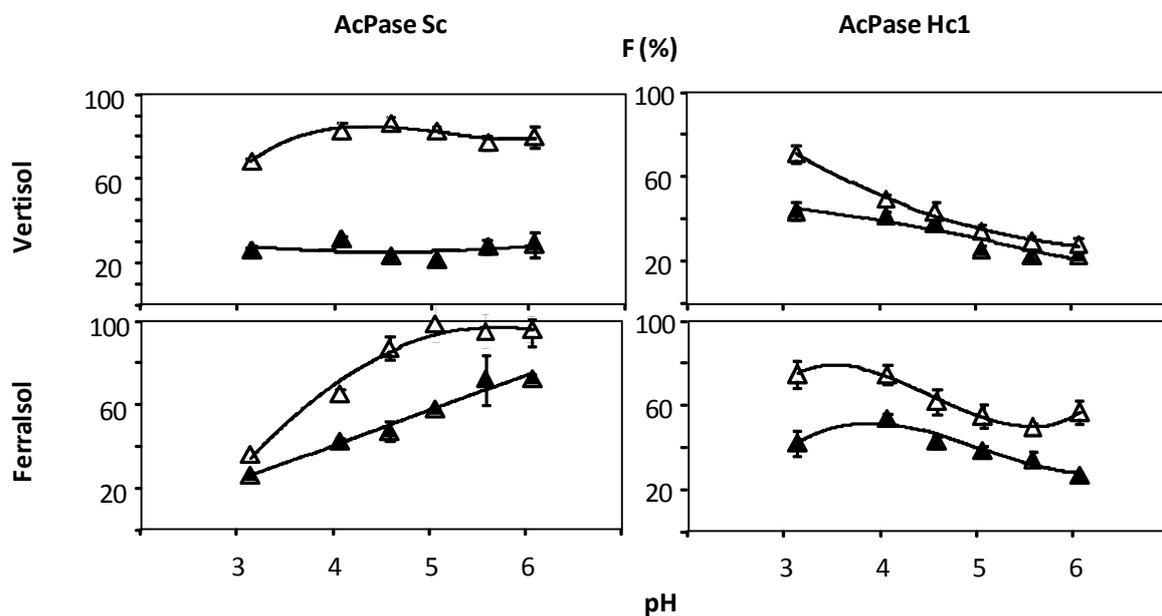


**Figure II-3:** Comparison adsorption and catalytic activity of each of the AcPases (Sc, Hc1 and Hc2) in contact with each of the four ferralsols as a function of pH: non-adsorbed fraction (F) and relative activity of the adsorbed enzyme (R) for F1 (○), F2 (□), F3 (◇) and F4 (△). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible.

It should be noted that the small proportion of adsorbed phosphatases diminishes the importance of the contribution of adsorbed phase activity. Although the differences in the values of R calculated for Hc1 phosphatase in contact with the ferralsols were never large, the trend with pH differs between soils. There was no variation of R with pH for F1, and this is also true for F4, whereas R increased with increasing pH for F2 and F3 from about 50% to 100%. There was no coherent trend of variation of R as a function of pH for Hc2 on any of the ferralsols. However the average value of R appeared to depend on the soil. However, given the very small proportion of adsorbed enzymes, the values of R calculated for F1, F2 and F3 must be subject to caution. The average value of R calculated for F4 was about 25%.

### 3.3. Effect of particle size of soil on adsorption of AcPases

**Figure II-4** shows the effect of soil particle size fraction on the free fraction of phosphatases of Sc and Hc1 in contact with the vertisol or the ferralsol F1 as a function of pH. The pH trends were always the same for both particle size fractions with any soil-enzyme combination. For each soil-enzyme combination, the free fraction was always larger and hence affinity smaller for the sand fraction than the clay fraction at every pH value, although for Hc1 in contact with the vertisol the difference was not significant (**Tableau II-5**). Data obtained for the sieved soil are not shown since the large proportion of clay in each soil dominated trends.



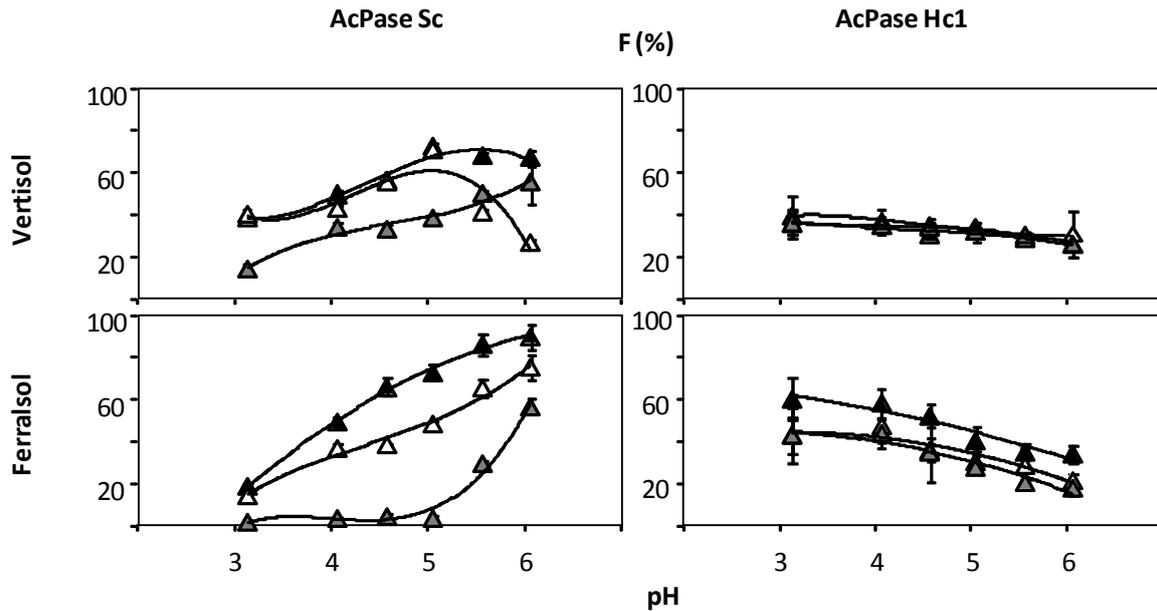
**Figure II-4:** Effect of soil particle size on adsorption of AcPase Sc and AcPase Hc1 as a function of pH: non-adsorbed fraction (F) with soil clay (closed symbol) and sand sized fraction (open symbol). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible.

**Tableau II-5** : Probability that curves of V as a function of pH are significantly different obtained using the Kolmogorov-Smirnov test

	curve	soil	Enzyme	
			Sc	Hc1
Comparison of soil particle size	V <sub>C</sub>	V	< 0.0001	0.132
		F1	0.0004	0.002
	V <sub>B</sub>	V	0.972	0.781
		F1	0.503	0.972
Comparison of soil DCB treatment	V <sub>C</sub>	V	0.275	0.781
		F1	0.002	0.056
	V <sub>B</sub>	V	0.132	0.781
		F1	0.503	0.964
Comparison of soil H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treatment	V <sub>C</sub>	V	0.0004	1.000
		F1	< 0.0001	0.007
	V <sub>B</sub>	V	0.275	0.972
		F1	0.781	0.781

### 3.4. Effect of chemical removal of soil coatings on phosphatase adsorption

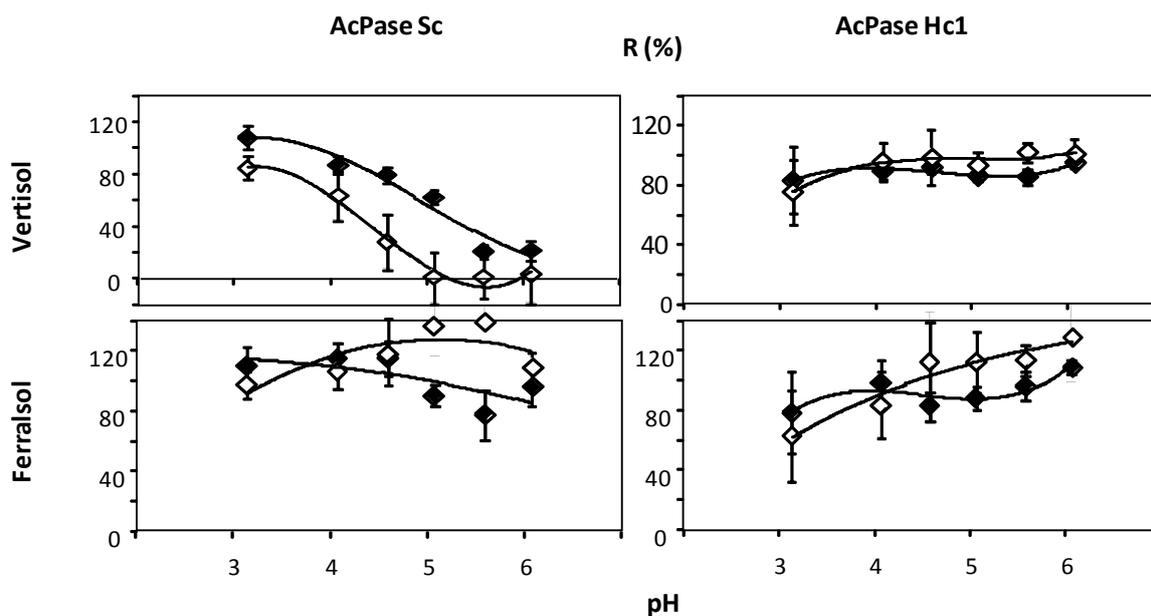
**Figure II-5** shows the effect of chemical removal of organic or mineral coatings from sieved soils (V and F1) on the F values of phosphatases Sc and Hc1 as a function of pH. Removal of mineral oxides from the vertisol had no effect on the affinity of Sc at the most acid pH, but led to a marked increase in affinity (decrease in free fraction) as pH was increased above 5. For the ferralsol there was a shift to lower values of F (increased affinity) throughout the range of pH studied. Removal of organic matter led to a fairly constant shift in F (-20 %) for the vertisol, but led to complete adsorption on the ferralsol for pH 3 – 5 and at larger pH adsorption decreased markedly, but remained greater than for the untreated soil. The effect of chemical treatments on the affinity of Hc1 was very different from that observed for Sc. Neither treatment had any significant effect for the vertisol whereas both treatments led to a decrease in F of about 20 % at all pH. The statistical tests (**Tableau II-5**) confirm that the chemical treatments had no effect on the adsorption of Hc1 on the vertisol and that in all other cases significant differences were observed between treated and untreated soils for both enzymes.



**Figure II-5:** Effect of chemical treatments of soils on adsorption of AcPase Sc and AcPase Hc1 as a function of pH: non-adsorbed fraction (F) with untreated soil (closed symbol), after DCB treatment (open symbol) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (shaded symbol). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible.

### 3.5. Effect of soil particle size on relative catalytic activity of adsorbed phosphatases

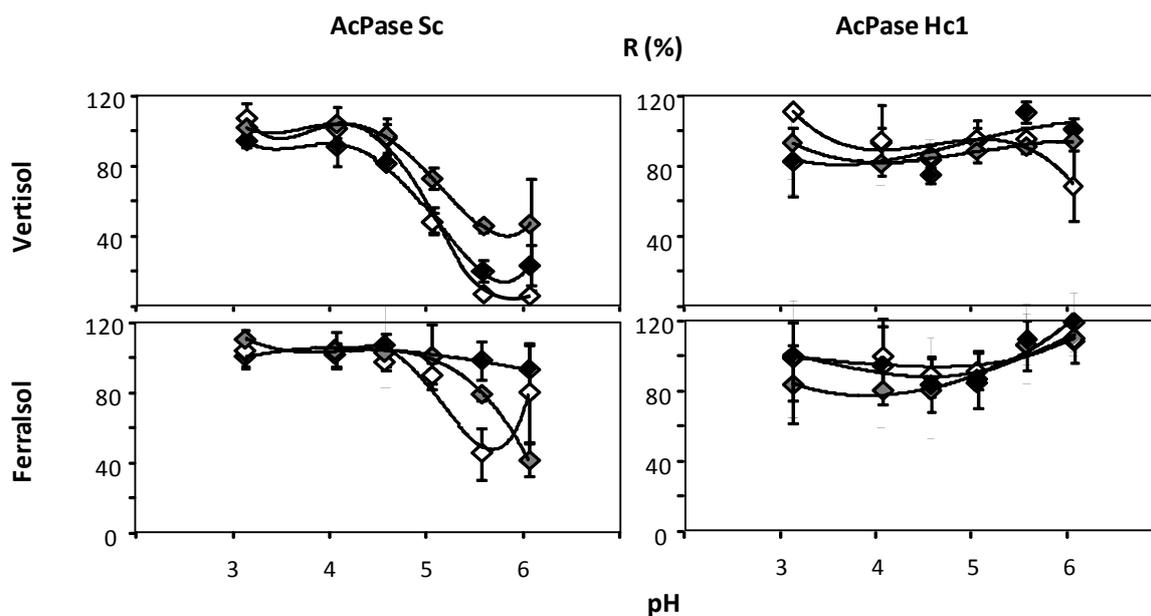
There was no significant difference in the pH profile of activity in solution and in suspension for Hc1 on either size fraction of either soil. Thus, the relative activity in the adsorbed phase, R, was 100 % for both clay-sized and sand-sized fractions. The relative activity of Sc in contact with either clay- or sand-sized fractions of the vertisol was also 100% throughout the pH range studied. Comparison of the curves  $V_B$  as a function of pH showed no significant probability that they differed for the different size fractions of either soil for either enzyme (**Tableau II-5**). However the markedly different affinities observed for Sc on the two size fractions of the vertisol were accompanied by differences in R (**Figure II-6**). For the clay-sized fraction, R decreased from about 100% at pH 3 to 30% at pH 6. Values of R for the sand-sized fraction were always about 20% smaller, falling from 80% to 0% over the same pH range.



**Figure II-6:** Effect of soil particle size on relative activity of adsorbed enzyme (R) of AcPase Sc and AcPase Hc1 as a function of pH. Closed symbols represent soil clay and open symbols sand sized fraction. Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible, given the symbol size.

### 3.6. Effect of chemical removal of organo-mineral coatings on relative activity in the adsorbed state

Comparison of  $V_B$  as a function of pH for each combination soil-enzyme showed that none of the chemical treatments had a significant effect on activity in suspension (**Tableau II-5**). For Sc in contact with the vertisol, chemical treatments changed the rate of decrease in R with increasing pH, as seen in **Figure II-7**, however the general trend was always of  $R=1$  at the most acid pH followed by a decline at pH above 4.5 or 5. Removal of organic matter protected the enzyme against the pH dependent loss of activity in the adsorbed state, whereas removal of mineral oxides had little effect until pH 5.5 or 6 when loss of activity was almost complete ( $R \sim 0$ ). Sc retained all catalytic activity on untreated ferralsol throughout the pH range. However both chemical treatments led to pH dependent decreases in relative catalytic activity,  $R \sim 40\%$  at pH 6. For enzyme Hc1, neither of the chemical treatments had a significant effect on  $V_B$  as a function of pH for either soil (**Tableau II-5**). In all cases, curves of  $V_B$  were not significantly different to those of  $V_A$  and thus  $R=1$  in all cases.



**Figure II-7:** Effect of chemical treatments of soils on relative catalytic activity of adsorbed enzyme (R) of AcPase Sc and AcPase Hc1 as a function of pH. Closed symbols represent untreated soil, open symbols after DCB treatment and shaded symbols H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible.

#### 4. Discussion

The most striking feature of the data presented in this study is that both surface affinity and relative activity in the adsorbed state show greater contrast between enzymes than between soils or soil fractions for a given enzyme. This diversity would contribute to the robustness of natural ecosystems to change, to heterogeneous conditions in time and space and to the multitude of functions required in a soil (Turner, 2008)

##### 4.1. pH dependence of affinity and adsorption mechanism

This is the first study to compare the affinity of different enzymes on contrasting soils over a range of pH. The affinity of each enzyme for all the soils studied was very similar, whether an average value of (1-F), or the value at pH 5.5 (often chosen as a reference pH when a single pH value is investigated) or the trend with pH is considered. The only notable exception being observed for *Suillus collinitus* phosphatases where F was constant with pH in contact with vertisol but increased throughout the pH range (decreasing affinity) with increasing pH in contact with the ferralsol. This relation is consistent with increased repulsion between like-charged surfaces and has previously been reported by Quiquampoix and co-workers for proteins at mineral surfaces (Helassa et al., 2009; Leprince and Quiquampoix, 1996). When surface coverage is high, especially in the case of values of maximum adsorption capacity, then a decline of adsorption is often observed below the isoelectric point (iep) of the protein (Quiquampoix and Ratcliffe, 1992; Staunton and Quiquampoix, 1994) due

to changes in protein conformation and resulting steric hindrance on the surface, but this effect is not expected for adsorption of trace amounts of protein.

Quiquampoix & Burns (2007) report contrasting affinity of three fungal phosphatases on a mineral surface, montmorillonite. In the case of *Suillus mediterraneensis* phosphatase adsorption was effectively complete over the entire pH range (2 - 8) and, in marked contrast, that of *Pisolithus arrhizus* remained in solution, whereas that of *Rhizopogon roseolus* showed pH-dependent adsorption, with strongest affinity at acid pH. The contrasts observed in that earlier work with a clay mineral are greater than those measured in this study for soil. Leprince & Quiquampoix (1996) reported different affinities of two isoenzymes of fungal phosphatases (*Hebeloma cylindrosporum*) for montmorillonite at low ionic strength (20 mM), and no marked differences at higher ionic strength (up to 280 mM). One of the isoenzymes (molecular mass 51 kDa, iep, 7.1) showed strong affinity with complete adsorption over the entire pH range (2 – 7) at low ionic strength, whereas the smaller isoenzyme (molecular mass 17 kDa, iep, 6.6) was completely adsorbed at the most acid pH, but affinity decreased above pH 5.5. George et al. (2007b) investigated the adsorption of trace amount of fungal phytases on three soils that differed in their texture, organic matter content and mineralogy. Phytase from *Aspergillus niger* was adsorbed on all three soils at pH 5.5, with a somewhat greater affinity for the sandy loam and clay loam soils than the sand soil. At pH 7.5, adsorption under standard conditions was smaller and only detectable on the clay loam. In marked contrast, no adsorption of *Peniophora lycii* phytase was detectable on any of the soils at either pH.

#### 4.2 Surface area and affinity

A causal relation could be postulated between clay content and hence specific surface area and the greater affinity of one enzyme for the clay loam than the sandy soil (George et al. 2007b) and for the clay-sized fraction in comparison to the sand-sized fraction (this study). However, although the adsorption capacity of a surface may be expected to depend on its specific surface area, as has been observed for enzymes and other proteins (George et al., 2007b; Helassa et al., 2009; Nannipieri et al., 1996), there is no simpler reason for affinity of a trace amount of protein to be a function of specific surface area. We found little relation between specific surface area, as measured by BET isotherms and reported in **Tableau II-2** and affinity as assessed by (1-F). Surface area of the vertisol was greater than that of ferralsol, F1, but this was not followed by a systematically larger affinity for the former. The DCB treatment tended to decrease surface area, as previously reported for kaolinites (Sei et al., 2002) but did not lead to decreases in affinity. Destruction of organic matter led to increased surface area but while increase in affinity of either enzyme for the soils was sometimes observed, it was not always significant. Only in the case of particle size was the difference in affinity consistently in line with changed surface area: for each soil-enzyme combination adsorption and thus affinity were greater on clay-sized fraction than on sand-sized fractions. The greater affinity of the enzymes for the clay-sized fraction of each soil agrees with the observation of Marx et al. (2005) who found that soil phosphatases were accumulated in the clay-sized fraction of a soil in preference to coarser size fractions. However in that study,

other enzymes were not accumulated in the clay-sized fraction so the observation may be due in part to the accumulation of natural substrate in certain size fractions, and not solely to accumulation of secreted enzymes.

#### **4.3. Effect of organo-mineral coatings on enzyme affinity for surfaces**

Despite differences in organic matter content and CBD-extractable Fe in the ferralsols, in which the principal mineral was kaolinite, each of the enzymes showed very similar affinities for each of the four ferralsols studied. This suggests that the effect of the organo-mineral coatings on affinity was small. Nevertheless removal of organic matter from soil tended to enhance the affinity of the enzymes for the surfaces. The effect was greater for the ferralsol, particularly at the more acid pH and greater for the *Suillus* than the *Hebeloma* enzymes. The contrast between enzymes illustrates that the effect does not simply arise from a mechanical creation of new adsorption sites by dispersion or the liberation of sites previously occupied by organic molecules. The clay mineral fraction of ferralsols is usually dominated by kaolinite, and it is interesting to note that Sc also showed a very strong affinity for pure mineral St Austell kaolinite (data not shown) with almost complete adsorption for pH in the range 3 – 4.5. The smaller effect on the vertisol could reflect the recalcitrance of organic matter in this soil, with only a small proportion of organic matter being removed (25%, see (Mikutta et al., 2005) for a review of chemical removal of organic matter from soils). There are limited published data on the effect of organic matter on either the adsorption maximum or the affinity of small amounts of enzyme on mineral surfaces. Previous results from this group (Quiquampoix, 1987b; Quiquampoix et al., 1995) led us to expect a protective effect of organic matter, with chemical removal of organic matter leading to enhanced affinity and adsorption capacity. Huang et al. (2005) report very little effect on adsorption capacity and small increases in affinity of potato acid phosphatases as deduced from the shape of the Langmuir isotherm fitted to adsorption data when soil organic matter was oxidized from either the fine or coarse clay fraction of a red soil (Ultisol with a dominant kaolin clay fraction). Yan et al. (2010) report little effect of organic matter destruction on the Langmuir affinity parameter for  $\beta$ -glucosidase on soil clay.

#### **4.4. Relative activity of adsorbed phosphatase**

Changes in activity after adsorption may result from changes in conformation and from preferred orientation of the active site. When changes in activity between the solution and adsorbed phase are reported for soils and soil minerals, in most cases there is no change or a reduction in activity (George et al., 2007b; Huang et al., 2009; Kelleher et al., 2004; Lammirato et al., 2010; Leprince and Quiquampoix, 1996; Shindo et al., 2002; Yan et al., 2010). A notable exception is the enhanced activity reported for an acid phosphatases adsorbed on allophane (Rosas et al., 2008). Calculated values of R may be averages of a range of values resulting from difference conformations or orientations but this point has never been experimentally investigated. As for affinity, a measurement of R made at a single pH value could give an erroneous image of the enzyme surface interaction. We have observed markedly different pH dependence of R: constant at about 100 %, initially 100 then a decrease after a

threshold pH, or increase with increasing pH. A comparison of R values made at a single pH, for example 5 or 5.5, would not have shown such contrasting patterns. Leprince & Quiquampoix (1996) observed that F and R followed similar trends with pH, which could have been interpreted as a relationship between affinity and strength of interaction. In contrast, this study did not show any shared pattern between F and R for different enzyme-mineral pairs. It is striking that in nearly every case the value of R at the optimal pH was about 100%, the only clear exception being for Sc on vertisol. This would suggest that these fungal enzymes are particularly well adapted to the presence of soil minerals. Adsorption which may confer protection against microbial degradation and which limits mobility thereby enhancing the probability that their catalytic activity favours the organism that produced it, does not alter its catalytic efficiency.

Particle size did not modify the pH dependence of R. In all cases when R~100% for whole soil or soil clay, the same was observed for the sand fraction. In the case of Sc in contact with vertisol sand or clay, a decrease in R was observed with increasing pH, but the value of R for sand fraction was always lower by about 20%. Given the much smaller surface area of the sand fraction than the clay, the surface coverage and surface saturation would have been greater on the sand than the clay. This may explain the greater inhibition on sand. Other studies have observed a similar texture effect on activity loss after adsorption on soil clay, albeit when comparing clay and fine clay (0.2 - 2 $\mu$ m and < 0.2  $\mu$ m) and at much greater surface coverages, approaching surface saturation (Huang et al., 2005; Yan et al., 2010).

#### **4.5. Effect of organo-mineral coatings on adsorbed phosphatase activity**

The different pH trends of R observed for the four ferralsols did not follow the same patterns as either organic carbon or CBD-extractable Fe and so cannot be used to elucidate the effect of organo-mineral coatings. Neither chemical treatment to remove organo-mineral coatings had any effect on the value of R for Hc1 in contact with either soil, which remained at 100 % throughout the pH range. Both treatments led to the value of R for *Suillus* enzyme in contact with soil F1 to fall markedly at pH above 5, in contrast to the untreated soil where R had remained stable. Removal of organic matter from the vertisol led to some protections of the activity of S, with a greater proportion of activity being maintained at near-neutral pH. This protective effect of organic matter has been reported both by this group and others (Giaveno et al., 2010; Quiquampoix, 1987b; Quiquampoix et al., 1995; Rao and Gianfreda, 2000). But other studies suggest an inhibitory effect of organic matter, both in solution and in solid state (Huang et al., 2005; Rosas et al., 2008; Vuorinen and Saharinen, 1996).

However the protective effect is clearly not a general effect. It depends on both the soil and the enzyme. It must also depend on the nature of the organic coating removed and the extent of the removal, but further work would be required to investigate this point. Interestingly, there is no link between the change in affinity and the resulting variation in R. Increased affinity, particularly on ferralsol, was not accompanied by stronger interaction and loss of activity. Chemical removal of soil organic matter had no effect on the activity of Hc1

phosphatase which maintained its activity after adsorption on either soil, whereas contrasting effects for Sc phosphatase were observed, particularly at near neutral pH on the two soils.

### **Conclusion**

Both the affinity of fungal phosphatases for tropical soils and subsequent decrease in catalytic activity after adsorption show considerable diversity. In some cases affinity and relative activity in the adsorbed state varied with pH and so observations made at a single pH value, as is often the case in other studies, may not give a complete representation of interactions. Affinity varied greatly between enzymes, even between enzymes obtained from the two strains of *H. cylindrosporum*. Only *Suillus* phosphatases showed markedly different affinities for ferralsol and vertisol. In general, adsorbed phosphatases retained a large proportion of their catalytic activity over the whole pH range studied. Only *Suillus* phosphatase adsorbed on the vertisol showed a marked decrease in R with increasing pH. Enzymes would thus be efficient after secretion into soil. Only a detailed knowledge of the structure of each enzyme could elucidate its interaction with organo-mineral surfaces or allow a reliable prediction of the extent of interaction. There was no relationship between the affinity of an enzyme for a surface and the resulting change in activity.

### **Acknowledgements**

The authors thank Catherine Pernot who maintains the fungal collection and Bernard Barthes who helped to select soil samples and Benoît Cloutier-Hurteau for advice on statistical analysis.

## References cited

- Allison, S., 2006. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry* 81, 361-373.
- Barthès, B.G., Kouakoua, E., Larré-Larrouy, M.-C., Razafimbelo, T.M., de Luca, E.F., Azontonde, A., Neves, C.S.V.J., de Freitas, P.L., Feller, C.L., 2008. Texture and sesquioxide effects on water-stable aggregates and organic matter in some tropical soils. *Geoderma* 143, 14-25.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cairney, J., 2011. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil* 344, 51-71.
- Chevallier, T., Voltz, M., Blanchart, E., Chotte, J.L., Eschenbrenner, V., Mahieu, M., Albrecht, A., 2000. Spatial and temporal changes of soil C after establishment of a pasture on a long-term cultivated vertisol (Martinique). *Geoderma* 94, 43-58.
- George, T.S., Quiquampoix, H., Simpson, R.J., Richardson, A.E., 2007a. Interactions between phytases and soil constituents: implications for the hydrolysis of inositol phosphates, In: Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J. (Eds.), *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*. Cabi, Wallingford UK, pp. 221-241.
- George, T.S., Simpson, R.J., Gregory, P.J., Richardson, A.E., 2007b. Differential interaction of *Aspergillus niger* and *Peniophora lycii* phytases with soil particles affects the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 793-803.
- Giaveno, C., Celi, L., Richardson, A.E., Simpson, R.J., Barberis, E., 2010. Interaction of phytases with minerals and availability of substrate affect the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 491-498.
- Harrison, A.F., 1987. *Soil organic phosphorus. A review of world literature*. CAB International, Wallingford, Oxon. UK, 257pp. pp.
- Helassa, N., Quiquampoix, H., Noinville, S., Szponarski, W., Staunton, S., 2009. Adsorption and desorption of monomeric Bt (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 498-504.
- Huang, Q., Liang, W., Cai, P., 2005. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 209-214.
- Huang, Q., Zhu, J., Qiao, X., Cai, P., Rong, X., Liang, W., Chen, W., 2009. Conformation, activity and proteolytic stability of acid phosphatase on clay minerals and soil colloids from an Alfisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74, 279-283.
- Kelleher, B.P., Willeford, K.O., Simpson, A.J., Simpson, M.J., Stout, R., Rafferty, A., Kingery, W.L., 2004. Acid phosphatase interactions with organo-mineral complexes: influence on catalytic activity. *Biogeochemistry* 71, 285-297.
- Kouakoua, E., Larre-Larrouy, M.C., Barthes, B., de Freitas, P.L., Neves, C., Sala, G.H., Feller, C., 1999. Relationship between aggregate stability and total and hot-water-

- extractable organic matter in clayey ferrallitic soils (Congo, Brazil). *Canadian Journal of Soil Science* 79, 561-569.
- Kouakoua, E., Sala, G.-H., Barthès, B., Larre-Larrouy, M.-C., Albrecht, A., Feller, C., 1997. La matière organique soluble à l'eau chaude et la stabilité de l'agrégation. Aspects méthodologiques et application à des sols ferrallitiques du Congo. *European Journal of Soil Science* 48, 239-247.
- Lammirato, C., Miltner, A., Wick, L.Y., Kästner, M., 2010. Hydrolysis of cellobiose by [beta]-glucosidase in the presence of soil minerals - Interactions at solid-liquid interfaces and effects on enzyme activity levels. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 2203-2210.
- Lavkulich, L.M., Wiens, J.H., 1970. Comparison of Organic Matter Destruction by Hydrogen Peroxide and Sodium Hypochlorite and Its Effects on Selected Mineral Constituents. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 34, 755-758.
- Leprince, F., Quiquampoix, H., 1996. Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- Marx, M.C., Kandeler, E., Wood, M., Wermbter, N., Jarvis, S.C., 2005. Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 35-48.
- McLaren, A.D., Estermann, E.F., 1957. Influence of pH on the activity of chymotrypsin at a solid-liquid interface. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 68, 157-160.
- Mehra, O.P., Jackson, M.L., 1960. Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clay Minerals* 7, 317-327.
- Mikutta, R., Kleber, M., Kaiser, K., Jahn, R., 2005. Review: Organic matter removal from soils using hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, and disodium peroxodisulfate. *Soil Science Society of America Journal* 69, 120-135.
- Morizet, J., Mingeau, M., 1976. Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato .1. role of nutrients. *Annales Agronomiques* 27, 183-205.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P., 1996. Humus and Enzyme Activity, In: Alessandro, P. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 293-328.
- Quiquampoix, H., 1987a. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a b-D-glucosidase on different mineral surfaces. *Biochimie* 69, 753-763.
- Quiquampoix, H., 1987b. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. II. Competitive effects on the adsorption of a b-D-glucosidase in mixed mineral or organo-mineral systems. *Biochimie* 69, 765-771.
- Quiquampoix, H., 2000. Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil, In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.). *Marcel Dekker*, New York, pp. 171-206.

- Quiquampoix, H., Abadie, J., Baron, M.H., Leprince, F., MatumotoPintro, P.T., Ratcliffe, R.G., Staunton, S., 1995. Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces. *A.C.S. Symposium Series* 602, 321-333.
- Quiquampoix, H., Burns, R.G., 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* 3, 401-406.
- Quiquampoix, H., Mousain, D., 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 89-112.
- Quiquampoix, H., Ratcliffe, R.G., 1992. A  $^{31}\text{P}$  NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation  $\text{Mn}^{2+}$ : modification of conformation with pH. *Journal of Colloid and Interface Science* 148, 343-352.
- Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.H., 2002. Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 285-306.
- Rao, M.A., Gianfreda, L., 2000. Properties of acid phosphatase-tannic acid complexes formed in the presence of Fe and Mn. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1921-1926.
- Rao, M.A., Gianfreda, L., Palmiero, F., Violante, A., 1996. Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. *Soil Science* 161, 751-760.
- Rao, M.A., Violante, A., Gianfreda, L., 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1007-1014.
- Razafimbelo, T., Barthès, B., Larré-Larrouy, M.-C., Luca, E.F.D., Laurent, J.-Y., Cerri, C.C., Feller, C., 2006. Effect of sugarcane residue management (mulching versus burning) on organic matter in a clayey Oxisol from southern Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 115, 285-289.
- Rosas, A., de la Luz Mora, M., Jara, A.A., López, R., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2008. Catalytic behaviour of acid phosphatase immobilized on natural supports in the presence of manganese or molybdenum. *Geoderma* 145, 77-83.
- Rowell, D.L., 1994. *Soil science: methods and applications*. Longman Group Limited, Longman Scientific & Technical, Harlow UK, 350 pp.
- Sei, J., Jumas, J.C., Olivier-Fourcade, J., Quiquampoix, H., Staunton, S., 2002. Role of iron oxides in the phosphate adsorption properties of kaolinites from the Ivory Coast. *Clays and Clay Minerals* 50, 217-222.
- Shindo, H., Watanabe, D., Onaga, T., Urakawa, M., Nakahara, O., Huang, Q.Y., 2002. Adsorption, activity, and kinetics of acid phosphatase as influenced by selected oxides and clay minerals. *Soil Science and Plant Nutrition* 48, 763-767.
- Staunton, S., Quiquampoix, H., 1994. Adsorption and Conformation of Bovine Serum Albumin on Montmorillonite: Modification of the Balance between Hydrophobic and

- Electrostatic Interactions by Protein Methylation and pH Variation. *Journal of Colloid and Interface Science* 166, 89-94.
- Turner, B.L., 2008. Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. *Journal of Ecology* 96, 698-702.
- Vuorinen, A.H., Saharinen, M.H., 1996. Effects of soil organic matter extracted from soil on acid phosphomonoesterase. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1477-1481.
- Yan, J., Pan, G., Li, L., Quan, G., Ding, C., Luo, A., 2010. Adsorption, immobilization, and activity of [beta]-glucosidase on different soil colloids. *Journal of Colloid and Interface Science* 348, 565-570.

## **Chapitre III:**

**Evolution of catalytic activity of two acid phosphatases from ectomycorrhizal fungi incubated with three tropical soils**

### **Chapitre III: Evolution of catalytic activity of two acid phosphatases from ectomycorrhizal fungi incubated with three tropical soils**

---

#### *Avant propos*

Le chapitre précédent a montré une diversité de comportement des phosphatases fongiques dans leur affinité pour les fractions des sols tropicaux mais aussi dans leur activité enzymatique à l'état adsorbé. Il a surtout permis de révéler une différence d'affinité pour les surfaces entre les enzymes d'espèces différentes ou de la même espèce de champignon, parfois fortement dépendante du pH. En outre, ces phosphatases ont généralement maintenu leur activité catalytique à l'état adsorbé. Ces enzymes peuvent être plus efficaces dans la nutrition phosphatée dans les sols si, en plus de maintenir leur activité à l'état adsorbé, elles présentaient une forte résistance à la dégradation au cours du temps. Des études précédentes ont indiqué que l'adsorption des enzymes pouvait les protéger de la dégradation microbienne et augmenter leur rémanence dans les sols. Parmi les raisons avancées pour expliquer cet effet de l'adsorption, il y a le fait que: (i) l'adsorption peut modifier la conformation des enzymes de sorte à leur conférer une structure plus rigide et plus résistante à la dégradation, et (ii) les enzymes seraient protégées de la dégradation physique en se logeant dans les micropores de la matière organique pour échapper aux protéases.

L'objectif de ce chapitre était de comparer l'évolution au cours du temps de l'activité enzymatique de deux phosphatases acides fongiques (utilisées dans le chapitre 2), ayant des comportements contrastés, sur deux types de sols tropicaux. Cette étude a été menée en fonction de la stérilisation ou de la teneur en matière organique des sols en tenant compte de l'activité enzymatique native des sols. L'évolution de l'activité des enzymes en solution a servi de témoin à celle des enzymes ajoutées aux sols. Les résultats des travaux de ce chapitre ont fait l'objet d'un deuxième projet de publication accepté au journal *Soil Biology and Biochemistry*.

## Evolution of catalytic activity of two acid phosphatases from ectomycorrhizal fungi incubated with three tropical soils

Authors: Brice Kedi<sup>a,b</sup>, Joseph Sei<sup>b</sup>, Hervé Quiquampoix<sup>a</sup>, Siobhán Staunton<sup>a</sup>

Affiliation: <sup>a</sup>INRA, UMR Eco & Sols, INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France; and <sup>b</sup>LCMI, UFR SSMT, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Correspondence: Siobhán Staunton, tel: 33(0)499 61 23 31, fax : 33(0)499 61 30 88, staunton@montpellier.inra.fr.

### Abstract

Catalytic activity of extracellular enzymes in soil controls many biogeochemical cycles. The efficiency of extracellular enzymes depends on their interaction with soil organo-mineral surfaces and their resistance to degradation and inactivation. Little is known about the factors that control the time dependence of enzyme activity in soil. We have measured the evolution during incubation of up to one month of the catalytic activity of native and added phosphatase in moist soil. Two fungal phosphatases and three tropical soils (two Acrisols with contrasting organic matter content and a Vertisol) were compared and the effect of soil sterilisation measured. Activity of *Hebeloma cylindrosporum* phosphatase was protected in Acrisols, but not in contact with the Vertisol. In contrast, the kinetics of decline of activity of *Suillus collinitus* phosphatase followed the same trend in solution and in the presence of each of the soils. Sterilisation decreased native phosphatase activity. The rate of decline of added phosphatase activity was identical in sterile and non-sterile soils. We discuss the effects of degradation of the enzyme in soil and changing relative activity in the adsorbed state.

### Highlights

- Activity of two fungal phosphatases declined differently in solution
- Decline of activity of fungal phosphatase in moist soil depends on soil and enzyme
- Native soil phosphatase activity was constant during one-month incubation
- Sterilization decreased native phosphatase activity
- Degradation and changing activity in the adsorbed state may contribute to decline

**Keywords:** phosphatase, protection, degradation, Vertisol, Acrisol, Ferralsol, Oxisol, adsorption, *Suillus collinitus*, *Hebeloma cylindrosporum*, sterilization, incubation

## 1. Introduction

Phosphorus deficiency is frequently a major limiting factor for plant growth and crop production in soils (Nziguheba and Bunemann, 2005). Tropical soils are often highly weathered with low levels of available phosphorus. The mineralisation of organic phosphorus may play an important role in the acquisition of phosphorus (Turner and Engelbrecht, 2011; Vance et al., 2003) and this is in turn determined by the catalytic activity of extracellular phosphatases. Phosphatases are produced and secreted in soil by plants (Coello, 2002), bacteria (Palacios et al., 2005) and fungi including ectomycorrhizal fungi (Cairney, 2011; Quiquampoix and Mousain, 2005). The efficiency of these enzymes after release into soil depends on their interaction with soil mineral (Quiquampoix, 1987a) or organo-mineral (Quiquampoix, 1987b) surfaces, their activity after adsorption and their stability against microbial and chemical breakdown.

Like other proteins, enzymes have an affinity for solid surfaces on which they are often adsorbed (Norde and Lyklema, 1991). Adsorption on soil components may reduce enzyme affinity for substrate and inhibit enzyme activity by modification of their conformation (Servagent-Noinville et al., 2000) or orientation of their active site (Baron et al., 1999; Quiquampoix et al., 2002). Some authors report that soil or mineral surface charge and the isoelectric point of the enzyme are the key factors affecting adsorption because of the importance of electrostatic forces (Giaveno et al., 2010; Quiquampoix et al., 1993; Staunton and Quiquampoix, 1994). Adsorption can sometimes be strong and inhibition of enzyme activity may be irreversible (Leprince and Quiquampoix, 1996). The amount of enzyme adsorbed and the subsequent catalytic activity may depend on the nature of the surface on which enzymes are immobilised (Rao et al., 1996; Rao et al., 2000; Rosas et al., 2008). In addition, adsorption and catalytic behaviour of enzymes also differ depending on their origin and their biochemical characteristics. Extracellular phosphatases from different ectomycorrhizal fungi have been shown to differ in their adsorption and catalytic activity on the montmorillonite (Quiquampoix and Burns, 2007; Quiquampoix and Mousain, 2005). We have recently shown that fungal phosphatases retain a large proportion of their catalytic activity after adsorption on tropical soils, and this over a large range of pH (chapter 2).

Adsorption may contribute to the protection of enzymes against microbial degradation and thus enhance their long-term survival (George et al., 2005). There are several possible reasons for this enhanced stability over time. Changes in conformation and the imposition of a more rigid conformation may afford some degree of protection. Immobilised enzymes in soil may also be physically protected against proteases by their location in fine pores or clay interlayers where they remain accessible to substrates (Nannipieri et al., 1996). In a few cases the opposite has been observed, with immobilised enzymes having less stability and less resistance to protease attack than free enzymes (Carrasco et al., 1995). Enzymes can also be protected from protease when adsorbed on the interlayer spaces of soil clays. Soil enzymes may resist temperature shock and even autoclaving, but the protection appears to be more effective in smectic soils than kaolinite soils. (Carter et al., 2007).

The aim of this paper is to compare the evolution of native and added acid phosphatase in three tropical soils (one vertisol and two acrisols) under controlled conditions. The extracellular enzymes obtained from two ectomycorrhizal fungi (*Suillus collinitus* and *Hebeloma cylindrosporum*) have previously been shown to have markedly different interactions with soils. The interaction of these phosphatases with soil colloids has been the subject of a previous study that highlighted their different adsorption and catalytic activity behaviour (chapter 2). The effect of soil sterilisation by autoclaving was also measured to assess the relative roles of abiotic and biotic breakdown of added enzymes.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Phosphatase preparation

Two acid phosphatases with different behaviours on solid surfaces (chapter 2) were selected. They are produced by two strains of ectomycorrhizal fungi (Sc: *Suillus collinitus*, laboratory code J3.15.35, Hc: *Hebeloma cylindrosporum*, laboratory code D3.25.2). First, fungi were grown on solid standard medium (agar, 16 g/L) in Petri dishes (90 mm diameter) at 25° C in the dark for four weeks (28 days). Then, 100 plugs of each strain were grown in a sterile liquid medium (25 mL in each flask) at 25°C in the dark for 30 days. The composition of liquid medium and solid medium (except agar) was: 0.1 mM NaCl; 4 mM KNO<sub>3</sub>; 1 mM KCl; 2 mM NH<sub>4</sub>Cl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.3 µM thiamine- HCl; 1% ferric citrate; 3.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 g/L glucose; micronutrients as recommended by Morizet and Mingeau (1976). The growth media were autoclaved at 120°C for 20 min. At the end of the growth period, nutrient solution was filtered with Vileda-Mop membrane to remove debris. Polyphenols, which are known to be enzyme activity inhibitors, were removed by adding polyvinylpyrrolidone (PVPP, Sigma, P-6755) (7 mg/mL nutrient solution). After 30 min, the nutrient solution was centrifuged at 23 000 g for 15 min to remove the PVPP.

These partially purified nutrient solutions were desalted and concentrated (5 times for Sc (*Suillus collinitus*) and 25 times for Hc (*Hebeloma cylindrosporum*)) using a Centricon plus-70® centrifugal filter device with a 30-kDa molecular weight cutoff membrane (Millipore). Concentrated samples were frozen until used for incubation and defrosted slowly at 4°C to minimize loss of activity as indicated by preliminary experiments.

### 2.2 Soil and soil treatments

Three soil samples from two tropical regions were selected in Eco & Sol unit collection: one vertisol (V) from Sainte Anne (Martinique, French West Indies) and two acrisols (A1 and A2) from the same site in Matão (Brazil). Acrisols were collected at different dates: A1 had a larger organic matter content and was taken before burning of crop residues and A2 was taken later. These soils have already been the subject of other studies and some of their characteristics are summarized in **Tableau III-1**. After removal of organic debris, the air-dried soils were crushed and sieved to 200 µm. Part of the soils was sterilized by

autoclaving three times at 120°C for 20 min on three successive days, then a fourth time four months later, prior to the incubation.

### 2.3 Soil microcosms preparation and incubation

Microcosms (200 mg of soil) were prepared by wetting soil to give a moisture tension of -25 kPa (pF 2.4) with concentrated phosphatase solution to obtain about 2 nKatal g<sup>-1</sup> soil or Milli-Q water (for measurement of native phosphatases activity). The required moisture content of each soil was determined in preliminary experiments. For each treatment and incubation period, microcosms were prepared in triplicate plus a control. Microcosms were sealed and incubated at 25°C. Phosphatase solutions without soil were also incubated for each incubation period.

### 2.4 Phosphatase activity measurements

After different incubation periods (2 hours, 3 days, 10 days, 17 days and 33 days), soils were destructively sampled and enzyme activity was measured. Soils were suspended in solution containing the substrate *para*-nitrophenyl phosphate (pNPP) (final concentration, 6 mM) at the optimum pH for each enzyme (pH 4 for Sc and pH 5.5 for Hc). The buffer solution, sodium acetate (final concentration 100 mM) had been adjusted to the required pH by addition of HCl. Reaction media were shaken end-over-end at 25°C for 20 min. The reaction was stopped with an excess of glycine-NaOH buffer (pH 10.5) whose composition was: 133 mM glycine, 125 mM NaOH, 67 mM NaCl, 83 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. After stopping the reaction, soil and solution were separated by centrifugation at 23 000 g for 15 min. This step was done immediately to avoid solubilisation of coloured humic substances in the solution. The hydrolysis product reaction of pNPP, *para*-nitrophenol, was measured by spectrophotometry at 405 nm.

### 2.5 Expression of results

Enzyme activity was expressed as velocity (V) of the reaction in mole of product produced per second (Katal). Activity of native phosphatase was calculated from the soils with no added phosphatase. The activity of added phosphatase was obtained by subtracting the value of native phosphatase activity. Phosphatase activities in solution or in soils and native activity of soils were plotted as a function of incubation period.

### 2.6 Statistical analyses

All data for phosphatase activity are presented as the mean of 3 replicates and error bars are represented on both sides of the mean. Significant differences were determined using ANOVA (p <0.05) by the software R version 2.11.0.

1 **Tableau III-1:** Some properties of the soils studied

Soil	Depth (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	Corg (gKg <sup>-1</sup> )	Soil type ( <i>parent material</i> )	Soil texture	Land-use	Localisation latitude/longitude	Reference
V	0-10	6-6.5	24.4	Leptic Hapludert <sup>a</sup> <i>Eutric Vertisol</i> <sup>b</sup>	Clayey	Melon	14°25'N/ 60°53'W	(Chevallier et al., 2000)
A1	0-5	7.4	16.2	Typic Hapludult <sup>c</sup> <i>Orthic</i> <i>Acrisol</i> <sup>d</sup> (sandstone)	Sandy clay loam	Sugarcane	21°36'S/ 48°22'W	(Barthès et al., 2008)
A2	0-5	7.4	12.4	Typic Hapludult <sup>c</sup> <i>Orthic</i> <i>Acrisol</i> <sup>d</sup> (sandstone)	Sandy clay loam	Sugarcane (residue burning)	21°36'S/ 48°22'W	(Barthès et al., 2008)

2 a: Soil Survey Staff (1999) ; b: FAO-ISRIC-ISSS (1998)

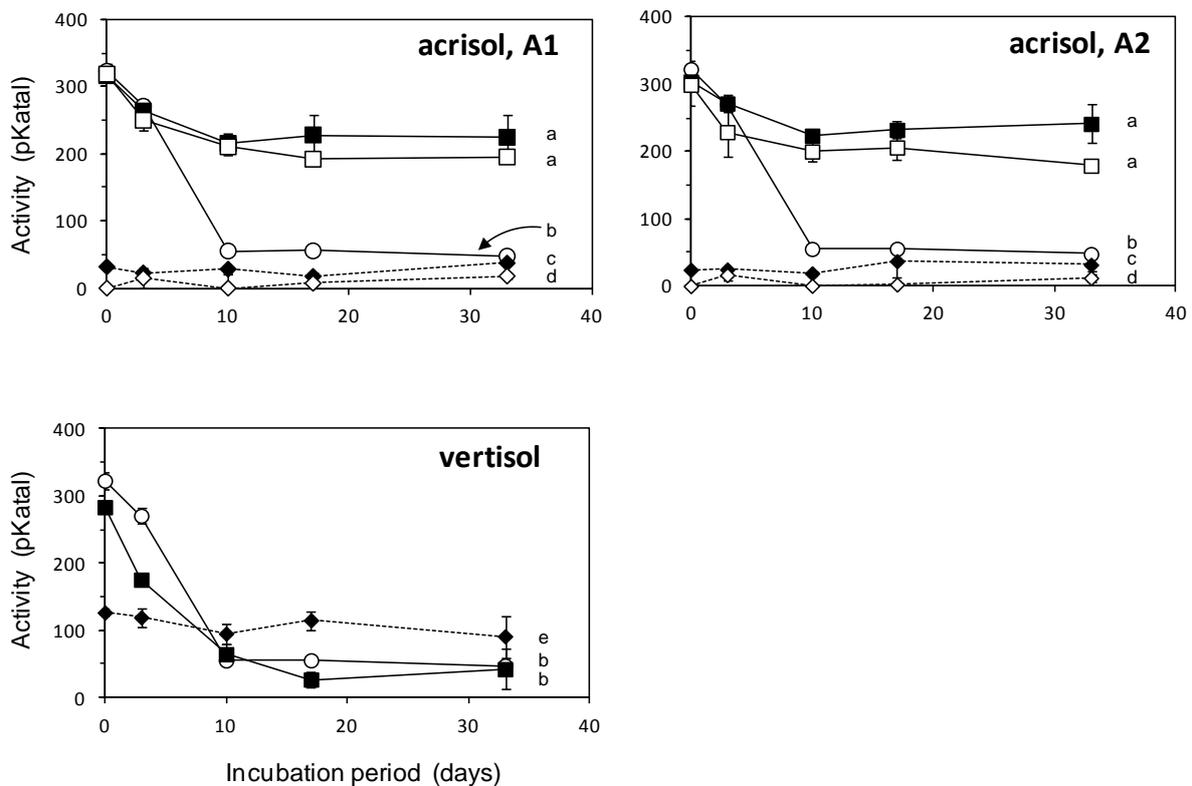
3 c: Soil Survey Staff (1975) ; d: FAO-ISRIC-ISSS (1988)

4

### 3. Results

#### 3.1. Evolution of Hc acid phosphatase activity in solution and in contact with soil

**Figure III-1** shows the evolution of activity of Hc acid phosphatase, AcPase, in solution in the presence of soils, sterilised or not, as a function of the period of incubation at 25°C. The activity of native soil phosphatase at pH 5.5 is also shown. For ease of comparison, some of the data is also given in **Tableau III-2**. At t=0 (2 hours) there was no significant difference between activity in solution and in the presence of either acrisol, confirming previous observations that all activity is maintained after adsorption on this enzyme on acrisol (chapitre 2).



**Figure III-1:** Activity of acid phosphatases *Hebeloma cylindrosporum* (Hc) as function of incubation period at 25°C, in solution (○), immobilised on sterilised soil (□) and on non-sterilised soil (■). Native phosphatase activity at pH 5,5 from sterilised soils (◇) and non-sterilised soils (◆). Top figures, acrisols, A1 and A2. Bottom figure, vertisol. Error bars indicate variability calculated from triplicate incubations. Curve bearing the same letters were not significantly different ( $P < 0.05$ )

In the presence of the vertisol, the activity was lower than in solution at t=0, indicating some loss of activity in the adsorbed state. The activity of Hc in solution declined rapidly over the first 10 days of the incubation to about 15% of its initial activity, and thereafter changed little. In the presence of either acrisol, the evolution of Hc activity was markedly different. The decline over the initial 10-day period was much less, about 70 % of the initial activity remained, but as in solution, there was little further decline in the following 3 weeks. There

was no statistically significant difference between the evolutions of Hc on the two acrisols. Although there was no difference in activity at  $t = 0$  between sterilized and non sterile soils (for either acrisol) the activity of added Hc was always slightly greater in non-sterile soil than sterile soil. The evolution of Hc activity in the presence of the vertisol was markedly different from the acrisols. The decline in activity followed the same trend as in solution, with a rapid decline over the first 10 days. After 10 days, the difference between solution activity and activity in the presence of vertisol, attributed to loss of activity in the adsorbed state, was no longer significant. Native phosphatase activity was much greater in the vertisol than in the acrisols and there was no significant difference in native activity between the two acrisols. There was no significant evolution of native activity over the incubation period for any of the soils. Native activity was always slightly greater in non-sterile soils than sterile soils, suggesting a small loss due to autoclaving. Data for sterilized vertisol are not shown as the autoclaved soil was difficult to rewet homogeneously and to disperse in suspension, leading to highly variable results. We also noted the release of coloured compounds interfering with the measurement of the hydrolysis product.

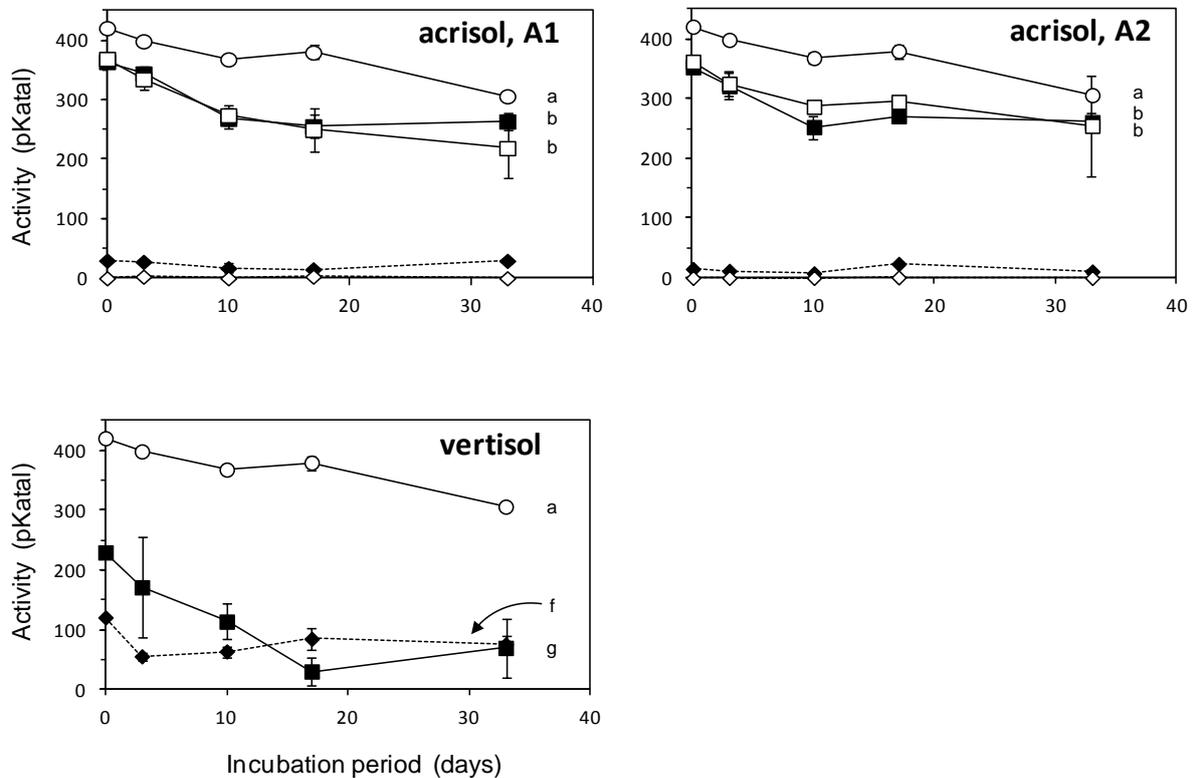
**Tableau III-2:** Initial and final activity of added phosphatases in solution and in contact with either soi, sterilised or not. Also shown, initial activity as a fraction of initial activity added and final activity relative to the initial activity for the same treatment. Also shown, native phosphatase activity in soil.

		Initial activity (2h)		Activity after 33 days	
		(pKat)	% of init act. in sol.	(pKat)	% of init. act.
AcPase Hc (activity at pH5,5)	En solution	323	100	48	15
	Vertisol_NS	283	88	42	15
	Acrisol A1_NS	316	98	244	77
	Acrisol A1_St	318	99	195	61
	Acrisol A2_NS	304	94	241	79
	Acrisol A2_St	299	93	179	60
AcPase Sc (activity at pH4)	In solution	420	100	306	73
	Vertisol_NS	229	55	69	30
	Acrisol A1_NS	364	86	264	72
	Acrisol A1_St	369	88	219	59
	Acrisol A2_NS	353	84	261	74
	Acrisol A2_St	362	86	255	70

act :activity, init : initial, sol : solution, NS : not sterilised, St : sterilised

### 3.2. Evolution of Sc acid phosphatase activity in solution and in contact with soil

**Figure III-2** shows the evolution of activity of the other AcPase from *Suillus collinitus*, Sc, free in solution or in the presence of each of the soils, sterilised or not, as function of incubation period. The activities of native soil phosphatase at pH 4 are also presented. At t=0 day (2 hours), the activity of AcPase Sc in the presence of soil was less than the activity in solution, and the difference depended on soil type. On vertisol, activity of AcPase Sc was 55% of that in solution at t=0, whereas for the acrisols about 85% of activity remained. *Suillus collinitus* phosphatase remained active in solution for longer than that of *Hebeloma cylindrosporum*, showing a continuous gradual decline over the one-month incubation to 73 % of its initial level. The evolution of Sc in contact with each of the acrisols was identical to that in solution, with a gradual continuous loss of about 25% of initial activity over the period. There was no statistically significant difference in the trend of added activity between the two acrisols and no effect of sterilisation observed for either soil.



**Figure III-2:** Activity of acid phosphatases *Suillus collinitus* (Sc) as function of incubation period at 25°C, in solution (○), immobilised on sterilised soil (□) and on non-sterilised soil (■). Native phosphatase activity at pH4 from sterilised soils (◇) and non-sterilised soils (◆). Top figures, acrisols, A1 and A2. Bottom figure, vertisol. Error bars indicate variability calculated from triplicate incubations. Curve bearing the same letters were not significantly different ( $P < 0.05$ )

The evolution of Sc in contact with the vertisol was markedly different from the pattern observed for the acrisols. Activity fell to about a third of its initial level in the first half

of the incubation period and then levelled off. At the end of the incubation period the activity in the presence of the vertisol was about a quarter of that in solution. The native activity measured for each soil was lower at pH 4 than at pH 5.5. No significant change in native soil activity with time was observed for any of the soils. The activity in the sterilised soils was too low to be measured

## 4. Discussion

### 4.1. Effect of soil on time-dependent phosphatase activity

An unexpected observation in this study, that, to our knowledge, has not been reported previously, is the contrast in the evolution of activity in solution between the two phosphatases studied. *Suillus* phosphatase was very stable in solution whereas that of *Hebeloma* was rapidly denatured. The enzymes also differed in their interaction with soils and the degree of protection afforded by the presence of soil, as has been reported previously for the same enzymes on similar soils (chapter 2). Initially, Sc lost more activity in the presence of soil than Hc and both enzymes lost more activity in the presence of vertisol than with either acrisol. Given the large soil:solution ratio, we assume that all, or almost all enzyme was adsorbed and thus the ratio of activities in solution and in soil is R, the activity in the adsorbed state relative to that in solution at the same pH. The greater retention of activity after adsorption on acrisol than on the vertisol agrees with previous findings (chapter 2) and with many other published data comparing enzymes immobilized on montmorillonite and kaolinite, or soil clays containing these minerals (Huang et al., 2009; Nannipieri et al., 1996; Shindo et al., 2002). The loss of activity was greater than that observed in chapter 2 for similar soils, but a preliminary experiment (data not shown) indicated that activity in soil suspension decreased with increasing soil: solution ratio. After incubation, a comparison of activity in solution and moist soil indicated every possible scenario, namely no protective effect of soil, a clear protective effect or even a negative effect of soil. Previous studies of the stability of immobilized enzymes have interpreted loss of activity in the adsorbed state as being due to degradation. In addition to degradation, which may be chemical or microbial in origin, another explanation of loss of activity in the adsorbed state is possible. Following adsorption, conformational changes or rearrangement of orientation of the active site with respect to the surface could lead to changes in R. We postulate the following explanations for the various trends observed

- Sc is intrinsically stable in solution. The evolution of Sc activity in the presence of acrisol follows the same pattern as in solution. Degradation proceeds at the same rate and there is no change in R with time. Alternatively, adsorption completely protects the enzyme against even the slow degradation experienced in solution and thus the observed evolution in the presence of acrisol is due to a decline in R from about 85 % to about 60 %.

- Sc in contact with vertisol is degraded in the adsorbed and solution phase at the same rate. The observed enhanced decrease in activity in the presence of the vertisol therefore results from a time dependent decrease in R, due to increased interaction or changing orientation of the adsorbed enzyme.
- Hc has a rather short half-life in solution. Adsorption on vertisol affords no protection to degradation. Adsorption induced little loss of activity due to interaction and there was no evidence of any change in R with time.
- Adsorption of Hc on the acrisols protected it against degradation. It is not possible to ascertain whether the observed decrease is due to incomplete protection or to a small time-dependent decrease in R.

A much larger number of comparisons would be required in order to show a possible relation between initial loss of activity following adsorption (R at  $t=0$ ) and the subsequent decrease of R with time. The relative importance of (i) physical protection of enzymes in the adsorbed state and (ii) time dependent interactions with the soil surface leading to decreasing relative activity appears to vary between enzymes and between soils.

The interpretation proposed here could be applied to the few published studies of the evolution of the activity of immobilized enzymes. Many of the published studies conclude to a protective effect of immobilization on mineral and organo-mineral surfaces (Huang et al., 2005; Huang et al., 2009; Rahman et al., 2005; Sarkar et al., 1989; Zhu et al., 2010). Some studies also report improved temperature stability of immobilized enzymes (Rahman et al., 2005; Zhu et al., 2010) and this has been attributed to the rigidity of the adsorbed enzyme (Rahman et al., 2005). One of the few exceptions is reported by Carrasco et al. (1995) who found that alkaline phosphatase immobilized on sepiolite lost activity more rapidly than in solution. We propose that immobilization on soil minerals may afford a protection against microbial attack, but that time dependent interactions between the enzyme and the surface may also determine the observed trend in activity.

#### **4.2. Effect of soil sterilization on added phosphatase activity**

The incubation conditions in this study were chosen to favour microbial activity (soils were moist but not water saturated and therefore well aerated, and the temperature was 25°C). The comparison of autoclaved and non-sterilised soils was intended to distinguish between abiotic and biotic effects. The absence of any significant effect of sterilisation on added phosphatase activity suggests that the decline in activity in contact with acrisol was not determined by microbial processes. George et al. (2005) also found no effect of sterilisation (a single autoclaving) on phytase activity in a soil, but also commented that they did not know what effect the sterilisation procedure had had on soil protease activity. However, no sterilisation technique is complete and without chemical and mineralogical side effects (Trevors, 1996). While multiple autoclaving must have drastically decreased microbial

activity, it may not have destroyed the proteases present in the soils. Carter et al. (2007) report that autoclaving (on two consecutive days) greatly reduced both microbial activity and protease activity soils. The same study reported that autoclaving was more effective in destroying enzyme activity in kaolinitic soils, such as the acrisols studied here, than in smectic soils where interlayer adsorption may protect enzymes. Some protease activity may thus have been maintained in the soils in our study, particularly in the vertisol. Renella et al. (2002) reports that fumigation, while decreasing microbial count, did not decrease all enzyme activities and some enzymes may even be released by fumigation. This should not have been the case with the multiple autoclaving used here; all heat sensitive enzymes, even if initially intracellular would have been affected by the treatment. It is interesting to note that sterilisation reduced, but did not destroy, the native phosphatase activity of the acrisols.

### **4.3. Effect of organic matter on phosphatase activity**

Organic matter has been reported to have a protective effect on enzymes (Quiquampoix et al., 1995; Rao et al., 1996; Rao et al., 2000). Among the possible mechanisms for this protection are the modification of the surface properties when a mineral surface is coated with organic molecules and the effect of organic matter on the porosity of soil, favouring zones where phosphatases have access to low molecular weight substrates, but are protected against microrganisms and higher molecular weight proteases (Naidja et al., 2000; Nannipieri et al., 1996). The two acrisols in this study were chosen because land use had led to depletion in organic matter for one of the samples. The absence of any significant difference between the rate of decline of phosphatase activity on either acrisol, for either enzyme, does not indicate any role of soil organic matter in determining the protection of phosphatase activity in soil. There was not apparent difference between the soils in the relative activity of either phosphatase in the adsorbed state. This agrees with the minor role of organic matter observed for these enzymes in contact with other similar tropical soils (chapter 2).

### **4.4 Native phosphatase activity**

The native phosphatase activity of the vertisol was 3-4 times greater than that in the acrisols. We are not aware of any published surveys of enzyme activity in soils with different mineralogies that would allow us to speculate on the origin of this difference. It could arise from differences in the secretion of phosphatases, their accumulation or the expression of catalytic activity once immobilised on the soil organo-mineral surfaces. The reported enhanced stability of enzymes in contact with swelling clays would favour the accumulation of native phosphatase in the vertisol, but the present data indicate that the situation is likely to be more complex. The amount of phosphatase in soils is highly variable and would depend on type of soil (Harrison, 1987). Native phosphatase activity was lower in the acrisol where organic matter had been depleted by burning (A2). This is consistent with the correlation between phosphatase activity and soil organic matter content reported by Sinsabaugh et al., (2008). Sterilisation reduced the native phosphatase activity in both soils, particularly at pH

4. There was no evidence of the release of intracellular phosphatase by sterilisation. The artefacts arising from sterilisation of the vertisol preclude any comparison of the protection of native enzymatic activity on the vertisol and acrisols. The stability of native activity throughout the incubation period shows, that in contrast to added phosphatase, the native enzymes underwent no change during the incubation period. They were physically protected from degradation and had stable conformation and/or favourable orientation with respect to the soil surfaces.

### **Conclusion**

In conclusion, this study reveals marked difference in stability of two fungal phosphatases both in solution and in contact with soils. We postulate that the observed decline in activity in contact with soil cannot be solely attributed to chemical or microbial breakdown. Changing relative activity in the adsorbed state may be determinant and will proceed at rates that depend on the interaction between the enzyme and the organo-mineral surface. Added phosphatase showed marked evolution over the one-month incubation period, whereas native phosphatase activity was constant over time.

### **Acknowledgements**

The authors thank Philippe Deleporte for his help in statistic treatments and Bernard Barthes for the choice of soils and Catherine Pernot who maintains the fungal collection. BK acknowledges a grant from the Côte d'Ivoire Ministry of Higher Education.

### Reference cited

- Baron, M.H., Revault, M., Servagent-Noinville, S., Abadie, J., Quiquampoix, H., 1999. Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 214, 319-332.
- Barthès, B.G., Kouakoua, E., Larré-Larrouy, M.-C., Razafimbelo, T.M., de Luca, E.F., Azontonde, A., Neves, C.S.V.J., de Freitas, P.L., Feller, C.L., 2008. Texture and sesquioxide effects on water-stable aggregates and organic matter in some tropical soils. *Geoderma* 143, 14-25.
- Cairney, J., 2011. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil* 344, 51-71.
- Carrasco, M.S., Rad, J.C., González-Carcedo, S., 1995. Immobilization of alkaline phosphatase by sorption on Na-sepiolite. *Bioresource Technology* 51, 175-181.
- Carter, D.O., Yellowlees, D., Tibbett, M., 2007. Autoclaving kills soil microbes yet soil enzymes remain active. *Pedobiologia* 51, 295-299.
- Chevallier, T., Voltz, M., Blanchart, E., Chotte, J.L., Eschenbrenner, V., Mahieu, M., Albrecht, A., 2000. Spatial and temporal changes of soil C after establishment of a pasture on a long-term cultivated vertisol (Martinique). *Geoderma* 94, 43-58.
- Coello, P., 2002. Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 116, 293-298.
- George, T.S., Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2005. Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 977-988.
- Giaveno, C., Celi, L., Richardson, A.E., Simpson, R.J., Barberis, E., 2010. Interaction of phytases with minerals and availability of substrate affect the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 491-498.
- Harrison, A.F., 1987. Soil organic phosphorus. A review of world literature. CAB International, Wallingford, Oxon. UK, 257pp. pp.
- Huang, Q., Liang, W., Cai, P., 2005. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 209-214.
- Huang, Q., Zhu, J., Qiao, X., Cai, P., Rong, X., Liang, W., Chen, W., 2009. Conformation, activity and proteolytic stability of acid phosphatase on clay minerals and soil colloids from an Alfisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74, 279-283.
- Leprince, F., Quiquampoix, H., 1996. Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- Morizet, J., Mingeau, M., 1976. Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato .1. role of nutrients. *Annales Agronomiques* 27, 183-205.

- Naidja, A., Huang, P.M., Bollag, J.-M., 2000. Enzyme-Clay Interactions and Their Impact on Transformations of Natural and Anthropogenic Organic Compounds in Soil. *J. Environ. Qual.* 29, 677-691.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P., 1996. Humus and Enzyme Activity, In: Alessandro, P. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 293-328.
- Norde, W., Lyklema, J., 1991. Why proteins prefer interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 2, 183-202.
- Nziguheba, G., Bunemann, E.K., 2005. Organic phosphorus dynamics in tropical agroecosystems, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 243-268.
- Palacios, M.C., Haros, M., Rosell, C.M., Sanz, Y., 2005. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. *Journal of Applied Microbiology* 98, 229-237.
- Quiquampoix, H., 1987a. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a  $\beta$ -D-glucosidase on different mineral surfaces. *Biochimie* 69, 753-763.
- Quiquampoix, H., 1987b. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. II. Competitive effects on the adsorption of a  $\beta$ -D-glucosidase in mixed mineral or organo-mineral systems. *Biochimie* 69, 765-771.
- Quiquampoix, H., Abadie, J., Baron, M.H., Leprince, F., MatumotoPintro, P.T., Ratcliffe, R.G., Staunton, S., 1995. Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces. *Proteins at Interfaces II* 602, 321-333.
- Quiquampoix, H., Burns, R.G., 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* 3, 401-406.
- Quiquampoix, H., Mousain, D., 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 89-112.
- Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.H., 2002. Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 285-306.
- Quiquampoix, H., Staunton, S., Baron, M.H., Ratcliffe, R.G., 1993. Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 75, 85-93.
- Rahman, M.B.A., Tajudin, S.M., Hussein, M.Z., Abdul Rahman, R.N.Z.R., Salleh, A.B., Basri, M., 2005. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. *Applied Clay Science* 29, 111-116.

- Rao, M.A., Gianfreda, L., Palmiero, F., Violante, A., 1996. Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. *Soil Science* 161, 751-760.
- Rao, M.A., Violante, A., Gianfreda, L., 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1007-1014.
- Renella, G., Landi, L., Nannipieri, P., 2002. Hydrolase activities during and after the chloroform fumigation of soil as affected by protease activity. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 51-60.
- Rosas, A., de la Luz Mora, M., Jara, A.A., López, R., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2008. Catalytic behaviour of acid phosphatase immobilized on natural supports in the presence of manganese or molybdenum. *Geoderma* 145, 77-83.
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A., Bollag, J.-M., 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 223-230.
- Servagent-Noinville, S., Revault, M., Quiquampoix, H., Baron, M.H., 2000. Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Induced by Adsorption on Different Clay Surfaces: FTIR Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 221, 273-283.
- Shindo, H., Watanabe, D., Onaga, T., Urakawa, M., Nakahara, O., Huang, Q.Y., 2002. Adsorption, activity, and kinetics of acid phosphatase as influenced by selected oxides and clay minerals. *Soil Science and Plant Nutrition* 48, 763-767.
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Contosta, A.R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M.E., Gartner, T.B., Hobbie, S.E., Holland, K., Keeler, B.L., Powers, J.S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M.P., Wallenstein, M.D., Zak, D.R., Zeglin, L.H., 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* 11, 1252-1264.
- Staunton, S., Quiquampoix, H., 1994. Adsorption and Conformation of Bovine Serum Albumin on Montmorillonite: Modification of the Balance between Hydrophobic and Electrostatic Interactions by Protein Methylation and pH Variation. *Journal of Colloid and Interface Science* 166, 89-94.
- Trevors, J.T., 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26, 53-59.
- Turner, B.L., Engelbrecht, B.M.J., 2011. Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. *Biogeochemistry* 103, 297-315.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.
- Zhu, J., Huang, Q., Pigna, M., Violante, A., 2010. Immobilization of acid phosphatase on uncalcined and calcined Mg/Al-CO<sub>3</sub> layered double hydroxides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 77, 166-173.

## **Chapitre IV:**

### **Purification et caractérisation des phosphatases acides de *Suillus* *collinitus* et *Hebeloma cylindrosporum***

## **Chapitre IV: Purification et caractérisation des phosphatases acides de *Suillus collinitus* et *Hebeloma cylindrosporum***

---

### *Avant propos*

Les deux précédents chapitres ont montré un contraste dans le comportement des phosphatases acides sécrétées dans le milieu de culture des champignons ectomycorhiziens *Suillus collinitus* et *Hebeloma cylindrosporum*. Ces phosphatases ont montré une affinité différente avec les colloïdes du sol, mais aussi une évolution différente de leur activité à l'état adsorbé au cours du temps. Ces observations ont montré que la modification d'activité des enzymes et leur rémanence après adsorption dans les sols dépendent fortement de l'origine et des caractéristiques des enzymes. Il s'est avéré donc souhaitable de purifier et de caractériser les phosphatases sécrétées par les champignons ectomycorhiziens dans la solution de culture et qui ont montré des comportements contrastés dans les précédents chapitres.

L'objectif de ce chapitre était de purifier par chromatographie les phosphatases des solutions de culture des champignons et de présenter les résultats des essais de caractérisation de ces phosphatases. Les solutions brutes (non purifiées) de culture de *S. collinitus* et de la souche D3.25.2 (code de laboratoire) de *H. cylindrosporum* ont été utilisées pour la séparation des phosphatases sur une colonne hydrophobe de chromatographie. Les poids moléculaires des protéines et des phosphatases des fractions de chromatographie de *S. collinitus* ont été déterminés par SDS-PAGE 1D avec révélation de protéine au nitrate d'argent et révélation de l'activité phosphatase. Les points isoélectriques de ces phosphatases n'ont pu être déterminés faute de révélation des phosphatases par activité sur les gels d'électrophorèse à deux dimensions. Les analyses sur les fractions de chromatographie de *H. cylindrosporum* n'ont pu être réalisées faute de quantité suffisante pour être détectée sur gel par activité.

## 1. Introduction

Le phosphore (P) est un nutriment essentiel pour les plantes mais reste fréquemment l'élément le plus limitant dans le développement et la croissance des plantes dans plusieurs écosystèmes (Vance et al., 2003). Bien que le P se trouve sous plusieurs formes organique (Po) et minérales, l'orthophosphate (Pi) est la seule forme assimilable par les plantes. Sous des conditions de déficience, les plantes développent des stratégies pour l'acquisition de Pi. La formation d'association de leur racines avec des champignons (symbioses mycorhiziennes) fait partie des stratégies que la plupart des plantes ont développé (Lambers et al., 2008). La contribution des champignons ectomycorhiziens à l'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes hôtes a été reconnue (Chalot et al., 2002; Torres Aquino and Plassard, 2004). Ces champignons offrent à la plante mycorhizée une plus grande zone d'exploration comparé aux plantes non mycorhizées qui peut atteindre parfois 75% du potentiel d'absorption de nutriments (Rousseau et al., 1994). L'un des mécanismes par lesquels les champignons ectomycorhiziens, qui regroupent plus de 5000 espèces (Jane Barker et al., 1998), améliorent la nutrition phosphatée des plantes mycorhizées est la sécrétion de phosphatases extracellulaires (Perez-Moreno and Read, 2000). Les phosphatases forment un groupe d'enzyme capable d'améliorer la nutrition phosphatée dans le sol en catalysant l'hydrolyse de la liaison C-O-P de divers Po en Pi. Leur origine dans le sol est diverse. Elles sont produites sous des conditions déficientes en Pi par plusieurs microorganismes que sont les bactéries (Palacios et al., 2005; Rodríguez and Fraga, 1999), les plantes (Coello, 2002; Duff et al., 1991; Goldstein et al., 1988; Haran et al., 2000; Li et al., 1997) et les champignons (Boyce and Walsh, 2007; Joner et al., 2000; Tarafdar and Marschner, 1994; Tarafdar et al., 1988). Aussi, la plupart des études actuelles sur les enzymes se font avec des phosphatases ou des phytases purifiées de champignons saprophytes, de plantes, de bactéries ou d'animaux (Hayes et al., 2000b; Turner et al., 2003a; Zhu et al., 2010). Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur les caractéristiques et le rôle réel joué par les phosphatases de champignons ectomycorhiziens malgré le rôle potentiel que peuvent jouer les symbioses mycorhiziennes dans la mobilisation du Pi. L'expression d'activité phosphatase en solution est considérablement variable entre champignons ectomycorhiziens (Tibbett et al., 1998) et pour une même souche. Les travaux de Louche et al (2010) ont permis d'isoler et d'identifier quatre phosphatases acides du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* (*Hc*) avec des expressions d'activité différentes. Cette espèce de champignon est un modèle souvent utilisé pour étudier les processus biologiques mis en œuvre dans la symbiose mycorhizienne (Marmeisse et al., 2004). Des bibliothèques sur leur ADN ont même été constituées (Lambilliotte et al., 2004; Taty et al., 2009). En revanche, il existe très peu d'informations sur les phosphatases de l'espèce *Suillus collinitus* (*Sc*). Dans de précédentes études (chapitre 2 et 3), l'expression d'activité et l'affinité avec des colloïdes de sols des solutions de phosphatases non purifiées issues de culture de ces deux espèces (*Hc* et *Sc*) ont été étudiées. Ces études ont permis de mettre en exergue des comportements contrastés vis-à-vis des sols. Alors que *Hc* était stable et protégée de la dégradation avec le temps à l'état

adsorbé sur un sol ferrallitique, *Sc* montrait une perte d'activité sur ce sol. Les travaux de Leprince et Quiquampoix (1996) sur deux phosphatases purifiées d'une autre souche de *Hebeloma cylindrosporum* ont montré que l'une avait une bonne stabilité suite à l'adsorption sur un minéral argileux. Il peut y avoir une diversité de comportement des phosphatases, que ce soit au sein de souches de la même espèce ou que ce soit entre espèces différentes dans l'interaction avec les surfaces solides. La séparation et la caractérisation des phosphatases de champignons ectomycorhiziens pourraient contribuer à améliorer les connaissances sur le rôle réel joué par les symbioses mycorhiziennes dans le cycle du P. Dans ce travail, nous avons essayé de séparer par chromatographie les phosphatases acides obtenues par culture en milieu liquide de souches de champignons ectomycorhiziens *Suillus collinitus* et *Hebeloma cylindrosporum*. Les phosphatases ont été ensuite distinguées des autres protéines secrétées dans la solution nutritive par électrophorèse sur des gels à une ou deux dimensions. Ces gels ont permis d'estimer le point isoélectrique et la taille de ces enzymes.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1 Obtention des solutions de phosphatases**

Les solutions de phosphatases extracellulaires ont été obtenues à partir de la culture de champignons ectomycorhiziens : Une souche de chacun des champignons *Suillus collinitus* (code du laboratoire J3.15.35) et *Hebeloma cylindrosporum* (code du laboratoire D3.25.2) a été utilisée. Elles proviennent de la collection maintenue par l'UMR Eco&Sols et ont déjà fait l'objet d'études (chapitre 2 et 3). Les champignons ont été pré-cultivés sur un milieu gélosé dans des boîtes de pétri (90 mm de diamètre) à 25°C à l'obscurité pour obtenir des implants actifs, puis cultivés en milieu liquide dans des flacons de 125 mL (contenant 25 mL de solution nutritive) à 25°C pendant trente jours à l'obscurité. La composition du milieu liquide et du milieu gélosé (hormis l'agar 16 g/L) est la suivante : NaCl (0,1 mM); KNO<sub>3</sub> (4 mM); KCl (1mM); NH<sub>4</sub>Cl (2 mM); MgSO<sub>4</sub> (1 mM); CaCl<sub>2</sub> (1 mM); thiamine-HCl (0,3 µM); citrate ferrique (1% ); glucose (10 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,4 mM); plus les oligoéléments recommandés par **Morizet et Mingeau** (1976). Ces milieux ont été stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 min avant de servir de solution nutritive aux champignons. A la fin de la culture, les solutions nutritives dans les flacons contenant les phosphatases acides extracellulaires secrétées par le même champignon ont été filtrées sur une toile Vileda-Mop pour l'élimination de débris de champignon, puis regroupées et conservées par congélation à -20°C. Ces solutions ont ensuite été utilisées pour la séparation et le dosage de l'activité des phosphatases.

### **2.2. Séparation des phosphatases**

Les solutions de culture, décongelées (incubées 24h à 4°C), ont été d'abord concentrées 40 fois pour *Suillus collinitus* et pour *Hebeloma cylindrosporum* en utilisant le système de filtration Amicon Ultra 15, 10 kDa (Millipore). Les échantillons ont été précipités au sulfate d'ammonium 1M. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et filtré à 0,2

µm avec des filtres Pall Supor®. Le surnageant est déposé sur une colonne HIC Phenyl 1mL Fast Flow High Sub (GE Healthcare) montée sur le chromatographe AKTA Purifier 10 (GE Healthcare). Le tampon de chargement était composé de 25 mM d'acétate de sodium à pH 5 et 1M de sulfate d'ammonium. L'élution des protéines a été réalisée par 10 mL de tampon acétate (25 mM, pH 5) d'un gradient continu de 1 à 0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avec un débit de 1 mL/min.

### **2.3. Analyse des fractions collectées**

Un profil d'activité phosphatase des différentes fractions de l'éluant a été établi et a permis de regrouper les fractions de *Suillus collinitus* en quatre (S1, S2, S3 et S4) et celles d'*Hebeloma cylindrosporum* en deux (H1 et H2). L'activité phosphatase des fractions a été mesurée en utilisant comme substrat le para-nitrophenylphosphate (pNPP). Cinquante microlitres de chaque fraction ont été incubés avec 200µL d'un tampon acétate (25 mM) à pH 5,4 contenant 10 mM de pNPP. Après une incubation de 50 min à 30°C, la réaction a été stoppée par l'addition de 1mL de NaOH (0,5 M) et le para-nitrophenol (pNP) produit a été dosé par colorimétrie à 405 nm (spectrophotomètre : ELx800 de Biotek). La concentration des protéines a été estimée en mesurant l'absorbance à 280 nm et calculée en utilisant une gamme étalon de BSA (0,25 à 2,5 g/L). Les groupes de fractions ont été dessalés et concentrés par quatre passages dans l'Amicon Ultra 10 kDa contre de l'eau ultra pure puis conservés à 4°C pour les analyses futures.

### **2.4. SDS-PAGE et détection des phosphatases par la révélation d'activité**

Les groupes de fractions de chromatographie et la solution de culture non purifiée ont été soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Les échantillons ont été traités avec du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) sans β-mercaptoethanol pour ne pas dénaturer les phosphatases et déposés sur deux gels à 14% d'acrylamide (resolving gel, 60 mm de longueur). La migration s'est d'abord effectuée dans le stacking gel à une intensité de 20 mA par gel puis sur le resolving gel à une intensité de 30 mA par gel. L'un des gels a été utilisé pour la détection des protéines par coloration au nitrate d'argent. Le second gel a subi une révélation spécifique des phosphatases.

La révélation d'activité phosphatase dans le gel est réalisée en 4 étapes. Tout d'abord, une fixation est réalisée pendant 20 min dans un bain de 50% d'éthanol et 5% d'acide acétique. Puis le SDS a été éliminé par lavage (McGrew and Green, 1990) avec du tampon composé de TRIS-HCl (0,04 M, pH 9), EDTA (2 mM) et de la caséine (10 g/L) à 37°C pendant 2 heures. Le gel a ensuite été rincé avec du tampon acétate de sodium (0,1 M) à pH 5,4 à 4°C pendant 2 heures. Enfin, la détection des phosphatases sur ce gel par leur activité catalytique a été faite en utilisant comme substrat le β-naphtylphosphate (0,5 mg/mL) avec un réactif pour détecter le produit de la réaction, le Fast Garnet (0,5 mg/mL). Le gel a été incubé à 30°C dans le substrat jusqu'à l'apparition de bandes indiquant l'activité phosphatase. Tous les gels ont ensuite été scannés à 300 dpi avec un scanner d'image (GE Biosciences).

## 2.5. Gel d'électrophorèse 2D et détection des phosphatases par la révélation d'activité

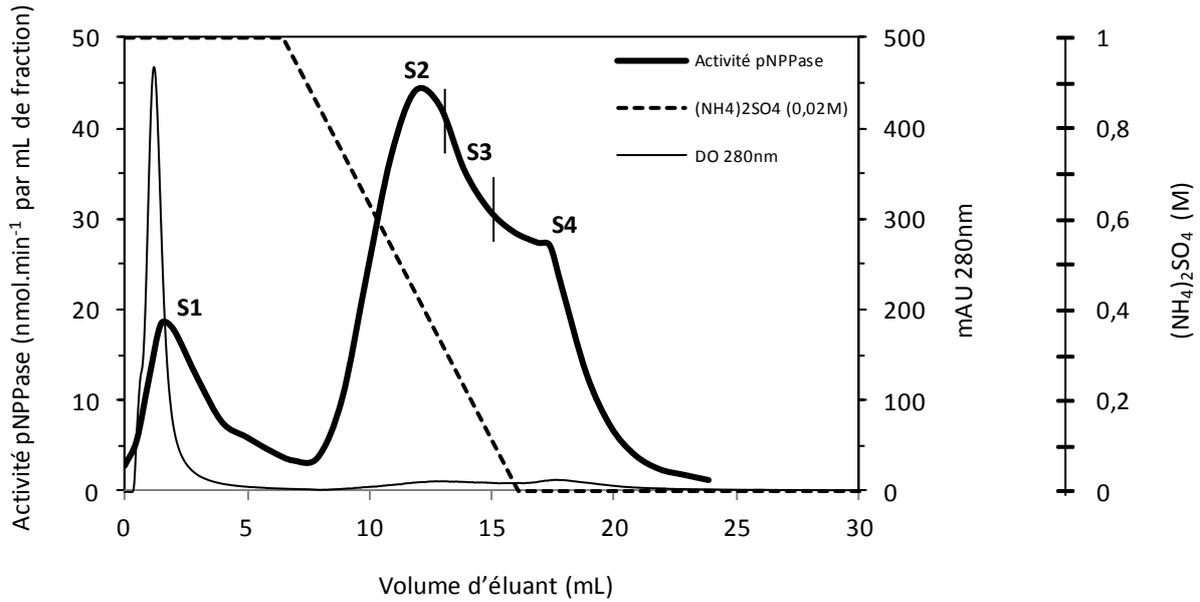
La première dimension, la focalisation isoélectrique (IEF) a été réalisée avec les échantillons de fractions groupées de chromatographie en utilisant des gels Immobiline Dry-strips long de 18 cm (intervalle de pH 3-10, non linéaire de GE Healthcare). Les échantillons ont été déposés sur les strips avec du tampon de solubilisation. Les échantillons ont été chargés passivement pendant 8 heures dans un système IPGphor (GE Healthcare). Le programme de migration IEF était comme le décrit Sauvage (2010): une réhydratation active à 50 V pendant 9h, une augmentation du voltage à 300 V en trois minutes, début de la focalisation à 300 V pendant 30 min, une augmentation du voltage à 8000 V en 3 heures, la focalisation à 8000 V pendant 11 h, une diminution du voltage pendant 3h jusqu'à 300 V. La migration s'est déroulée à 10°C. Les strips ont ensuite été équilibrés avant l'étape SDS-PAGE sous agitation douce pendant 20 min dans un tampon Tris-HCl (50mM, pH 8,8) contenant de l'urée (6 M), de la thio-urée (2M) du glycerol (30%) et du SDS (2%).

La seconde dimension SDS-PAGE a été réalisée avec un gel à 10% d'acrylamide à l'aide d'un appareil ISODALT (GE Healthcare). La séparation a été achevée à 15°C dans un tampon à pH 8,3 contenant du Tris (25 mM), de la glycine (0,192 M) et du SDS (0,1%). La migration s'est fait selon le programme suivant pour un gel : 1 heure à 40 V et 30 mA, 1heure à 70 V et 40 mA et 11 heures à 110 V. La détection des phosphatases sur les gels 2D par la révélation d'activité a été faite comme décrit auparavant dans le gel à une dimension.

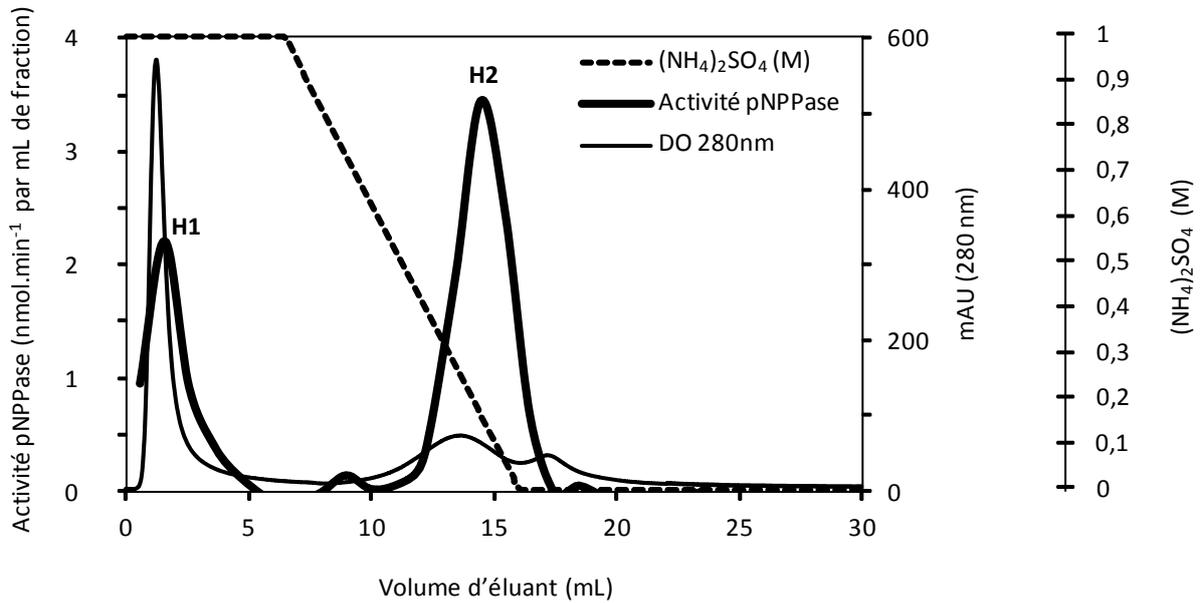
## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Séparation chromatographique des phosphatases de *Suillus collinitus* et d'*Hebeloma cylindrosporum*

L'objectif de ce travail était d'isoler et de caractériser les phosphatases acides secrétées par les champignons ectomycorhiziens *Suillus collinitus* et d'*Hebeloma cylindrosporum*. La technique utilisée pour séparer les phosphatases acides est la chromatographie par interaction hydrophobe. Il a été rapporté que la chromatographie d'interaction hydrophobe est une puissante technique de purification des enzymes (Leitão et al., 2010). En effet, l'interaction entre le ligand et la protéine est plus faible dans cette technique que dans le cas de la chromatographie d'échange d'ion, et permet de préserver la structure de la protéine et son activité biologique (Tomaz and Queiroz, 1999). Cependant l'association de plusieurs techniques de chromatographie est également utilisée (Boyce and Walsh, 2007; Tomaz and Queiroz, 1999) pour une meilleure séparation des enzymes. Les profils d'activité phosphatase et de la densité optique des fractions de chromatographie en fonction du volume d'élution et de la concentration de sel  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  nécessaire à l'élution sont présentés aux **Figure IV-1** et **Figure IV-2** respectivement pour *S. collinitus* et *H. cylindrosporum*.



**Figure IV-1:** Profil de chromatographie sur une colonne hydrophobe des phosphatases sécrétées par le champignon ectomycorhizien *Suillus collinitus*.



**Figure IV-2:** Profil de chromatographie sur une colonne hydrophobe des phosphatases sécrétées par le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*.

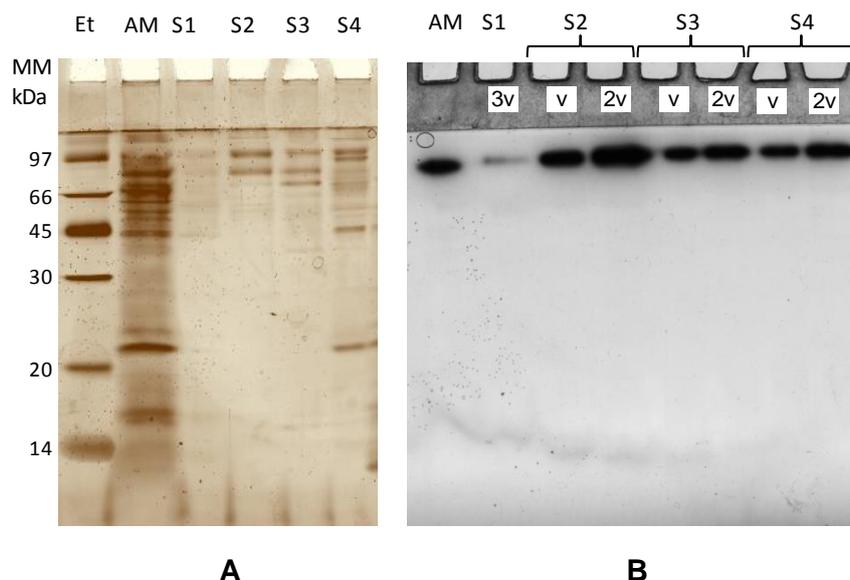
La séparation des phosphatases par interaction hydrophobe a permis d'obtenir trois pics d'activité phosphatase avec *S. collinitus* (S1, S2, S4) dont l'un (S4) apparaît comme l'épaulement d'un autre (S2), et deux pics pour *H. cylindrosporum* (H1 et H2).

Un groupe de fractions de phosphatases de *S. collinitus* a été formé avec des fractions intermédiaires entre S2 et S4 et nommé S3 (**Figure IV-1**). Le premier pic d'activité (S1) correspond à des phosphatases non retenues sur la colonne qui ont été éluées au maximum de concentration de sel (1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et au seul pic de densité optique mesuré à DO 280 nm. Les deux autres pics S2 et S4 correspondent à des phosphatases retenues sur la colonne qui ont été éluées respectivement à 0,7-0,3 M et 0 M de sel. La densité optique mesurée à ces pics est très faible. L'activité phosphatase maximale enregistrée pour les trois pics est de 18, 44, et 27 nmol/min par mL de fraction collectée respectivement pour S1, S2 et S4. Les fractions ont été regroupées par pic d'activité ou d'activité intermédiaire de sorte que les groupes de fractions S1, S2, S3 et S4 correspondent à 0-3 ; 9-13, 14-15 et 16-20 ml de volume d'éluant et 15, 35, 15 et 28% d'activité respectivement. Ce résultat montre que trois phosphatases acides secrétées par *S. collinitus* ont été isolées. Le principe de séparation de la méthode utilisée suggère que ces phosphatases ont des propriétés hydrophobes différentes. Les phosphatases acides de S4 seraient les plus hydrophobes suivies de celles de S3 et S2. Le fait que les phosphatases de S1 ne soient pas retenues suggère qu'elles ne sont pas hydrophobes ou que leur propriété hydrophobe est très faible.

Les phosphatases acides de *H. cylindrosporium* présentent un pic non retenu (H1) et un pic retenu (H2) sur la colonne hydrophobe (**Figure IV-2**) avec pour activité maximale respective 2,2 et 3,4 nmol/min par mL de fraction. Le premier pic d'activité correspond au pic le plus élevé de densité optique à 280nm et le deuxième à deux pics de DO faibles. Les fractions de phosphatases ont été regroupées par pic d'activité et représentent 32 et 66% de l'activité totale pour H1 et H2 respectivement. Des auteurs ont essayé de séparer des phosphatases acides d'autres souches d'*Hebeloma cylindrosporium* par la méthode de chromatographie d'échange de cation et ont trouvé soit deux pics dont un non retenu (Deransart et al., 1990), soit quatre pics dont trois non retenus sur la colonne (Louche et al., 2010). Des essais préliminaires à ce travail effectués avec la méthode de chromatographie d'interaction hydrophobe et le même échantillon que Louche et al (2010) n'ont pas permis de séparer les phosphatases (données non présentées). La révélation d'activité sur gel électrophorèse a permis à Deransart et al (1990) d'identifier en tout quatre phosphatases au lieu des deux révélées précédemment seulement par chromatographie. Il serait donc utile pour une identification complète du nombre de phosphatases secrétées par la souche d'*H. cylindrosporium* utilisée dans ce travail, de faire des gels d'électrophorèse avec révélation d'activité et révélation au nitrate d'argent.

### 3.2. Masse moléculaire

La séparation des protéines de la solution de culture (AM, échantillon brut concentré à l'Amicon) de *Suillus collinitus* et des fractions de chromatographie (S1, S2, S3 et S4, en fonction de leur taille par SDS-PAGE est présentée à la **Figure IV-3**.

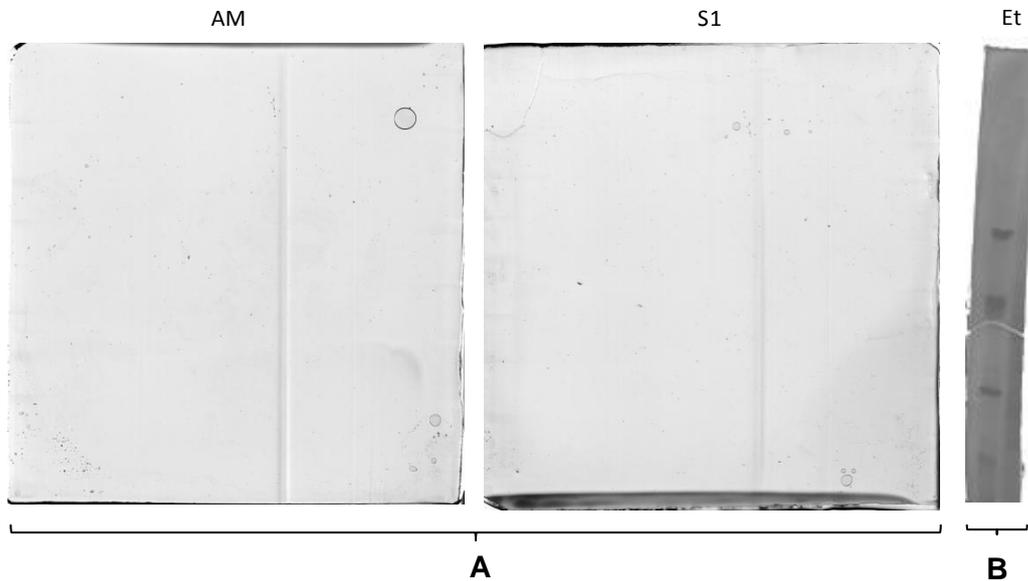


**Figure IV-3:** SDS-PAGE 1D (gel à 14% d'acrylamide) pour les phosphatases secrétées par le champignon ectomycorhizien *suillus collinitus* en culture *in vitro* sous condition dénaturante (A) ou non dénaturante (B). Révélation des protéines au nitrate d'argent (gel A) et révélation de phosphatase par activité en utilisant comme substrat  $\beta$ -naphtylphosphate (gel B). Et: protéine étalon; AM: échantillon brut de phosphatase concentré à l'Amicon; S1: groupe de fraction de phosphatase non retenue par la colonne hydrophobe de la chromatographie; S2, S3 et S4: les trois groupes de fraction retenue par la colonne hydrophobe de la chromatographie. v, 2v et 3v signifie respectivement un, deux et trois volumes d'échantillon déposés sur le gel.

La révélation des protéines par le nitrate d'argent (gel A) a montré des protéines dont les masses molaires sont comprises entre 14 et environ 97 kDa. L'échantillon AM montre un nombre important de bandes dont le maximum de bande se situe entre 45 et 97 kDa. Les fractions de chromatographie présentent chacune plusieurs bandes dont une bande commune autour de 97 kDa. Les bandes de S1 sont de faible intensité et moins visibles comparées aux bandes des autres fractions. S4 se différencie de S2 et S3 par deux bandes importantes entre 45 et 20 kDa. La révélation des phosphatases sur le gel B montre une seule bande correspondant à 97 kDa pour tous les échantillons. Ce qui suggère que toutes les phosphatases acides isolées de *S. collinitus* ont des masses moléculaires similaires (environ 97 kDa). Cette valeur est plus élevée que celle des phosphatases acides du champignon *Hebeloma cylindrosporum* (17 et 51 kDa) ou du champignon *Trichoderma harzianum* (58 kDa) (Leitão et al., 2010; Leprince and Quiquampoix, 1996). Par contre elle est plus faible que celle des phosphatases acides d'*Aspergillus caespitosus* (186 and  $190 \pm 15$  kDa) (Guimarães et al., 2004). S2 a la bande d'activité la plus importante et S4 la bande d'activité la plus faible. Ce qui correspond aux pics d'activité observés sur le profil de chromatographie. La taille des bandes d'activité est proportionnelle à la quantité de phosphatase présente dans les fractions.

### 3.3. Point isoélectrique

Les électrophorèses SDS-PAGE 2D suivies de la révélation d'activité phosphatase réalisées dans ce travail (**Figure IV-4**) n'ont donné aucun spot visible sur les gels. La méthode de révélation d'activité est la même que dans le cas du gel 1D de la **Figure IV-3**.



**Figure IV-4:** SDS-PAGE 2D (gels à 10% d'acrylamide) des phosphatases secrétées par le champignon ectomycorhizien *suillus collinitus* en culture *in vitro* sous condition non dénaturante (A). Révélation des protéines étalon au nitrate d'argent sur gel 1D (B) et révélation de phosphatase par activité en utilisant comme substrat  $\beta$ -naphtylphosphate (gels A). Et: protéine étalon; AM: échantillon brut de phosphatase concentré à l'Amicon; S1: groupe de fraction de phosphatase non retenue par la colonne hydrophobe de la chromatographie.

La révélation au nitrate d'argent d'une partie de ces gels (gel A) utilisée comme témoin de la migration des protéines étalons (Et) suivant leur taille met hors de cause la mauvaise migration de la deuxième dimension. L'absence de spot sur le gel 2D montre bien que l'activité enzymatique a été inhibée au cours de la méthode SDS-PAGE 2D, et n'a pas permis de déterminer le point isoélectrique des phosphatases.

### 4. Conclusion

La chromatographie d'interaction hydrophobe a permis d'obtenir trois pics et deux pics d'activités phosphatases respectivement pour *S. collinitus* et *H. cylindrosporum* avec un pic non retenu pour chaque champignon. La révélation par activité phosphatase des gels d'électrophorèse 1D a montré que les phosphatases de *S. collinitus* possédaient une masse molaire similaire, bien que ces enzymes aient montré des propriétés hydrophobes différentes. Le point isoélectrique de ces phosphatases n'a pu être déterminé faute de détection de phosphatase sur le gel 2D. Des analyses complémentaires sur les fractions purifiées sont

nécessaires pour une meilleure identification des phosphatases des champignons ectomycorhiziens *S. collinitus* et *H. cylindrosporum*.

## Références citées

- Boyce, A., Walsh, G., 2007. Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. *Journal of Biotechnology* 132, 82-87.
- Chalot, M., Javelle, A., Blaudez, D., Lambilliotte, R., Cooke, R., Sentenac, H., Wipf, D., Botton, B., 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil* 244, 165-175.
- Coello, P., 2002. Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 116, 293-298.
- Deransart, C., Chaumat, E., Cleyetmarel, J.C., Mousain, D., Labarere, J., 1990. Purification assay of phosphatases secreted by *Hebeloma cylindrosporum* and preparation of polyclonal antibodies. *Symbiosis*, pp. 185-194.
- Duff, S.M., Plaxton, W.C., Lefebvre, D.D., 1991. Phosphate-starvation response in plant cells: de novo synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 9538-9542.
- Goldstein, A.H., Baertlein, D.A., McDaniel, R.G., 1988. Phosphate Starvation Inducible Metabolism in *Lycopersicon esculentum*: I. Excretion of Acid Phosphatase by Tomato Plants and Suspension-Cultured Cells. *Plant Physiology* 87, 711-715.
- Guimarães, L.H.S., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Leone, F.A., Polizeli, M.d.L.T.M., 2004. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40, 201-207.
- Haran, S., Logendra, S., Seskar, M., Bratanova, M., Raskin, I., 2000. Characterization of *Arabidopsis* Acid Phosphatase Promoter and Regulation of Acid Phosphatase Expression. *Plant Physiology* 124, 615-626.
- Hayes, J.E., Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2000. Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biology and Fertility of Soils* 32, 279-286.
- Jane Barker, S., Tagu, D., Delp, G., 1998. Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses. *Plant Physiology* 116, 1201-1207.
- Joner, E.J., van Aarle, I.M., Vosatka, M., 2000. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant and Soil* 226, 199-210.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambers, H., Raven, J.A., Shaver, G.R., Smith, S.E., 2008. Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology and Evolution* 23, 95-103.
- Lambilliotte, R., Cooke, R., Samson, D., Fizames, C., Gaymard, F., Plassard, C., Tatry, M.-V., Berger, C., Laudié, M., Legeai, F., Karsenty, E., Delseny, M., Zimmermann, S., Sentenac, H., 2004. Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 164, 505-513.

- Leitão, V., de Melo Lima, R., Vainstein, M., Ulhoa, C., 2010. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters* 32, 1083-1088.
- Leprince, F., Quiquampoix, H., 1996. Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- Li, M., Shinano, T., Tadano, T., 1997. Distribution of Exudates of Lupin Roots in the Rhizosphere under Phosphorus Deficient Conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 43, 237-245.
- Louche, J., Ali, M.A., Cloutier-Hurteau, B., Sauvage, F.-X., Quiquampoix, H., Plassard, C., 2010. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 323-335.
- Marmeisse, R., Guidot, A., Gay, G., Lambilliotte, R., Sentenac, H., Combier, J.P., Melayah, D., Fraissinet-Tachet, L., Debaud, J.C., 2004. *Hebeloma cylindrosporum* – a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist* 163, 481-498.
- McGrew, B.R., Green, D.M., 1990. Enhanced removal of detergent and recovery of enzymatic activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: Use of casein in gel wash buffer. *Analytical Biochemistry* 189, 68-74.
- Morizet, J., Mingeau, M., 1976. Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato .1. role of nutrients. *Annales Agronomiques* 27, 183-205.
- Palacios, M.C., Haros, M., Rosell, C.M., Sanz, Y., 2005. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. *Journal of Applied Microbiology* 98, 229-237.
- Perez-Moreno, J., Read, D.J., 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* 145, 301-309.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319-339.
- Rousseau, J.V.D., Sylvia, D.M., Fox, A.J., 1994. Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytologist* 128, 639-644.
- Sauvage, F.-X., Bach, B., Moutounet, M., Vernhet, A., 2010. Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry* 118, 26-34.
- Tarafdar, J.C., Marschner, H., 1994. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 387-395.
- Tarafdar, J.C., Rao, A.V., Bala, K., 1988. Production of phosphatases by fungi isolated from desert soils. *Folia Microbiologica* 33, 453-457.

- Tatry, M.-V., El Kassis, E., Lambilliotte, R., Corratgé, C., Van Aarle, I., Amenc, L.K., Alary, R., Zimmermann, S., Sentenac, H., Plassard, C., 2009. Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *The Plant Journal* 57, 1092-1102.
- Tibbett, M., Sanders, F.E., Cairney, J.W.G., 1998. The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. in axenic culture. *Mycological Research* 102, 129-135.
- Tomaz, C.T., Queiroz, J.A., 1999. Studies on the chromatographic fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction. *Journal of Chromatography A* 865, 123-128.
- Torres Aquino, M., Plassard, C., 2004. Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 149-156.
- Turner, B.L., Cade-Menun, B.J., Westermann, D.T., 2003. Organic Phosphorus Composition and Potential Bioavailability in Semi-Arid Arable Soils of the Western United States. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67, 1168-1179.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.
- Zhu, J., Huang, Q., Pigna, M., Violante, A., 2010. Immobilization of acid phosphatase on uncalcined and calcined Mg/Al-CO<sub>3</sub> layered double hydroxides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 77, 166-173.

## **Chapitre V :**

**Comparaison d'activité catalytique  
de phosphatases fongiques à différents  
degrés de purification en présence de  
kaolinite et de montmorillonite**

## **Chapitre V: Comparaison d'activité catalytique de phosphatases fongiques à différents degrés de purification en présence de kaolinite et de montmorillonite**

---

### *Avant propos*

Dans le chapitre précédent, les phosphatases acides sécrétées par les champignons ectomycorhiziens ont été purifiées par chromatographie à interaction hydrophobe. Les profils de chromatographie ont permis de séparer quatre groupes de fractions de phosphatases pour *S. collinitus* et deux groupes pour *H. cylindrosporium*. Les électrophorèses sur gel ont montré que les phosphatases de *S. collinitus* avaient la même taille bien qu'ayant des propriétés hydrophobes différentes. Dans les deux premiers chapitres, l'étude des interactions des échantillons non purifiés avec les colloïdes des sols ont montré que les phosphatases de *S. collinitus* avaient une activité catalytique à l'état adsorbé et une affinité différente pour les sols à kaolinite (ferrallitiques) et les sols à smectites (vertisols). Les phosphatases purifiées pourraient montrer des comportements différents les uns des autres avec des surfaces minérales contrastées. Il a été rapporté que des phosphatases acides purifiées d'une souche de *H. cylindrosporium* avaient des comportements différents dans leur interaction avec la montmorillonite (Leprince and Quiquampoix, 1996). L'étude de l'interaction des fractions purifiées de phosphatases de *S. collinitus* avec des colloïdes du sol peut être utile pour mieux comprendre le rôle de ces enzymes sécrétées par les champignons dans la mobilisation du Pi.

L'objectif de ce chapitre était donc d'étudier l'adsorption et l'activité enzymatique après adsorption des phosphatases purifiées de *S. collinitus* sur deux types de minéraux argileux dominant dans les vertisols et les sols ferrallitiques. Les expérimentations ont été conduites avec une kaolinite et une montmorillonite de référence. Les méthodes de mesure de l'interaction des enzymes avec les minéraux ont été les mêmes que dans le chapitre 2. Une hypothèse de dimérisation des phosphatases sur les surfaces des argiles est avancée pour expliquer l'augmentation de l'activité catalytique relative à l'état adsorbé.

## **Comparaison d'activité catalytique de phosphatases fongiques à différents niveaux de purification sur la kaolinite et la montmorillonite.**

Authors: Brice Kedi<sup>a,b</sup>, Gabrielle Daudin<sup>a</sup>, Joseph Sei<sup>b</sup>, Siobhán Staunton<sup>a</sup>, Hervé Quiquampoix<sup>a</sup>

Affiliation: <sup>a</sup>INRA, UMR Eco&Sols, INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France; and <sup>b</sup>LCMI, UFR SSMT, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

Correspondance: Hervé Quiquampoix, tel: 33(0)499 61 23 06, fax : 33(0)499 61 30 88, quiquampoix@montpellier.inra.fr.

### **Résumé**

Nous avons comparé l'activité catalytique de phosphatases fongiques en solution et après adsorption sur la kaolinite ou sur la montmorillonite en fonction de la purification et du fractionnement des extraits brutes. Toutes les mesures ont été faites sur une gamme de pH 3 à 6. Les protéines des solutions ont été purifiées en utilisant un filtre Amicon et la méthode de chromatographie par interaction hydrophobique. L'activité catalytique a été bien préservée à l'état adsorbé. L'élimination des impuretés de faibles poids moléculaires par diafiltration n'a pas eu d'effet ni sur l'activité dépendant du pH en solution, ni sur l'affinité pour les minéraux, ni sur l'activité préservée à l'état adsorbé. La forte présence des autres protéines dans la fraction non retenue réduit l'affinité des phosphatases pour les surfaces minérales mais n'influence pas la préservation d'activité à l'état adsorbé. L'absence d'autres protéines dans les fractions éluées de la colonne hydrophobe a montré une augmentation d'activité après l'adsorption. La comparaison de l'ajout d'autres protéines à ces échantillons, et l'effet de la concentration des phosphatases suggère que l'augmentation d'activité est due à une dimerisation sur la surface des minéraux. La dimerisation ne se produit pas lorsque les voisins ne sont pas des phosphatases.

**Mots clés :** adsorption; activité enzymatique; phosphatase, purification; champignon ectomycorhizien; *Suillus collinitus*

## 1. Introduction

La très faible disponibilité du phosphore (P) dans les sols fait de lui le facteur limitant majeur de la croissance et du développement des plantes dans plusieurs écosystèmes (Vance et al., 2003). L'orthophosphate (Pi), considéré comme la forme par laquelle le phosphore est absorbé par les plantes se retrouve souvent complexé avec plusieurs constituants du sol; ce qui réduit considérablement sa diffusion dans la solution de sol et sa disponibilité (Hinsinger, 2001; Soon, 2008). Les sols tropicaux, dont la minéralogie argileuse est souvent dominée par la kaolinite (Sanchez and Logan, 1992), sont particulièrement sujets à la déficience en Pi (Vance et al., 2003). En réponse à la déficience en Pi, plusieurs plantes ont développé des mécanismes pour l'acquisition de Pi, dont la formation de symbiose avec des champignons ectomycorhiziens capables de mobiliser le Pi par la sécrétion de phosphatases extracellulaires (Perez-Moreno and Read, 2000). Les phosphatases catalysent l'hydrolyse la liaison C-O-P de diverses formes de phosphore organique (Po) en Pi.

La sécrétion de phosphatases acides, dans les solutions nutritives à différentes concentrations en P, par des champignons ectomycorhiziens en culture *in vitro* a déjà été montrée (Antibus et al., 1992; Mousain and Salsac, 1982). Les champignons ectomycorhiziens produisent et sécrètent différentes phosphatases acides. La différence de phosphatases produites par des espèces différentes de champignons ectomycorhiziens a été montrée dans des travaux précédents par l'étude de leur interaction avec des surfaces de sols (Chapitres 2 et 3). Ces enzymes se distinguent entre espèces notamment par leur adsorption sur des surface solides et leur stabilité à l'état adsorbé (Quiquampoix and Burns, 2007; Quiquampoix and Mousain, 2005). Cependant, une même espèce de champignon ectomycorhizien peut produire plusieurs phosphatases qui se différencient par leur spécificité envers le substrat (Louche et al., 2010), ou par leur stabilité lors de l'adsorption sur les argiles (Leprince and Quiquampoix, 1996).

Les enzymes ont une forte affinité pour les surfaces solides et les phosphatases sécrétées dans le sol s'adsorbent sur les colloïdes du sol. L'inhibition ou la perte d'activité catalytique due à l'adsorption sur les colloïdes du sol est l'un des facteurs auxquels sont soumises les phosphatases secrétées dans le sol (Allison, 2006; George et al., 2007a). En effet, l'adsorption peut favoriser le changement de conformation qui modifie l'activité catalytique ou conduire à l'orientation du site actif de l'enzyme vers la surface adsorbante ce qui a pour conséquence de réduire l'accès au substrat (Leprince and Quiquampoix, 1996). L'adsorption peut aussi avoir un effet protecteur sur les enzymes contre la dégradation microbienne (Quiquampoix et al., 2002), leur conférer une plus grande stabilité thermique (Huang et al., 2005) ou augmenter leur durée de vie dans les sols (Nannipieri et al., 1996) (Chapitre 3). L'interaction entre les enzymes et les surfaces solides dépend fortement de la nature de ces surfaces solides. De même, la capacité d'adsorption des fractions argileuses du sol dépend du type d'argile présent dans ces sols, avec une grande différence entre les argiles de type 1:1 et ceux de type 1:2 illustrés respectivement par la kaolinite et la montmorillonite (George et al.,

2007a). Plusieurs études ont essayé de caractériser l'adsorption et l'activité enzymatique de phosphatases sur des surface organo-minérale (Huang et al., 2002; Huang et al., 2005; Kelleher et al., 2004; Rao and Gianfreda, 2000; Rao et al., 1998) mais rares sont les études faites à partir de phosphatases purifiées de champignons ectomycorhiziens.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'interaction des phosphatases à différents niveaux de purification de champignons ectomycorhiziens *Suillus collinitus* avec les deux argiles de référence, la kaolinite et la montmorillonite, qui diffèrent par leur surface spécifique et leur charge de surface. L'adsorption et son effet sur l'activité enzymatique de ces phosphatases purifiées ont été étudiés en fonction du pH. L'interaction de phosphatases non purifiées secrétées dans le milieu de culture de ce champignon ectomycorhizien avec des surfaces de sols naturels ont fait l'objet de précédentes études (Chapitre 2). Dans ce travail, nous voulions tester l'effet inhibiteur ou activateur de solutés présents dans les solutions de culture, et tenter de séparer différentes phosphatases ou isoenzymes éventuellement présentes qui auraient des interactions différentes avec des surfaces minérales. Dans ce travail, les phosphatases de la solution de culture de champignons ectomycorhiziens ont subi différentes étapes de purification.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Obtention des solutions de phosphatases**

Les solutions de phosphatases proviennent de la culture in vitro d'une souche du champignon ectomycorhizien *Suillus collinitus* (code du laboratoire J3.15.35). Les conditions de pré-culture et de culture sont détaillées dans des travaux précédents (chapitre 2 et 3). A la fin de la culture, la solution nutritive qui contient les phosphatases secrétées par les champignons a été filtrée sur une toile Vileda-Mop pour l'élimination des débris organiques puis conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être utilisée pour la séparation et la purification des phosphatases. Cette solution de phosphatase extracellulaire non purifiée est nommée NP dans ce travail.

### **2.2. Purification et fractionnement des phosphatases**

Après décongélation (24 h à  $4^{\circ}\text{C}$ ), les solutions de cultures (NP, non purifiées) de *Suillus collinitus* ont été concentrées (40 fois) à l'aide du système de filtration Amicon Ultra 15 kDA (Millipore). Une partie de ces échantillons concentrés (qui constitue le premier niveau de purification et notée AM, comme Amicon) ont été ramenée à la concentration initiale puis utilisée pour les dosages enzymatiques en présence d'argile. Le tampon de chargement dans le chromatographe contenait du sulfate d'ammonium 1M. La précipité formée en contacte avec cette solution a été enlevée par centrifugation (15 minutes à 15 000 g) et le surnageant filtré à  $0,2\ \mu\text{m}$  avec des filtres Pall Supor®. Le surnageant a été déposé sur une colonne HIC Phenyl 1mL Fast Flow High Sub (GE Healthcare) montée sur le chromatogramme AKTA Purifier 10 (GE Healthcare). Le tampon de chargement était

composé de 25 mM d'acétate de sodium à pH 5 et 1M de sulfate d'ammonium. L'éluion des protéines a été réalisée par 10 mL de tampon acétate (25 mM, pH 5) d'un gradient continu (de 1 à 0 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) avec un débit de 1 mL/min.

Les fractions de chromatographie ont été regroupées en quatre groupes (S1, S2, S3 et S4) en se basant sur le profil d'activité et de quantité de protéine comme indiqué dans le Chapitre 3. Le groupe S1 n'était pas retenu sur la colonne et était riche en protéines détectables par spectroscopie uv à 280 nm. Les groupes de fractions ont été dessalés et concentrés par quatre passages dans l'Amicon Ultra 10 kDa contre de l'eau ultra pure puis conservés à 4°C pour les mesures futures.

### **2.3. Préparation des argiles**

Les argiles de référence utilisées dans cette étude étaient : la kaolinite de Saint-Austell et la montmorillonite du Wyoming. Une mesure a aussi été faite avec la fraction argileuse d'un vertisol de Martinique (Antilles Françaises) dont les caractéristiques se trouvent au Chapitre 2. La fraction fine ( $< 2 \mu\text{m}$ ) a été obtenue par sédimentation et la floculation faite avec NaCl. L'excès de sel a ensuite été éliminé par dialyse dans des bains de lavage successifs jusqu'à ce que le test au nitrate d'argent soit négatif. La suspension argileuse était conservée au réfrigérateur pour les dosages enzymatique.

### **2.4. Mesure de l'activité enzymatique**

Comme détaillé dans le Chapitre 2, trois procédures décrites par Quiquampoix (1987a, b) ont été utilisées pour mesurer l'activité en solution, la proportion d'enzymes adsorbées et l'activité des enzymes à l'état adsorbé à chaque pH.

Procédure A: l'activité enzymatique en solution, en l'absence d'argile.

Procédure:B: l'activité enzymatique dans une suspension contenant 1 g/L d'argile.

Procédure C: l'activité enzymatique dans le surnageant de la suspension d'argile identique à la procédure B.

Le temps de contact des enzymes avec les argiles avant l'ajout de substrat était de 1 heure. Les particules d'argiles ont été ensuite séparées de la solution, avant l'ajout de substrat dans la procédure C, par centrifugation à 23 000 g pendant 15 minutes. L'activité enzymatique a été mesurée en solution ou en suspension tamponnés aux différents pH avec de l'acétate de sodium à 300 mM. Le substrat utilisé était le paranitrophenyl phosphate (pNPP) avec une concentration dans le mélange réactionnel de 6,7 mM, qui rendait le substrat en large excès. La réaction enzymatique a été fait à 25°C durant 40 minutes et a été stoppée avec du tampon glycine (glycine (133 mM); NaOH (125 mM); NaCl (67 mM);  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (83 mM) à pH 10.5). L'argile a été séparée du produit formé dans la procédure B par centrifugation comme indiqué ci-dessus avant la mesure de la concentration du produit formé (paranitrophenol. pNP) dans chaque procédure. La mesure a été faite à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

à microplaque (ELx800 de Biotek). Toutes les mesures ont été faites en trois répétitions avec un contrôle approprié.

Pour chaque préparation de phosphatase et pour chacune des deux argiles, les mesures A, B et C ont été faites à 6 valeurs de pH, de 3 à 6. Pour S2, la fraction ayant le plus d'activité et qui s'est avérée avoir un comportement différent de celui de l'échantillon brut, des mesures supplémentaires ont été faites à pH 4, en présence de montmorillonite et, dans un cas, de la fraction argileuse de vertisol. Trois concentrations de S2 ont été comparées.

## 2.5. Traitements des données

Les vitesses des réactions catalytiques  $V_A$ ,  $V_B$  et  $V_C$  des procédures ont été calculées pour chaque pH et exprimées en pourcentage d'activité catalytique maximale (au pH optimum) en solution pour une meilleure comparaison des fractions d'enzymes. La fraction d'enzymes adsorbées  $F$  a été calculée selon la formule suivante :

$$F = V_C / V_A$$

L'activité relative à l'état adsorbé des enzymes  $R$  (Leprince and Quiquampoix, 1996; Quiquampoix, 1987a) a été calculée pour chaque pH selon la formule suivante :

$$R = (V_B - V_C) / (V_A - V_C)$$

Le test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé à l'aide du logiciel R version 2.13.0 pour comparer statistiquement entre elles les courbes  $V_A$ ,  $V_B$  et  $V_C$ . Des tests ANOVA par paires ont aussi été faits pour certaines séries de données.

## 2.6. Mesure de l'effet d'éventuels inhibiteurs de S1

Pour savoir si l'échantillon S1 contenait des solutés (protéines ou non) qui pourraient agir comme inhibiteurs ou activateurs d'activité des phosphatases de S2, un mélange de S1 et de S2 à quantité d'activité égale a été fait. L'activité catalytique de S1, S1+S2, S2 a été dosée selon les procédures A, B, C au pH 4 avec la montmorillonite. S2 a également été dosé en présence de la fraction argileuse 1 du vertisol étudié dans le Chapitre 2, pour vérifier le phénomène observé sur les argiles de référence.

## 2.7. Adsorption et activité de S2 en fonction de la quantité de S2 ou de BSA

Pour étudier l'effet de concentration des phosphatases à l'état adsorbé sur l'expression de l'activité catalytique, trois concentrations de S2 en présence de montmorillonite au pH 4 ont été mesurées selon les trois procédures A, B et C.

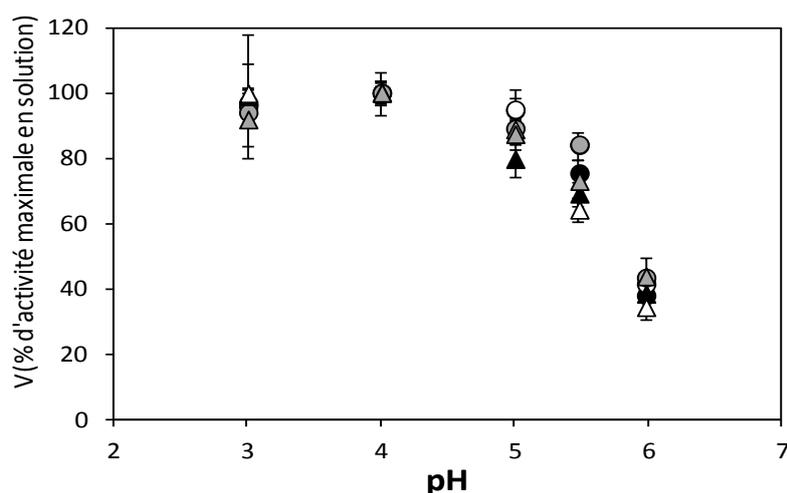
Pour mesurer l'effet de la présence d'autres protéines sur l'adsorption et l'activité catalytique de S2, le dosage d'activité de S2 selon les trois procédures au pH 4 a été réalisé en présence de la montmorillonite et différentes concentrations de BSA (bovine serum albumin, protéine de référence) à 0, 0,013 g/L (équivalent de la quantité de protéine dans S1), 0,4 g/L et

0,8 g/L (équivalent à 67 % du maximum d'adsorption de BSA, Quiquampoix & Ratcliffe, 1992).

### 3. Résultats

#### 3.1. Activité des échantillons de phosphatases en solution

La **Figure V-1** présente l'activité catalytique en solution ( $V_A$ ) des phosphatases à différents niveaux de purifications du champignon ectomycorhiziens *Suillus collinitus* en fonction du pH. Les valeurs des activités ont été normalisées pour faciliter le comparaiso des profils d'activité en fonction du pH. L'activité catalytique au pH optimale mesurée pour chacune des phosphatases NP, AM, S1, S2 S3 et S4 était de 1,26 ; 1 ; 0,23 ; 0,32 ; 0,16 ; 0,27 nKat/mL respectivement. Tous les échantillons de phosphatases ont des profils d'activité en solution en fonction du pH très similaires. Un maximum d'activité a été observé au pH 4, l'activité était diminuée d'environ 60 % à pH 6, mais la perte d'activité aux pH plus acides était moins marquée.



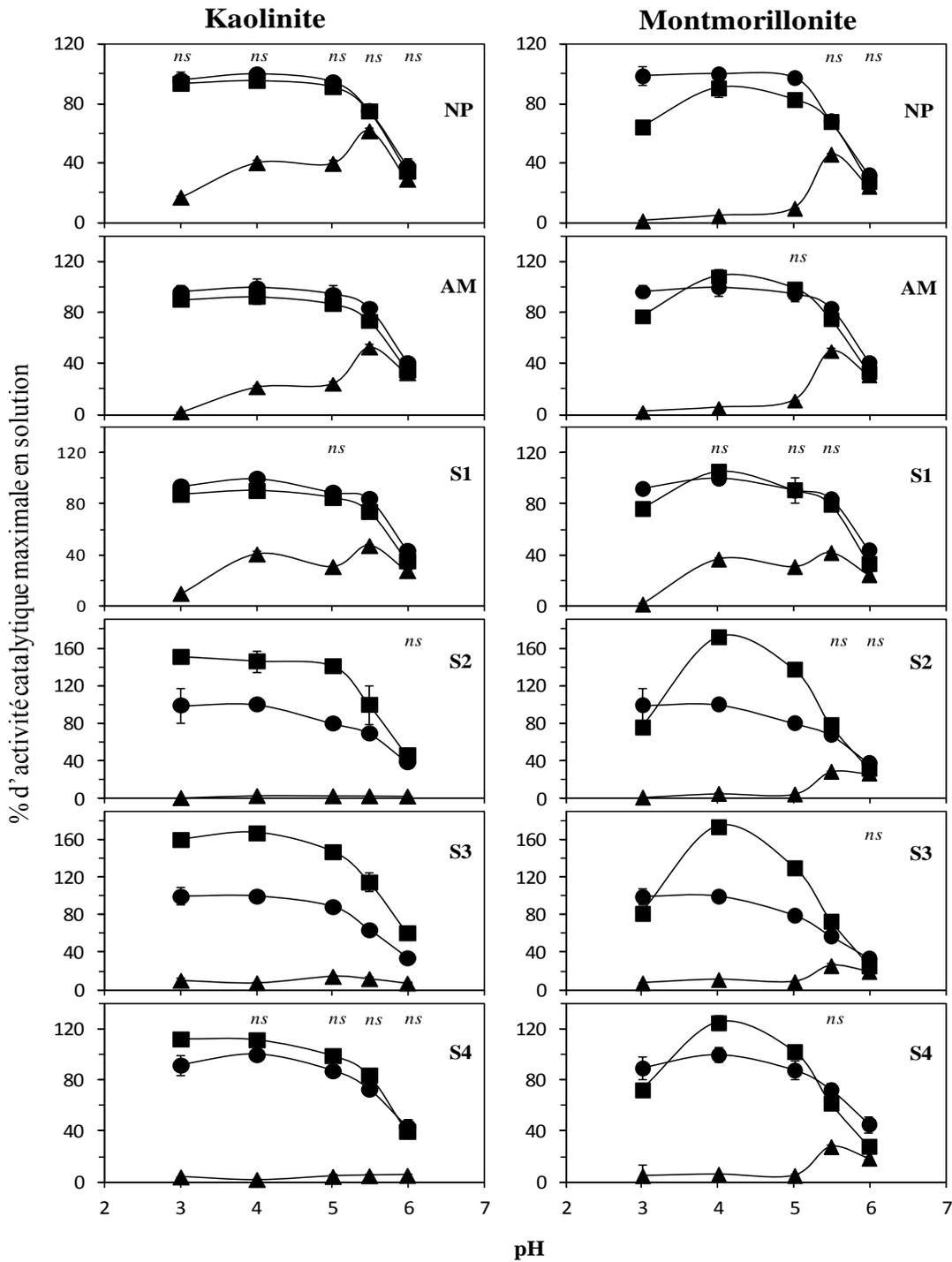
**Figure V-1 :** Activité catalytique en solution des phosphatases du champignon ectomycorhizien *Suillus collinitus* à différents niveaux de purification en fonction du pH. Phosphatases non purifiées (NP, ●), passée à l'Amicon (AM, ○), non retenue sur la colonne hydrophobe S1 (●), retenue sur la colonne hydrophobe S2 (▲), S3 (△) et S4 (▲). Les barres d'erreur entre les trois répétitions sont représentées mais ne sont pas toujours visible

#### 3.2. Adsorption et activité des fractions de phosphatases en présence de minéraux argileux en fonction du pH

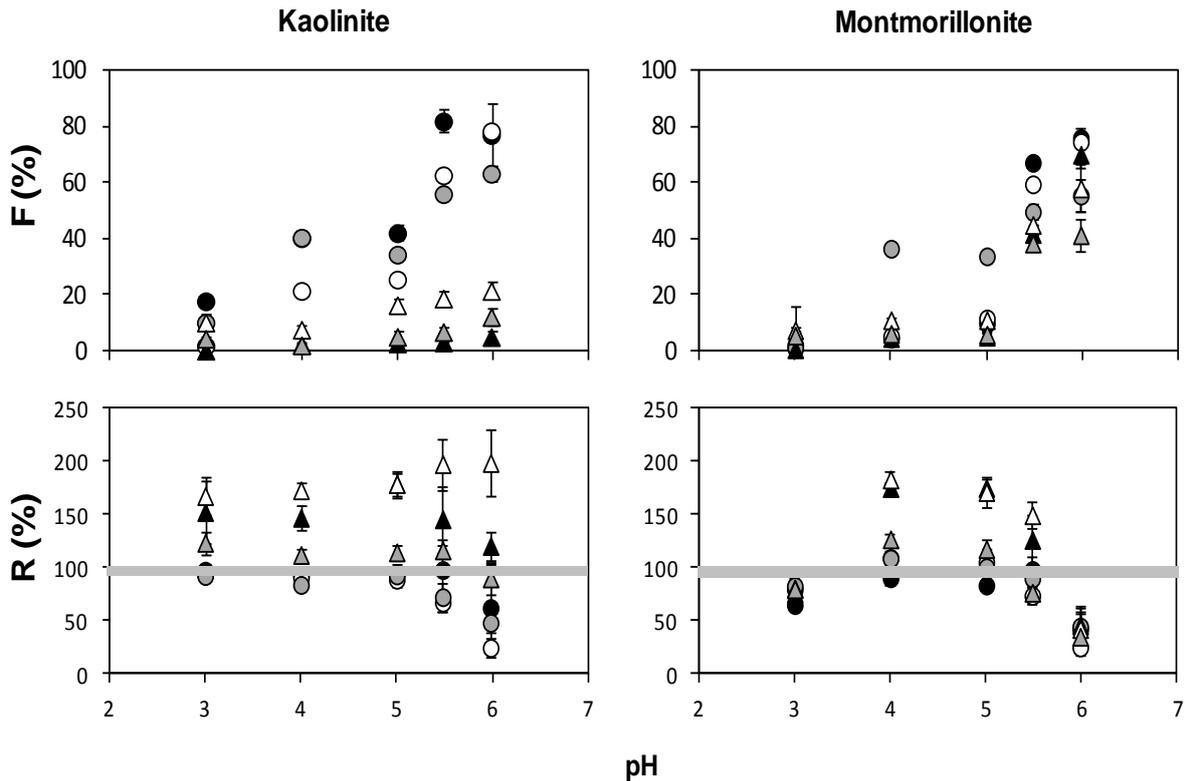
La **Figure V-2** présente l'activité catalytique des échantillons de phosphatases en fonction du pH en solution ( $V_A$ ), dans la suspension de kaolinite ou de montmorillonite ( $V_B$ ) ou dans le surnageant de la suspension séparé des argiles ( $V_C$ ). Toutes les données sont

normalisées par rapport à l'activité en solution au pH optimal pour éviter des différences d'échelle.  $V_C$  représente l'activité des enzymes non adsorbées sur les argiles, et sa comparaison avec  $V_A$  donne des indications sur leur affinités pour ces argiles.  $V_B$  représente l'activité catalytique des enzymes (adsorbées ou libres) en présence des argiles. Les échantillons de phosphatases NP, AM et S1 ont un comportement similaire en présence de kaolinite, montrant une adsorption en fonction du pH similaire, et incomplète sur la kaolinite sur toute la gamme de pH. L'adsorption de S1 et S2 sur la montmorillonite était complète aux pH les plus acides. Par contre, l'affinité de S1 était moindre, avec  $V_C \gg 0$  pour chaque valeur de pH supérieure à 3.

En présence de chacune des argiles,  $V_B \approx V_A$ , pour les trois préparations NP, AM et S1. Les tests KS indiquaient que ces courbes n'étaient pas significativement différentes, même s'il est intéressant de noter que  $V_B$ , baissait entre pH 4 et pH 3 donnant à la courbe l'allure d'une courbe en cloche, contrairement aux courbes  $V_A$ . A pH 3 les valeurs de  $V_B$  et  $V_C$  étaient toujours significativement différentes. Pour les trois fractions éluées des colonnes hydrophobes, S2, S3 et S4, les courbes  $V_B$  et  $V_A$  étaient significativement différentes pour chacune des argiles, la courbe de  $V_B$  étant située au-dessus de  $V_C$ . Les valeurs de  $V_B$  étaient supérieures à celles de  $V_C$  de pH 3 à pH 5,5 en présence de kaolinite, et seulement aux pH 4 et 5 en présence de montmorillonite. En présence de montmorillonite, les courbes  $V_B$ , en fonction du pH avaient toutes l'allure de courbe en cloche, avec une diminution de  $V$  en dessous de pH 4. Ces tendances sont illustrées autrement dans la **Figure V-3**, ou sont représentées les valeurs de  $F$  et  $R$  en fonction du pH. Pour mieux marquer les valeurs de  $R > 100\%$ , une bande grisée indique  $R = 100 \pm 10\%$ . Un contraste marqué entre les trois fractions NP, AM et S1 et les trois fractions ayant été éluées de la colonne hydrophobe, S2, S3 et S4. Ce contraste est visible pour  $F$  et pour  $R$ , en présence de kaolinite et de montmorillonite, avec une plus grande affinité pour les fractions hydrophobes, et des valeurs de  $R$  supérieures à 100%.



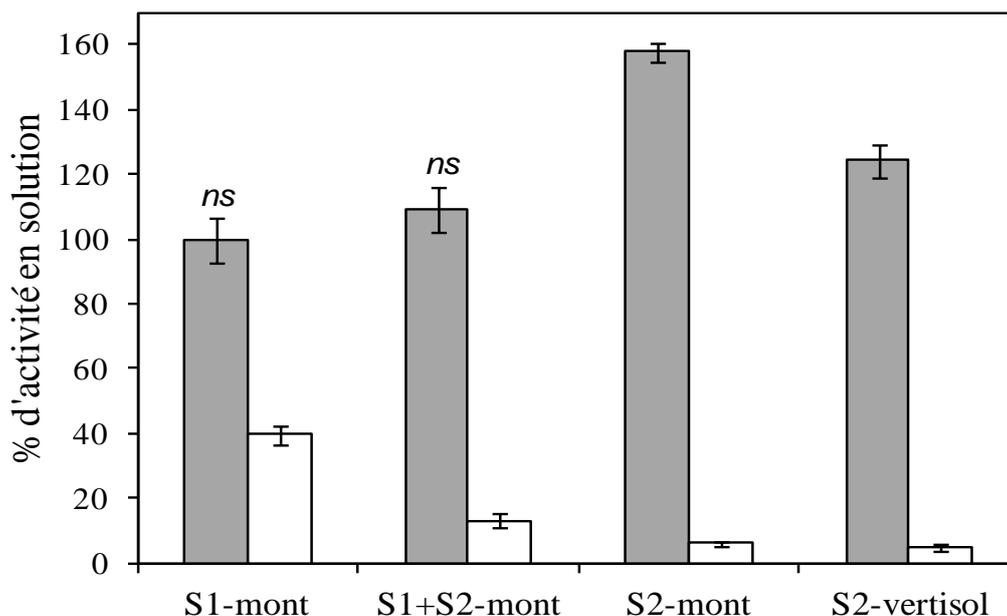
**Figure V-2:** Activité catalytique des phosphatases du champignon ectomycorhizien *Suillus collinitus* à différents niveaux de purification en fonction du pH sur la kaolinite et la montmorillonite. L'activité catalytique en solution V<sub>A</sub> (●), dans la suspension d'argile V<sub>B</sub> (■) et dans le surnageant de la suspension d'argile V<sub>C</sub> (▲). Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions mais ne sont pas toujours visible. *ns* indique que V<sub>B</sub> et V<sub>A</sub> ne sont pas significativement différents avec  $p > 0,05$  (ANOVA).



**Figure V-3:** La fraction des enzymes non adsorbées (F) et l'activité relative des enzymes adsorbées (R) calculés à partir des données de la Figure 2. R est calculé lorsque  $V_C$  est très différent de  $V_B$ . Phosphatase non purifiée (NP, ●), passée à l'Amicon (AM, ○), non retenue sur la colonne hydrophobe S1 (●), retenue sur la colonne hydrophobe S2 (▲), S3 (△) et S4 (▲). Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions mais ne sont pas toujours visibles. La barre grisée indique  $R=100\%$ .

### 3.3. Adsorption et activité de S1 et/ou S2

La **Figure V-4** présente les résultats des procédures A, B et C de S1, S2, du mélange S1+S2 avec la montmorillonite ou pour S2 avec l'argile du vertisol au pH 4 (pH d'activité optimale). Il y a moins d'adsorption pour S1 (valeur de  $V_C$  la plus élevée), un peu moins pour le mélange S1+S2 et plus d'adsorption pour S2 sur la montmorillonite. L'adsorption de S2 sur l'argile du vertisol est quasi similaire à celle sur la montmorillonite. L'activité de S1 en présence de la montmorillonite est égale à l'activité en solution ( $V_B = V_A$ ). Par contre, pour S2,  $V_B$  est supérieur à  $V_A$  avec la montmorillonite (158%) et un peu moins avec le vertisol (125%). Cependant  $V_B$  n'était pas significativement supérieur à  $V_A$  pour S2 mélangée avec S1.



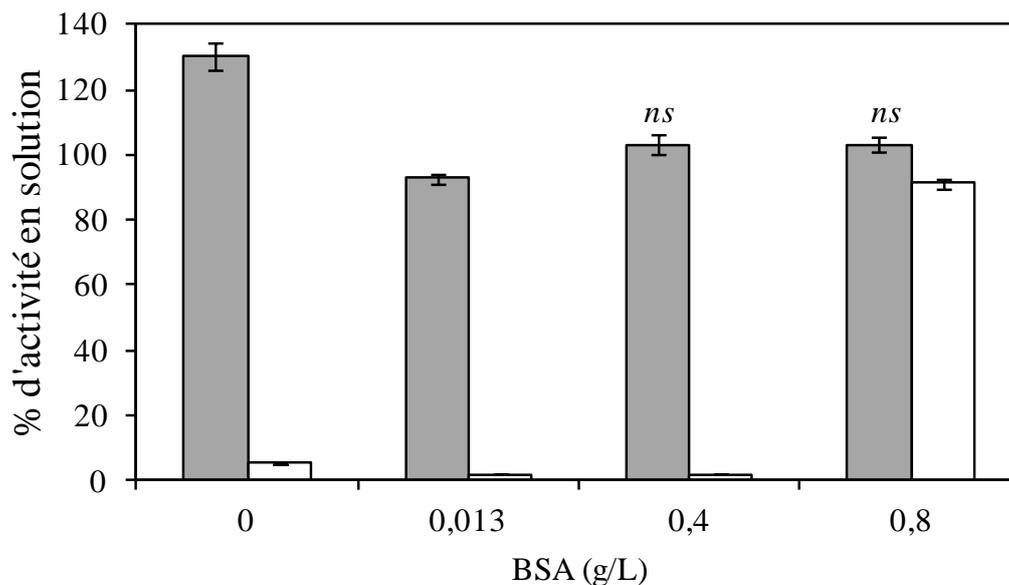
**Figure V-4:** Activité catalytique des phosphatases S1, S2 et du mélange de S1 et S2 sur la montmorillonite ou l'argile du vertisol au pH 4. En gris  $V_B$  et en blanc  $V_C$ . Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions. *ns* indique que l'activité en solution et l'activité en suspension ne sont pas significativement différentes avec  $p > 0,05$  (ANOVA).

### 3.4. Effet de différente quantité de BSA sur l'adsorption et l'activité de S2

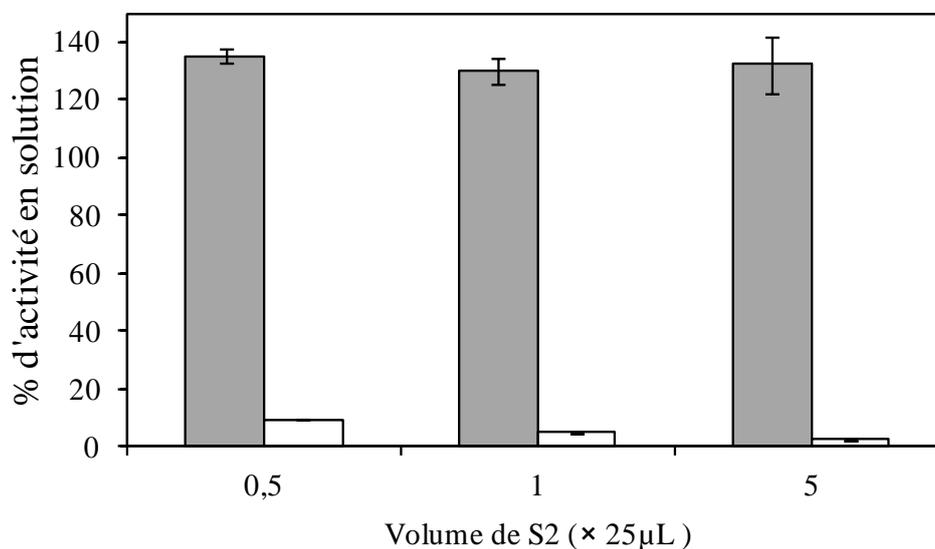
L'effet de quantités variées de BSA sur l'adsorption et l'activité de S2 au pH 4 est représenté sur la **Figure V-5**. A 0,8 g/L de BSA, il y a eu une très faible adsorption de S2 sur la montmorillonite car la valeur de  $V_C$  est élevée et vaut 91% de  $V_A$ . Aux autres concentrations de BSA (0,4 g/L, 0,013 g/L ou 0 g/L) il y a eu une très faible adsorption de S2, avec des valeurs très faibles de  $V_C$  (entre 2 et 5% de  $V_A$ ). En présence de BSA,  $V_B$  est presque égale ou inférieur à  $V_A$ . A l'absence de BSA  $V_B$  est nettement supérieur à  $V_A$ .

### 3.5. Adsorption et activité de S2 en fonction de la quantité de S2

L'adsorption et l'activité de S2 sur la montmorillonite ont été étudiées en fonction de la quantité de S2 au pH 4. L'adsorption de S2 est quasi totale pour les quantités de S2. L'activité catalytique en présence de montmorillonite ( $V_B$ ) est nettement supérieure et proportionnelle à l'activité en solution ( $V_A$ ) pour les trois quantités de S2 étudiées (**Figure V-6**).



**Figure V-5:** Activité catalytique des phosphatases S2 sur la montmorillonite en fonction de la quantité de BSA ajoutée (g/L) au pH 4. En gris V<sub>B</sub> et en blanc V<sub>C</sub>. Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions. *ns* indique que l'activité en solution et l'activité en suspension ne sont pas significativement différentes avec  $p > 0,05$  (ANOVA)



**Figure V-6:** Activité catalytique des phosphatases S2 en présence de la montmorillonite à pH 4 en fonction de la quantité de S2 présente (en volume de S2, 1V = 25 μL). En gris V<sub>B</sub> et en blanc V<sub>C</sub>. Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions.

## 4. Discussion

Des différences marquées selon le degré de purification et de fractionnement des solutions de phosphatases dans les profils d'activité en solution en fonction du pH auraient indiqué la présence d'inhibiteurs donc l'action dépendait du pH, ou la séparation d'isoenzymes ayant probablement un point isoélectrique différent. Comme les inhibiteurs catalytiques sont souvent des molécules de faible masse moléculaire, la diafiltration par les Amicon les aurait éliminés, et ils n'auraient pas été retenus sur les colonnes hydrophobes. Comme il n'a pas été possible de quantifier les phosphatases autrement que par leur activité, il est impossible d'affirmer que l'activité spécifique a été modifiée au cours de la purification.

### 4.1. Affinité des phosphatases pour les surfaces minérales

La faible fraction de phosphatase libre aux valeurs de pH plus acides confirme une forte affinité pour les deux argiles. L'affinité des protéines pour les surfaces solides est connue (Norde and Lyklema, 1991). En particulier, la forte adsorption des enzymes sur les surfaces minérales a fait l'objet de plusieurs études et est bien documentée. L'adsorption des protéines est souvent rapportée comme étant fortement dépendante du pH.

La fraction F des enzymes non adsorbées (**Figure V-3**) augmentait généralement avec le pH. Cette diminution d'affinité aux pH croissants a déjà été observée et s'explique par l'interaction électrostatique entre les charges des protéines dépendant du pH et les charges électronégatives des surfaces basales des argiles qui sont largement indépendantes du pH (Quiquampoix, 1987a; Quiquampoix et al., 1993). Pour des pH inférieurs au point isoélectrique (p. i. e) de la protéine, l'interaction électrostatique se produit entre les charges positives de la protéine et les charges négatives de l'argile et pour des pH supérieurs au point isoélectrique, il y a une répulsion entre les charges négatives de la protéine et de l'argile (Helassa et al., 2009; Leprince and Quiquampoix, 1996; Quiquampoix, 2008; Quiquampoix et al., 1993). Cette interprétation suggère que le point isoélectrique des phosphatases est supérieur ou proche de 6. Les deux phosphatases acides purifiées du champignon *Hebeloma cylindrosporum* étudiées par Leprince et Quiquampoix (1996) avaient des points isoélectriques de 6,6 et 7,1. Par contre, le même phénomène s'observe pour les deux argiles ; la montmorillonite, qui a une charge de surface négative permanente due aux substitutions isomorphes et donc la charge nette ne varie guère avec le pH, et la kaolinite qui possède une charge de surface variable sur les sites de bord. Madliger et al (2010) ont récemment évoqué l'hétérogénéité des surfaces minérales pour expliquer l'adsorption de la protéine insecticide Cry, dite aussi Bt.

La perte d'affinité aux pH plus élevés en contact avec chacune des argiles était plus marquée pour les échantillons contenant une charge de protéine plus élevée, c'est à dire l'échantillon brut, purifié par Amicon et l'échantillon non retenu par la colonne hydrophobe, S1. Pour les autres échantillons, S2, S3 et S4, retenus et élués de la colonne hydrophobe, la charge en protéine, en équivalent de BSA détecté par spectrométrie uv-vis de la

chromatographe était très faible, à la limite de détection. Il y a eu compétition entre la phosphatase et les autres protéines présentes pour l'adsorption. Cette adsorption était plus défavorable à la phosphatase aux pH supérieurs à 4 ou 5, et donc l'adsorption de phosphatase sur chacune des argiles étaient considérablement plus faible. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que l'ajout d'une quantité importante d'une autre protéine, la BSA ou le mélange des fractions S2 et S1 (contenant des protéines) provoquait une diminution de l'affinité des phosphatases pour la surface de montmorillonite.

#### **4.2. Modification de l'activité catalytique des enzymes en présence des argiles**

L'observation inattendue de l'amplification d'activité catalytique des enzymes adsorbées sur les argiles est sans doute le fait le plus marquant dans ces résultats. En effet, les observations habituelles faisaient état soit d'une perte d'activité des enzymes une fois adsorbées sur les surfaces solides (George et al., 2005; Giaveno et al., 2010) notamment les argiles (Kelleher et al., 2004; Leprince and Quiquampoix, 1996), soit une activité conservée c'est-à-dire égale à celle en solution (Chapitre 2 ; (Quiquampoix and Mousain, 2005), ou soit encore d'un effet protecteur des surfaces du sol (George et al., 2005; Nannipieri et al., 1996). Peu d'études ont rapporté un effet amplificateur d'activité d'enzymes par les argiles. L'effet amplificateur d'activité catalytique n'a été observé dans cette étude que pour les phosphatases retenues sur la colonne hydrophobe lors de la séparation par chromatographie. Ce phénomène d'amplification d'activité est proportionnel à la quantité d'enzyme en contact avec les argiles.

Différentes hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer cette amplification d'activité à l'état adsorbé

- La présence d'inhibiteurs en solution enlevés par les minéraux
- La sélection de phosphatase étant plus active
- L'activation des phosphatases par le passage en colonne hydrophobe ou à l'étape d'élution
- Une conformation ou une orientation plus active sur la surface d'argile
- La dimérisation des phosphatases sur la surface minérale (le dimère étant plus actif)

La similarité entre les profils d'activité en solution pour chacune des fractions est un élément défavorable à l'hypothèse de présence d'inhibiteurs en solution qui serait enlevés par la phase minérale, et de plus cette explication ne s'accorde pas avec le fait que l'activation n'est observée que pour les fractions S2, S3 et S4. De même, la similarité entre les courbes  $V_A$  pour toutes les fractions ne suggèrent pas que des phosphatases plus actives soient présentes dans les fractions S2, S3 et S4, et cette hypothèse ne pourrait pas expliquer la différence entre activité en solution et à l'état adsorbé. De même, une modification de la conformation des enzymes par le passage en colonne hydrophobe, leur conférant une plus grande activité, n'expliquerait pas la différence entre l'activité en solution et à l'état adsorbé. Il est possible qu'une conformation ou une orientation du site actif soit responsable de la plus grande activité spécifique observée à l'état adsorbée, par rapport à l'activité en solution. Servagent-Noinville et al (2000) et Quiquampoix & Ratcliffe (1992) ont démontré que la BSA

subit une modification de conformation après adsorption sur des surfaces minérales. A l'inverse, Baron et al. (1999) ont démontré que l'orientation de la chymotrypsine adsorbée sur la montmorillonite est responsable pour la diminution d'activité catalytique observée. Mais reste à expliquer pourquoi ceci n'est observé que pour les fractions S2, S3 et S4, ayant été retenues par la colonne hydrophobe. Comme dit ci-dessus, la similarité entre les courbes de  $V_A$  en fonction du pH ne suggère pas des différences importantes entre les phosphatases dans les six fractions. Il n'a pas été possible de caractériser toutes les protéines présentes dans les différentes fractions, mais rien n'indique une différence marquée qui provoquerait cet effet. Les fractions S2, S3 et S4 contiennent moins de protéines, le taux de recouvrement des surfaces est donc encore plus faible qu'avec les autres fractions. Mais comme l'effet est observé pour les deux minéraux, ayant des surfaces spécifiques très contrastées, il est difficile d'imaginer comment le taux de recouvrement favoriserait un changement de conformation ou une orientation préférentielle des phosphatases. L'hypothèse la plus probable nous paraît qu'une interaction intermoléculaire à l'interface minérale favorise une forme d'enzyme plus active. L'effet est plus marqué pour les échantillons ne contenant pas d'autres protéines, et en plus l'ajout de protéine BSA ou la fraction de S1 et S2 en présence de montmorillonite diminue ou élimine l'activation. L'adsorption sur les argiles n'est pas la seule condition qui favorise l'amplification d'activité mais aussi la faible présence d'autres protéines que celles retenues sur la colonne hydrophobe. Nous proposons que l'activation soit due à la dimérisation des phosphatases sur les surfaces minérales. Il est connu que les interactions intermoléculaires, donc certaines mènent à la dimérisation, voire à la polymérisation, peuvent être différentes en solution et à l'état adsorbé (Helassa et al., 2011; Janot et al., 2010).

La dimérisation peut avoir eu lieu entre les entités hydrophobes des enzymes. Il a déjà été rapporté que des enzymes dimères pouvaient avoir une activité catalytique plus élevée que celui des monomères. Néanmoins cette hypothèse mérite d'être vérifiée par des analyses plus pointues.

L'effet le plus surprenant de cette étude reste l'activation à l'état adsorbé, mais il convient de noter que pour les fractions brutes, purifiées avec Amicon et S1, non retenue sur la colonne hydrophobe, les phosphatases produites par ce champignon montre une forte stabilité à l'état adsorbé sur les argiles alors que la réduction d'activité après adsorption des enzymes est souvent rapportée. Généralement il n'y a pas de perte d'activité des enzymes adsorbées au pH optimum (pH 4) avec plus de 80%. Les taux d'activités relatifs à l'état adsorbé R varie, cependant avec le pH et selon l'argile. L'étude de l'activité relative des enzymes adsorbées à un seul pH peut donner une interprétation erronée. Avec la kaolinite, R est d'environ 100% pour les échantillons moins purifiés ou non purifié (AM, S1, NP) aux pH initiaux (pH 3-5) et diminue au delà du pH 5. Le comportement de R en fonction du pH observé avec la kaolinite concorde avec celui observé avec l'argile des sols ferrallitiques pour l'échantillon non purifié (Chapitre 2). En revanche, avec la montmorillonite, les valeurs de R des enzymes AM, S1 et NP sont d'abord croissantes avec le pH jusqu'au pH optimum d'activité puis décroissantes contrairement à ce qui a été observé avec l'argile du vertisol pour

l'échantillon NP. Avec le vertisol R diminuait fortement du pH initial au pH final avec une valeur d'environ 100% au pH initial (pH 3; Chapitre 2).

#### **4.3. Effets comparés des deux argiles sur l'interaction avec les phosphatases.**

Il est connu que les enzymes ont une affinité pour les surfaces minérale et l'adsorption et l'activité catalytique qui s'en suit dépendent fortement de la nature organo-minérale de la surface (Rao et al., 2000). Il est généralement rapporté que les argiles de type 2:1 ont un pouvoir adsorbant plus élevé que les argiles de type 1:1 illustré respectivement par la montmorillonite et la kaolinite (George et al., 2007a), et que le premier sera plus inhibiteur d'activité enzymatique que le second (Nannipieri et al., 1996). L'adsorption des échantillons NP et AM sur les deux argiles vont dans le même sens que les observations ci-dessus, une adsorption plus forte sur la montmorillonite que sur la kaolinite entre les pH 3 et 5. Par contre sur tout le reste des échantillons (S1, S2, S3 et S4), l'adsorption est la même pour les deux argiles certainement due au faible rapport protéine/argile comparé à celui des échantillons NP et AM. Ceci ne peut être interprété par le fait que ces deux argiles pourraient avoir une même capacité d'adsorption, mais plutôt par le fait qu'il y avait peu de protéine pour la quantité d'argile donnée. Toutes les enzymes seraient donc adsorbées sur ces argiles indépendamment de la capacité d'adsorption des argiles qui n'a pas été déterminé dans ces travaux.

Hormis le fait que l'activité des phosphatases ait été généralement maintenue ou amplifiée en présence des argiles comme mentionné dans le paragraphe 4.1 ci-dessus, le profil d'activité des enzymes adsorbées en fonction du pH est différent entre montmorillonite et kaolinite. Avec la kaolinite, le profil d'activité est le même qu'en solution et il n'y a pas eu de perte d'activité. En revanche, avec la montmorillonite, on a observé une perte d'activité au pH 3 pour tous les échantillons de phosphatases et le profil d'activité présente un maximum au pH 4. Au pH 3 la montmorillonite est inhibitrice d'activité enzymatique contrairement à la kaolinite (Nannipieri et al., 1996).

#### **Conclusion**

Cette étude a révélé un phénomène inattendu et encore très rarement observé : une amplification d'activité catalytique d'enzyme après adsorption sur des minéraux argileux. Ceci ne concerne que les phosphatases du champignon ectomycorhiziens *Suillus collinitus* retenues sur la colonne hydrophobe de chromatographie lors de la séparation des enzymes. La présence d'un inhibiteur qui serait adsorbé par les argiles est peu probable. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène est la dimérisation des enzymes par leurs entités hydrophobes qui donnerait lieu à des enzymes avec des activités catalytiques plus élevées que les monomères de base. Néanmoins cette hypothèse mérite d'être vérifiée par des analyses plus poussées. En outre les phosphatases peu ou non purifiées montrent une forte affinité pour les deux argiles et une grande stabilité de l'activité catalytique à l'état adsorbé dépendant du pH. Ces enzymes ont montré peu de différence de comportement entre les deux types d'argile.

### **Remerciements**

Nous remercions Philippe Deleporte pour ses conseils en analyses statistique, Catherine Pernot qui maintient la mycothèque de l'UMR Eco&Sols et le Ministère de la recherche et de l'Education Nationale de la Côte d'Ivoire pour la bourse attribuée à B. Kedi.

### Références citées

- Allison, S., 2006. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry* 81, 361-373.
- Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L., Linkins, A.E., 1992. Phosphatase-activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 70, 794-801.
- Baron, M.H., Revault, M., Servagent-Noinville, S., Abadie, J., Quiquampoix, H., 1999. Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 214, 319-332.
- George, T.S., Quiquampoix, H., Simpson, R.J., Richardson, A.E., 2007. Interactions between phytases and soil constituents: implications for the hydrolysis of inositol phosphates, In: Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J. (Eds.), *Inositol phosphates: linking agriculture and the environment*. Cabi, Wallingford UK, pp. 221-241.
- George, T.S., Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2005. Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 977-988.
- Giaveno, C., Celi, L., Richardson, A.E., Simpson, R.J., Barberis, E., 2010. Interaction of phytases with minerals and availability of substrate affect the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 491-498.
- Helassa, N., Quiquampoix, H., Noinville, S., Szponarski, W., Staunton, S., 2009. Adsorption and desorption of monomeric Bt (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 498-504.
- Helassa, N., Revault, M., Quiquampoix, H., Déjardin, P., Staunton, S., Noinville, S., 2011. Adsorption on montmorillonite prevents oligomerization of Bt Cry1Aa toxin. *Journal of Colloid and Interface Science* 356, 718-725.
- Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237, 173-195.
- Huang, Q., Chen, W., Gianfreda, L., Violante, A., 2002. Adsorption of acid phosphatase on minerals and soil colloids in presence of citrate and phosphate. *Pedosphere* 12, 339-348.
- Huang, Q., Liang, W., Cai, P., 2005. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45, 209-214.
- Janot, J.-M., Boissiere, M., Thami, T., Tronel-Peyroz, E., Helassa, N., Noinville, S., Quiquampoix, H., Staunton, S., Dejardin, P., 2010. Adsorption of Alexa-Labeled Bt Toxin on Mica, Glass, and Hydrophobized Glass: Study by Normal Scanning Confocal Fluorescence. *Biomacromolecules* 11, 1661-1666.
- Kelleher, B.P., Willeford, K.O., Simpson, A.J., Simpson, M.J., Stout, R., Rafferty, A., Kingery, W.L., 2004. Acid phosphatase interactions with organo-mineral complexes: influence on catalytic activity. *Biogeochemistry* 71, 285-297.
- Leprince, F., Quiquampoix, H., 1996. Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted

- by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Soil Science* 47, 511-522.
- Louche, J., Ali, M.A., Cloutier-Hurteau, B., Sauvage, F.-X., Quiquampoix, H., Plassard, C., 2010. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 323-335.
- Madliger, M., Sander, M., Schwarzenbach, R.P., 2010. Adsorption of Transgenic Insecticidal Cry1Ab Protein to SiO<sub>2</sub>. 2. Patch-Controlled Electrostatic Attraction. *Environmental Science & Technology* 44, 8877-8883.
- Mousain, D., Salsac, L., 1982. Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des symbiotes ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association, In: Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Trouvelot, A. (Eds.), *Les mycorhizes, partie intégrante de la plante: biologie et perspectives d'utilisation*. Les Colloques de l'INRA n°13, Dijon, France, pp. 87-100.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P., 1996. Humus and enzyme activity, In: Alessandro, P. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 293-328.
- Norde, W., Lyklema, J., 1991. Why proteins prefer interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 2, 183-202.
- Perez-Moreno, J., Read, D.J., 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* 145, 301-309.
- Quiquampoix, H., 1987a. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a  $\beta$ -D-glucosidase on different mineral surfaces. *Biochimie* 69, 753-763.
- Quiquampoix, H., 1987b. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. II. Competitive effects on the adsorption of a  $\beta$ -D-glucosidase in mixed mineral or organo-mineral systems. *Biochimie* 69, 765-771.
- Quiquampoix, H., 2008. Enzymes and proteins, interactions with soil-constituent surfaces, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 210-216.
- Quiquampoix, H., Burns, R.G., 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* 3, 401-406.
- Quiquampoix, H., Mousain, D., 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus, In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.), *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, Wallingford UK, pp. 89-112.
- Quiquampoix, H., Ratcliffe, R.G., 1992. A <sup>31</sup>P NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation Mn<sup>2+</sup>: modification of conformation with pH. *Journal of Colloid and Interface Science* 148, 343-352.

- Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.H., 2002. Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 285-306.
- Quiquampoix, H., Staunton, S., Baron, M.H., Ratcliffe, R.G., 1993. Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 75, 85-93.
- Rao, M.A., Gianfreda, L., 2000. Properties of acid phosphatase-tannic acid complexes formed in the presence of Fe and Mn. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1921-1926.
- Rao, M.A., Violante, A., Gianfreda, L., 1998. Interactions between tannic acid and acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 111-112.
- Rao, M.A., Violante, A., Gianfreda, L., 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1007-1014.
- Sanchez, P., Logan, T., 1992. Myths and science about the chemistry and fertility of soils in the tropics, In: Lal, R., Sanchez, P. (Eds.), *Myths and Science of Soils of the Tropics*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 35-46.
- Servagent-Noinville, S., Revault, M., Quiquampoix, H., Baron, M.H., 2000. Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces: FTIR analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 221, 273-283.
- Soon, Y.K., 2008. Phosphorus cycle, In: Chesworth, W. (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science*. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 547-553.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.

**Chapitre VI :**  
**Conclusion générale et perspectives**

## Chapitre VI: Conclusion générale et perspectives

---

### 1. Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était d'étudier divers facteurs susceptibles de déterminer l'efficacité des phosphatases de champignons ectomycorhiziens dans le sol, notamment les sols tropicaux où la nutrition phosphatée est souvent un facteur limitant pour la production et la croissance des plantes. Ces travaux nous ont permis de répondre à un certain nombre de questions concernant les propriétés du sol qui déterminent l'adsorption et le comportement catalytique des phosphatases après adsorption, et la persistance de l'activité catalytique des phosphatases dans les sols. En outre, elles nous ont aussi permis de mettre au point une technique de purification des solutions de cultures de champignons contenant les phosphatases sécrétées. Elles nous ont enfin permis de comparer le comportement des phosphatases purifiées en contact avec des minéraux argileux.

#### 1.1. Les propriétés du sol qui déterminent l'adsorption et l'activité catalytique des phosphatases

Le comportement catalytique et l'adsorption des phosphatases sur les surfaces ont été étudiés en fonction de la granulométrie et des revêtements organo-minéraux de divers sols tropicaux. Les résultats ont révélé une diversité de comportement des phosphatases fongiques étudiées avec les colloïdes des sols. Nous avons noté que l'affinité pour les colloïdes des sols variait largement entre les enzymes, même entre les enzymes d'une même espèce de champignon (*Hebeloma cylindrosporum*). Les enzymes des deux souches de *H. cylindrosporum* ont montré des affinités très similaires pour tous les sols étudiés, contrairement aux enzymes de *Suillus collinitus* qui avaient des affinités différentes pour le vertisol et les sols ferrallitiques. Cette affinité des enzymes dépend du pH, excepté le cas des enzymes de *S. collinitus* avec l'argile d'un vertisol. Ce résultat suggère que les études des affinités des enzymes pour les surfaces doit se faire sur une gamme de pH et non seulement avec le pH optimum comme c'est souvent le cas. En outre, le pH et la nature des surfaces de sols ne sont pas les seuls facteurs pour déterminer le comportement des enzymes dans le sol. Selon ces travaux, le comportement des enzymes en contact avec les surfaces dépend fortement de l'origine et des propriétés intrinsèques des enzymes.

En général, l'activité catalytique des phosphatases n'a pas été inhibée à l'état adsorbé sur toute la gamme de pH étudiée. Seules les enzymes de *S. collinitus* ont montré une perte d'activité avec l'argile d'un vertisol. Ces observations ont montré qu'il n'y avait pas de relation entre l'affinité des enzymes pour les surfaces de sol et l'activité catalytique résultante.

#### 1.2. Les propriétés du sol qui déterminent la persistance des phosphatases

L'étude de la persistance de l'activité catalytique des phosphatases en contact avec les sols ou en solution a montré que la diminution de l'activité catalytique ne peut être seulement

attribuée à la dégradation chimique ou microbienne des phosphatases. Les phosphatases dont la persistance a été étudiée ont montré une différence de stabilité en solution et en contact avec les sols. Les phosphatases de *H. cylindrosporium* ont montré une bonne stabilité pendant le temps d'incubation d'un mois avec les sols ferrallitiques alors qu'elles ont été rapidement dégradées en solution ou avec le vertisol. Par contre les phosphatases de *S. collinitus* avaient une bonne stabilité en solution et sur les sols malgré les pertes d'activité observées liées au type de sol. Les résultats montrent que la persistance des phosphatases fongiques dans les sols peut être déterminée par le type de sol mais aussi par l'origine et les caractéristiques des phosphatases. Les sols ferrallitiques ont montré un pouvoir protecteur contre la dégradation rapide des phosphatases de *H. cylindrosporium* contrairement au vertisol.

### **1.3. Purification des phosphatases sécrétées dans le milieu de culture**

Les phosphatases fongiques ont montré des comportements très différents avec les sols en partie liés à leur origine fongique et leurs caractéristiques. Les expérimentations ont été faites avec des solutions brutes de culture des champignons contenant les phosphatases mais aussi d'autres protéines. La purification de ces solutions par chromatographie d'interaction hydrophobe a révélé deux et trois pics d'activités respectivement pour *H. cylindrosporium* et *S. collinitus* dont un pic non retenu sur la colonne de chromatographie pour chaque champignon. Les électrophorèses sur gels réalisés sur les fractions purifiées de *S. collinitus* ont montré que ces phosphatases avaient toutes la même masse moléculaire bien qu'ayant des propriétés hydrophobes différentes. Les essais pour déterminer le point isoélectrique de ces phosphatases n'a pas donné le résultat escompté. Les essais de caractérisation de ces enzymes méritent d'être poursuivis afin de mieux connaître les propriétés de ces phosphatases qui ont montré des comportements variés en contact avec les sols.

### **1.4. Comportement des fractions de phosphatases purifiées avec deux minéraux argileux**

Le résultat le plus surprenant de ces travaux de thèse reste le comportement des fractions de phosphatases retenues sur la colonne hydrophobe avec les minéraux argileux. En effet, ces fractions de phosphatases ont montré en contact avec les surfaces minérales une activité catalytique largement supérieure à celle observée en solution. Jusqu'à présent aucun travail de recherche n'a fait mention de ce phénomène. Il est seulement courant d'observer une activité catalytique des enzymes à l'état adsorbées inférieure ou égale à celle en solution. L'hypothèse la plus probable avancée est le fait qu'une dimérisation s'est produite sur la surface des minéraux entre ces phosphatases pour donner des dimères d'activité catalytique plus élevée que celle des monomères de bases. Si cette hypothèse est avérée, elle pourrait présenter un intérêt particulier dans la compréhension des phénomènes évolutifs liés au fonctionnement de ces enzymes dans la nutrition phosphatée des microorganismes et plantes dans les sols.

## **2. Perspectives**

### **2.1. Effet des sols sur la stabilité des phosphatases**

La température est l'un des facteurs abiotiques qui influence l'activité et la stabilité des enzymes. Il a été rapporté que cette stabilité thermique était fonction de la nature de la surface adsorbante. Il serait intéressant de déterminer le rôle des composants des sols tropicaux, souvent soumis à de fortes températures, sur la stabilité et le fonctionnement des phosphatases. Chaque composant des sols et le type de sol devra être pris en compte dans ces études. Cette étude devrait également être conduite avec des phosphatases fongiques qui ont montré des comportements variés avec les sols.

### **2.2. Analyses biochimiques complémentaires des phosphatases fongiques**

L'une des principales conclusions de cette thèse est que l'influence que pourraient avoir les surfaces du sol sur le comportement des enzymes est en partie liée aux caractéristiques de ces enzymes. Des essais de purification et de caractérisation de ces phosphatases ont été faits mais restent insuffisants pour connaître les propriétés biochimiques qui différencient ces enzymes dans leur interaction avec les surfaces solides. Pour améliorer la séparation des différentes phosphatases sécrétées par les champignons, d'autres méthodes de purification par chromatographie telles que par échange d'ions peuvent être faites en complément à la méthode d'interaction hydrophobe. Dans la littérature, plusieurs méthodes couplées de chromatographie souvent utilisées pour séparer des enzymes ont été rapportées. Nous proposons pour la suite de ces travaux de poursuivre les essais de caractérisation des fractions isolées de phosphatases. Les essais pour la détermination des points isoélectriques de chacune des fractions de phosphatases des champignons doivent être poursuivis. Pour une caractérisation plus poussée, ces essais pourraient être complétés avec d'autres analyses telles que la spectroscopie de RMN et infrarouge. La capacité de ces phosphatases à hydrolyser différents types de substrat pourrait permettre de connaître la spécificité de ces enzymes aux substrats.

### **2.3. Élucider l'hypothèse de dimérisation des phosphatases**

L'hypothèse d'une dimérisation des phosphatases a été avancée pour expliquer l'amplification d'activité des fractions de phosphatases et mérite d'être élucidée. Comme il n'existe pas de méthodes pour déterminer clairement la structure des enzymes adsorbées sur la surface des minéraux, il s'avèrera donc difficile de vérifier cette hypothèse de dimérisation. Néanmoins, l'utilisation de la microscopie à force atomique (AFM) pourrait se révéler une méthode de choix pour la poursuite de cette étude.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure I-1:</b> Distribution des ions orthophosphates en solution en fonction du pH. (Brady and Weil, 1996) .....	8
<b>Figure I-2 :</b> Diagramme de la solubilité des composés phosphatés dans le sol en fonction du pH (Lindsay and Moreno, 1960).....	9
<b>Figure I-3:</b> Conformations des stéréo-isomères de l'hexaphosphate d'inositol (Cosgrove, 1980) .....	15
<b>Figure I-4:</b> Modèle conceptuel du cycle du P dans les sols tropicaux (Reed et al., 2011).....	16
<b>Figure I-5:</b> Exemple de profil du sol ( <a href="http://soils.usda.gov/education/resources/lessons/profile/">http://soils.usda.gov/education/resources/lessons/profile/</a> ) .....	23
<b>Figure I-6:</b> Composition d'un sol de prairie (% en volume).....	24
<b>Figure I-7:</b> Notion de feuillets, couches T et O pour un minéral de type 1:1 (Traoré, 2003) ..	26
<b>Figure I-8:</b> Diagramme de classification texturale des sols (avec les particules < 2 mm) proposé par USDA ( <a href="http://soils.usda.gov/technical/aids/investigations/texture/">http://soils.usda.gov/technical/aids/investigations/texture/</a> ) .....	29
<b>Figure I-9:</b> Mécanismes possible des interactions entre enzymes et les surfaces minérales qui pourraient expliquer la différence entre l'activité catalytique en solution et celle à l'état adsorbé. Rouge = surface minérale, bleu = enzyme, vert site actif de l'enzyme, S = substrat et P= produit de la réaction enzymatique (Quiquampoix and Burns, 2007) .....	39
<b>Figure I-10:</b> Activités de phosphatases de trois champignons ectomycorhiziens en contact avec la surface de la montmorillonite en fonction du pH. A= Activité catalytique en solution en absence de surfaces adsorbantes, B= Activité catalytique en présence de surfaces adsorbantes (l'enzyme est adsorbée en proportion variable dépendant du pH), C= Activité catalytique après l'élimination des enzymes adsorbées (pour mesurer la contribution des enzymes non adsorbées de l'activité mesurée en B). La phosphatase de <i>Rhizopogon roseolus</i> montre le schéma le plus complexe: l'adsorption et l'activité catalytique à l'état adsorbé dépendent du pH, et une partie de l'activité est perdue après adsorption. La phosphatase de <i>Pisolithus arrhizus</i> affiche un comportement simple: il n'y a pas d'interaction avec la surface de l'argile. La phosphatase de <i>Suillus mediterraneensis</i> est aussi simple: l'adsorption est complète et dépendant du pH, mais l'activité catalytique n'est pas affectée par l'adsorption (Quiquampoix and Burns, 2007). .....	41
<b>Figure II-1:</b> Effect of soil clays on the pH dependence of catalytic activity of acid phosphatases from three ectomycorrhizal fungi, <i>Suillus</i> (Sc) and <i>Hebeloma</i> (Hc1 and Hc2): catalytic activity in solution $V_A$ (●), in suspension of soil clay $V_B$ (■) and in the	

supernatant solution of soil clay suspension  $V_C$  ( $\blacktriangle$ ). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible, given the symbol size. .... 66

**Figure II-2:** Non-adsorbed enzyme fraction (F) and relative activity of the adsorbed enzyme (R) calculated from data presented in Figure 1. Closed symbols represent vertisol clay and open symbols ferralsol clay. Bars show experimental variability between triplicates ..... 67

**Figure II-3:** Comparison adsorption and catalytic activity of each of the AcPases (Sc, Hc1 and Hc2) in contact with each of the four ferralsols as a function of pH: non-adsorbed fraction (F) and relative activity of the adsorbed enzyme (R) for F1 ( $\circ$ ), F2 ( $\square$ ), F3 ( $\diamond$ ) and F4 ( $\triangle$ ). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible. .... 69

**Figure II-4:** Effect of soil particle size on adsorption of AcPase Sc and AcPase Hc1 as a function of pH: non-adsorbed fraction (F) with soil clay (closed symbol) and sand sized fraction (open symbol). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible. .... 70

**Figure II-5:** Effect of chemical treatments of soils on adsorption of AcPase Sc and AcPase Hc1 as a function of pH: non-adsorbed fraction (F) with untreated soil (closed symbol), after DCB treatment (open symbol) and  $H_2O_2$  treatment (shaded symbol). Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible. .... 72

**Figure II-6:** Effect of soil particle size on relative activity of adsorbed enzyme (R) of AcPase Sc and AcPase Hc1 s a function of pH. Closed symbols represent soil clay and open symbols sand sized fraction. Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible, given the symbol size. .... 73

**Figure II-7:** Effect of chemical treatments of soils on relative catalytic activity of adsorbed enzyme (R) of AcPase Sc and AcPase Hc1 as a function of pH. Closed symbols represent untreated soil, open symbols after DCB treatment and shaded symbols  $H_2O_2$  treatment. Bars show experimental variability between triplicates, but are not always visible. .... 74

**Figure III-1:** Activity of acid phosphatases *Hebeloma cylindrosporum* (Hc) as function of incubation period at 25°C, in solution ( $\circ$ ), immobilised on sterilised soil ( $\square$ ) and on non-sterilised soil ( $\blacksquare$ ). Native phosphatase activity at pH 5,5 from sterilised soils ( $\diamond$ ) and non-sterilised soils ( $\blacklozenge$ ). Top figures, acrisols, A1 and A2. Bottom figure, vertisol. Error bars indicate variability calculated from triplicate incubations. Curve bearing the same letters were not significantly different ( $P < 0.05$ ). .... 90

**Figure III-2:** Activity of acid phosphatases *Suillus collinitus* (Sc) as function of incubation period at 25°C, in solution ( $\circ$ ), immobilised on sterilised soil ( $\square$ ) and on non-sterilised

soil (■). Native phosphatase activity at pH4 from sterilised soils (◇) and non-sterilised soils (◆). Top figures, acrisols, A1 and A2. Bottom figure, vertisol. Error bars indicate variability calculated from triplicate incubations. Curve bearing the same letters were not significantly different ( $P < 0.05$ ) ..... 92

**Figure IV-1:** Profil de chromatographie sur une colonne hydrophobe des phosphatases sécrétées par le champignon ectomycorhizien *Suillus collinitus*. ..... 106

**Figure IV-2:** Profil de chromatographie sur une colonne hydrophobe des phosphatases sécrétées par le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. ..... 106

**Figure IV-3:** SDS-PAGE 1D (gel à 14% d'acrylamide) pour les phosphatases sécrétées par le champignon ectomycorhizien *suillus collinitus* en culture *in vitro* sous condition dénaturante (A) ou non dénaturante (B). Révélation des protéines au nitrate d'argent (gel A) et révélation de phosphatase par activité en utilisant comme substrat  $\beta$ -naphtylphosphate (gel B). Et: protéine étalon; AM: échantillon brut de phosphatase concentré à l'Amicon; S1: groupe de fraction de phosphatase non retenue par la colonne hydrophobe de la chromatographie; S2, S3 et S4: les trois groupes de fraction retenue par la colonne hydrophobe de la chromatographie. v, 2v et 3v signifie respectivement un, deux et trois volumes d'échantillon déposés sur le gel. .... 108

**Figure IV-4:** SDS-PAGE 2D (gels à 10% d'acrylamide) des phosphatases sécrétées par le champignon ectomycorhizien *suillus collinitus* en culture *in vitro* sous condition non dénaturante (A). Révélation des protéines étalon au nitrate d'argent sur gel 1D (B) et révélation de phosphatase par activité en utilisant comme substrat  $\beta$ -naphtylphosphate (gels A). Et: protéine étalon; AM: échantillon brut de phosphatase concentré à l'Amicon; S1: groupe de fraction de phosphatase non retenue par la colonne hydrophobe de la chromatographie. .... 109

**Figure V-1:** Activité catalytique en solution des phosphatases du champignon ectomycorhizien *Suillus collinitus* à différents niveaux de purification en fonction du pH. Phosphatases non purifiées (NP, ●), passée à l'Amicon (AM, ○), non retenue sur la colonne hydrophobe S1 (●), retenue sur la colonne hydrophobe S2 (▲), S3 (△) et S4 (▲). Les barres d'erreur entre les trois répétitions sont représentées mais ne sont pas toujours visible ..... 121

**Figure V-2:** Activité catalytique des phosphatases du champignon ectomycorhizien *Suillus collinitus* à différents niveaux de purification en fonction du pH sur la kaolinite et la montmorillonite. L'activité catalytique en solution  $V_A$  (●), dans la suspension d'argile  $V_B$  (■) et dans le surnageant de la suspension d'argile  $V_C$  (▲). Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions mais ne sont pas toujours visible. *ns* indique que  $V_B$  et  $V_A$  ne sont pas significativement différents avec  $p > 0,05$  (ANOVA). ..... 123

**Figure V-3:** La fraction des enzymes non adsorbées (F) et l'activité relative des enzymes adsorbées (R) calculés à partir des données de la Figure 2. R est calculé lorsque  $V_C$  est très différent de  $V_B$ . Phosphatase non purifiée (NP, ●), passée à l'Amicon (AM, ○), non retenue sur la colonne hydrophobe S1 (●), retenue sur la colonne hydrophobe S2 (▲), S3 (△) et S4 (▲). Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions mais ne sont pas toujours visibles. La barre grisée indique R=100%..... 124

**Figure V-4:** Activité catalytique des phosphatases S1, S2 et du mélange de S1 et S2 sur la montmorillonite ou l'argile du vertisol au pH 4. En gris  $V_B$  et en blanc  $V_C$ . Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions. *ns* indique que l'activité en solution et l'activité en suspension ne sont pas significativement différentes avec  $p > 0,05$  (ANOVA). ..... 125

**Figure V-5:** Activité catalytique des phosphatases S2 sur la montmorillonite en fonction de la quantité de BSA ajoutée (g/L) au pH 4. En gris  $V_B$  et en blanc  $V_C$ . Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions. *ns* indique que l'activité en solution et l'activité en suspension ne sont pas significativement différentes avec  $p > 0,05$  (ANOVA) ..... 126

**Figure V-6:** Activité catalytique des phosphatases S2 en présence de la montmorillonite à pH 4 en fonction de la quantité de S2 présente (en volume de S2, 1V = 25  $\mu$ L). En gris  $V_B$  et en blanc  $V_C$ . Les barres d'erreur représentent la variabilité entre trois répétitions. .... 126

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I-1:</b> Phosphore total dans les surfaces de sols (Soon, 2008).....	6
<b>Tableau I-2:</b> Réactions de dissociation de l'acide orthophosphorique (Lindsay, 1979).....	8
<b>Tableau I-3:</b> Quelques minéraux phosphatés dans le sol (Barber, 1984) .....	9
<b>Tableau I-4 :</b> Principaux composés organiques du phosphore de l'environnement, y compris des complexes de phosphates inorganiques et des substrats synthétiques couramment utilisés dans les analyses de l'activité des phosphatases (Turner et al., 2005).....	11
<b>Tableau I-5:</b> Exemples d'enzymes de bactérie de sol hydrolysant les substrats organiques (Rodríguez and Fraga, 1999) .....	22
<b>Tableau I-6:</b> Classification de la taille des particules dans le système USDA ( <a href="http://soils.usda.gov/technical/handbook/contents/part618.html">http://soils.usda.gov/technical/handbook/contents/part618.html</a> ) et Français (Steinhardt, 2008) .....	29
<b>Tableau I-7:</b> (a) Exemples de CEC mesurées avec des argiles de sols d'Europe centrale (Schroeder, 1984). (b) valeurs représentatives de CEC mesurées avec des sols des Etats Unis à pH 7 (Sposito, 2000).....	30
<b>Tableau I-8:</b> Exemple de gamme de surfaces spécifiques de quelques argiles, composants et fraction de sol résumé par Skopp (2000) .....	31
<b>Tableau I-9:</b> Répartition des sols de forêts tropicales appartenant à l'ordre d'altération des sols et quantités de P associées (Reed et al., 2011). La correspondance des sols dans le système FAO-UNESCO (1974).....	34
<b>Tableau II-1:</b> Origin and some properties of the selected soils .....	63
<b>Tableau II-2:</b> Specific surface area (BET, m <sup>2</sup> /g) measured without or after chemical treatments .....	64
<b>Tableau II-3:</b> Probability that curves of V as a function of pH is significantly different obtained using the Kolmogorov-Smirnov test. ....	65
<b>Tableau II-4:</b> Probability that curves of V as a function of pH are significantly different obtained using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparison of F1 with other ferralsols..	68
<b>Tableau II-5 :</b> Probability that curves of V as a function of pH are significantly different obtained using the Kolmogorov-Smirnov test .....	71
<b>Tableau III-1:</b> Some properties of the soils studied.....	89

**Tableau III-2:** Initial and final activity of added phosphatases in solution and in contact with either soil, sterilised or not. Also shown, initial activity as a fraction of initial activity added and final activity relative to the initial activity for the same treatment. Also shown, native phosphatase activity in soil. .... 91

# **ANNEXES**

**Posters présentés à différentes conférences  
scientifiques internationales**

## Expression of catalytic activity of fungal phosphatases in tropical soils : Influence of soil mineralogy and organo-mineral coatings



Kedi B.<sup>1,2</sup>, Abadie J.<sup>1</sup>, Sei J.<sup>2</sup>, Quiquampoix H.<sup>1</sup>, Staunton S.<sup>1</sup>



<sup>1</sup>UMR Eco&Sol INRA, Montpellier, France  
kedi@supagro.inra.fr

<sup>2</sup>Laboratoire chimie matériaux inorganique  
Université Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire

### Introduction

Phosphatases can play an important role in phosphorus nutrition by mobilising organic phosphorus, especially in highly weathered tropical soils. Catalytic activity depends (i) on amount of enzyme present and (ii) on the expression of activity after interaction with soil organo-mineral surfaces.

The interaction of these enzymes, like other proteins, with surfaces, and the resulting effect on catalytic activity depends on the nature of the surfaces, and is strongly pH-dependant.

Our aim was to identify factors that influence the activity of phosphatases in tropical soils.

### Materials and Methods

**Soils and treatments**

5 Soils:  
1 Vertisol (French West Indies)  
4 Oxisols (Congo, Brazil, Madagascar)

4 soil treatments:  
control - sieved (< 200 µm)  
physical - clay fraction (< 2 µm)  
chemical - C<sub>org</sub> removed (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
                  - Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub> removed (dithionate-citrate-bicarbonate)

**Phosphatase**

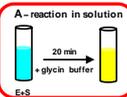


Phosphatase extracellular enzyme from fungus *Hebeloma cylindrosporum*

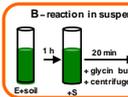
**Measurement of phosphatases adsorption and activity**

Three procedures to measure phosphatases activity as a function of pH

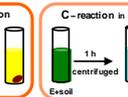
A - reaction in solution



B - reaction in suspension



C - reaction in supernatant solution of suspension



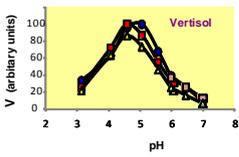
E: enzyme  
S: substrat

Product, pNP, analysed by spectrophotometry  
V = velocity of catalytic reaction

Legend: ● ○ V<sub>A</sub>    ■ □ V<sub>B</sub>    ▲ △ V<sub>C</sub>

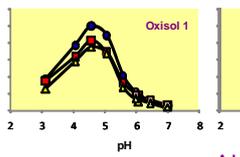
### Results and Discussion

**Comparison of adsorption and activity on clay fractions of the 5 soils**



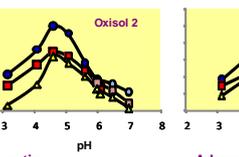
Vertisol

Little adsorption  
Activity when adsorbed



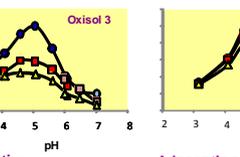
Oxisol 1

Some adsorption  
Little activity when adsorbed



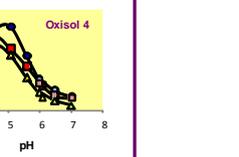
Oxisol 2

Adsorption  
Activity when adsorbed  
pH dependence



Oxisol 3

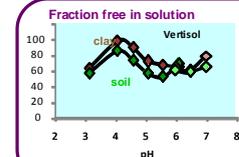
Adsorption  
Activity when adsorbed  
Similar over pH range



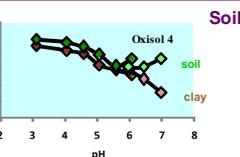
Oxisol 4

Adsorption  
Activity when adsorbed  
pH dependence of adsorption

**Fraction free in solution**



Vertisol



Oxisol 4

**Soil particle size effect on adsorption**

- Phosphatase is not completely adsorbed 50 - 100 % of enzyme is free
- Adsorption varies with pH
- Adsorption is similar on whole soil and clay sized fraction

**How to read these plots !**

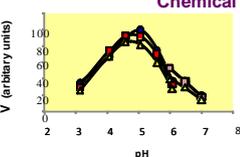
V<sub>C</sub> = V<sub>A</sub>    no adsorption  
V<sub>C</sub> < V<sub>A</sub>    some adsorption

V<sub>B</sub> = V<sub>C</sub>    little activity when adsorbed  
V<sub>B</sub> > V<sub>C</sub>    activity when adsorbed  
V<sub>B</sub> = V<sub>A</sub> > V<sub>C</sub>    full activity when adsorbed

**To resume**

- This phosphatase is not strongly adsorbed
- Activity is modified by adsorption
- Adsorption varies little between soils
- Adsorption is dominated by clay fraction
- Surface coatings have some effect on adsorption and residual activity

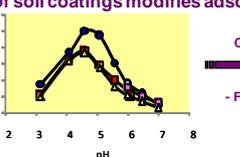
**Chemical removal of soil coatings modifies adsorption and residual activity**



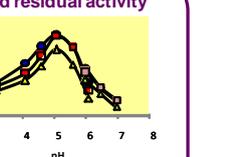
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- Corg

Adsorption decreased



No activity when adsorbed



CBD

- Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>

Activity when adsorbed increased

**But .... Contrasted results have been obtained for other phosphatases !**

## Interaction of enzymes with soil colloids: adsorption and ectomycorrhizal phosphatases activity on tropical soils

Kedi B.<sup>1,2</sup>, Abadie J.<sup>1</sup>, Sei J.<sup>2</sup>, Quiquampoix H.<sup>1</sup>, Staunton S.<sup>1</sup>



<sup>1</sup>UMR Eco & Sol. 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France ([staunton@montpellier.inra.fr](mailto:staunton@montpellier.inra.fr))

<sup>2</sup>Laboratoire chimie matériaux inorganique. Université Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire



### Introduction

Ectomycorrhizal fungi contribute to phosphorus nutrition by synthesising and secreting phosphatases that solubilise soil organic phosphorus, not directly assimilated by plants (Quiquampoix and Moussain 2005). The action of these enzymes may be important for highly weathered, phosphorus-depleted tropical soils. In contact with soil, phosphatases are adsorbed and their catalytic activity modified to varying degrees (Leprince and Quiquampoix 1996). Catalytic activity depends strongly on pH and the nature of organo-mineral surfaces. Several studies have investigated the adsorption and activity of enzymes on pure clay minerals (Quiquampoix and Leprince 1996), clay-organic matter complexes (Gianfreda 1991; Kelleher 2004), and oxides (Shindo 2002) but few studies have compared natural soils. We investigated the interaction of ectomycorrhizal fungal phosphatases with contrasting tropical soils to elucidate the role of organo-mineral coatings in soil.

### Materials and Methods

**Soils and treatments**

**5 Soils:**  
1 Vertisol (French West Indies)  
4 Ferralsols (Congo, Brazil, Madagascar)

**5 soil treatments:**  
control — sieved (< 200 µm)  
clay fraction (< 2 µm)  
physical < sandy fraction (50-200µm)  
chemical < C<sub>org</sub> removed (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub> removed (dithionate-citrate-bicarbonate)

**Phosphatase**

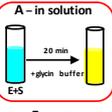


fungal extracellular enzymes from *Suillus collinitus* (S) and two *Hebeloma cylindrosporum*

**Measurement of phosphatase adsorption and activity**

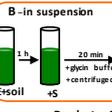
Three procedures to measure phosphatases activity as a function of pH

**A - in solution**



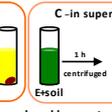
E: enzyme  
S: substrate

**B - in suspension**



E: enzyme  
S: substrate

**C - in supernatant solution of suspension**

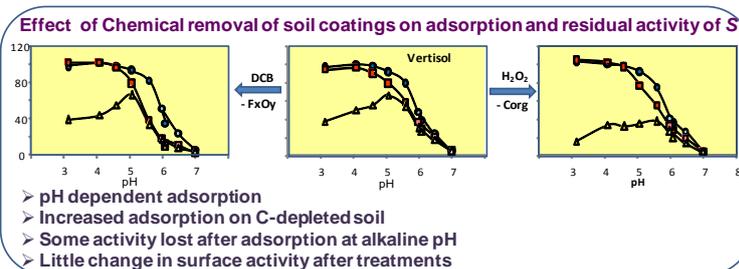
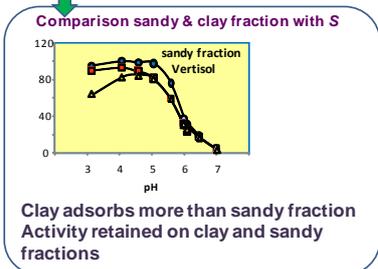
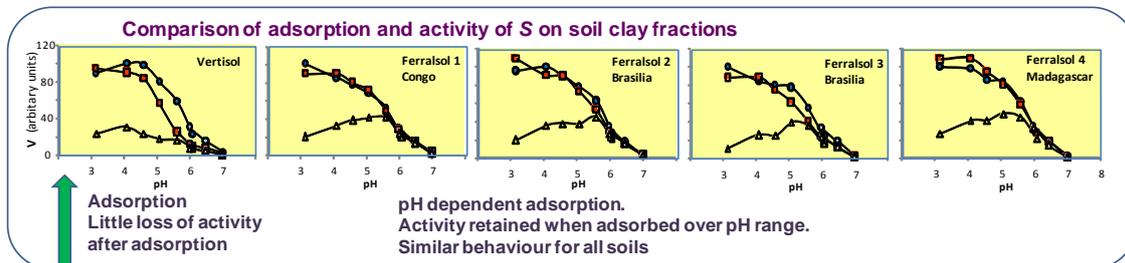


E: enzyme  
S: substrate

Product, pNP, analysed by spectrophotometry  
V = velocity of catalytic reaction

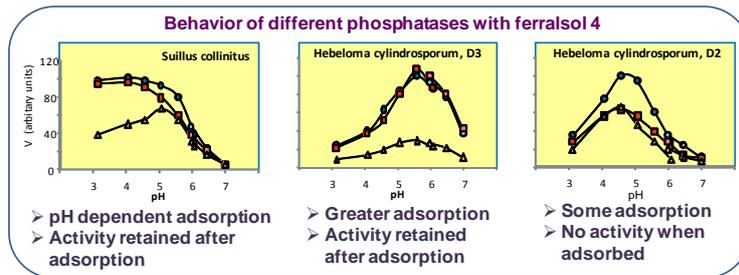
● ○ V<sub>A</sub>    ■ □ V<sub>B</sub>    ▲ △ V<sub>C</sub>  
 V<sub>C</sub> < V<sub>A</sub> → Some adsorption  
 V<sub>B</sub> ≈ V<sub>A</sub> → Activity preserved after adsorption

### Results and Discussion



### Conclusions

- Behaviour of each phosphatase varies little between soils
- Little lost of activity after adsorption
- Clay adsorbs more than sandy fraction
- Little effect of chemical treatments on adsorption and activity
- Contrasting behaviours of different phosphatases on each soil



## Adsorption and catalytic activity of ectomycorrhizal fungal phosphatases in contact with two tropical soils



Kedi B.<sup>1,2</sup>, Abadie J.<sup>1</sup>, Sei J.<sup>2</sup>, Quiquampoix H.<sup>1</sup>, Staunton S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR Eco & Sols. 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France

<sup>2</sup>Laboratoire chimie matériaux inorganique. Université Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire



### Introduction

Phosphatases secreted in soil by microorganisms, such as ectomycorrhizal fungi, play a role in hydrolysis of organic phosphorus (Po) and release of orthophosphate (Pi) which is the form available to plants (Quiquampoix and Moussain 2005). The role of phosphatases may be important for highly weathered tropical soils owing to deficiencies in Pi (Hinsinger 2001). However, once in soil, phosphatases may be adsorbed on soil organo-mineral surfaces. Adsorption limits mobility and hence the zone of action, of the enzyme, may afford physical protection against microbial breakdown (George 2007) and may modify the expression of catalytic activity because of conformational changes or preferential orientation of the active site at the solid-solution interface (Quiquampoix et al. 2002). The aim of this study was to determine the role of organic and mineral components of tropical soils on the adsorption and modification of activity of fungal phosphatases

### Materials and Methods

#### Soils and treatments

##### Soils (2):

Vertisol (French West Indies)

Ferralsol (Madagascar)

##### Soil treatments (5):

control — sieved (< 200 μm)

physical < clay fraction (< 2 μm)

sandy fraction (50-200 μm)

chemical < C<sub>org</sub> removed (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub> removed (dithionate-citrate-bicarbonate)

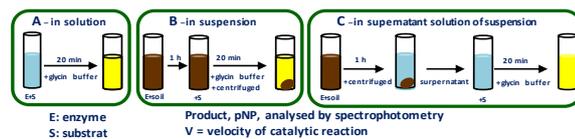
#### Phosphatase



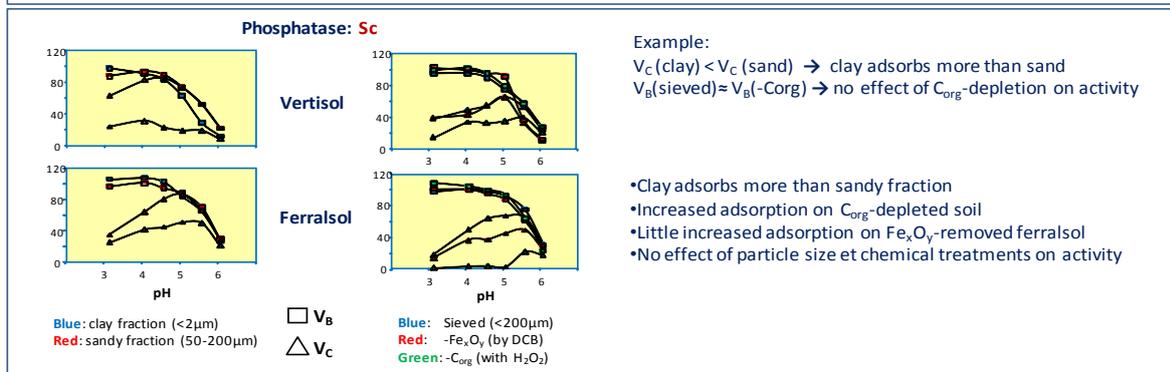
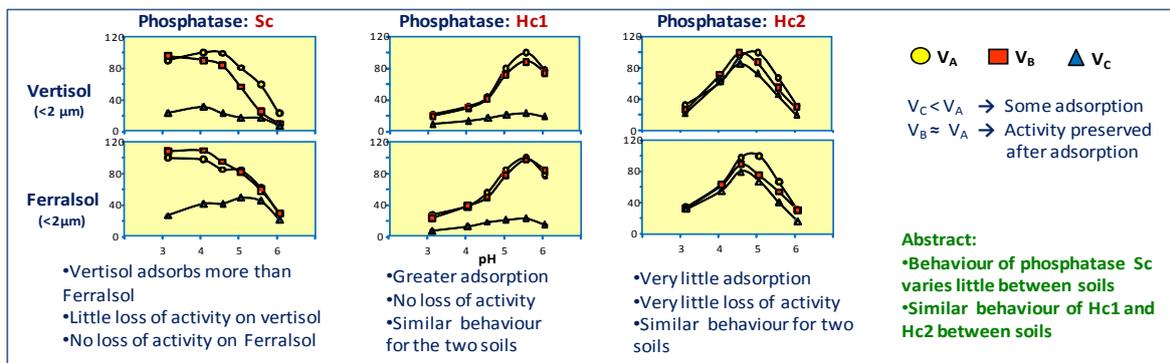
fungal extracellular enzymes from *Suillus collinitus* (Sc) and two *Hebeloma cylindrosporum* (Hc1 and Hc2)

#### Measurement of phosphatase adsorption and activity

Three procedures to measure phosphatases activity as a function of pH



### Results



### Conclusion

The interaction of phosphatases with soil colloids was determined more by the origin of phosphatases than the nature of soil colloids with which they interacted. These results have strong implications for the understanding of fungal phosphatases in phosphorus cycle, and to guide future research

## Effect of Soil on the Evolution of Catalytic Activity of Ectomycorrhizal Phosphatases

Kedi B.<sup>1,2</sup>, Abadie J.<sup>1</sup>, Sei J.<sup>2</sup>, Quiquampoix H.<sup>1</sup>, Staunton S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR Eco & Sols, INRA 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France

<sup>2</sup>LCMI, UFR SSMT, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire (bricekedi@yahoo.fr)



### Introduction

Extracellular acid phosphatases, secreted by ectomycorrhizal fungi in soil, may contribute to phosphorus nutrition of host plants by hydrolysis of organic phosphorus. They may thus play an important role, especially in tropical soils often highly weathered with low levels of available inorganic phosphorus. However, in contact with soil, phosphatases may be adsorbed and subject to denaturation, inactivation and degradation. Sometimes, adsorption may contribute to conformational stability of enzymes, or may contribute to their protection against microbial degradation thereby increasing their effective lifespan.

The aim of this work was to determine the ability of phosphatases to maintain their catalytic activity with time after adsorption on contrasting soils and to understand the role of soils on their persistence

### Materials and Methods

**Soils and treatments**

**Soils (3):**

- Vertisol (French West Indies)
- Ferralsols (Brazil) with contrasting organic matter contents (F+) and F(-)

**Soil treatments :**

- Sieved (<200µm)
- For Ferralsols +/-sterilisation by three successive autoclaving

**Phosphatase**

fungal extracellular phosphatases from *Suillus collinitus* (Sc) and *Hebeloma cylindrosporium* (Hc)

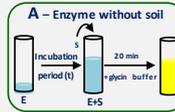


Phosphatases secreted in liquid culture medium

Solution of culture was concentrated by centricon®

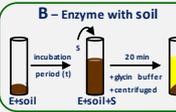
**Measurement of phosphatase activity after each period of incubation**

**A – Enzyme without soil**



E: enzyme  
S: substrat

**B – Enzyme with soil**



P: Product, pNP, analysed by spectrophotometry  
V: velocity of catalytic reaction

**N – Soil without added Enzyme**



Time of incubation : t = 0, 3, 10, 17 and 33 days  
Temperature of incubation and activity: 25°C

### Results

