



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance au stress métallique chez les champignons ectomycorhiziens par agrotransformation d'*Hebeloma cylindrosporum*

Marc Bellion

► **To cite this version:**

Marc Bellion. Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance au stress métallique chez les champignons ectomycorhiziens par agrotransformation d'*Hebeloma cylindrosporum*. Sciences de la Terre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN10103 . tel-01747397

HAL Id: tel-01747397

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747397>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
E.D. Ressources, Procédés, Produits et Environnement
D.F.D. Biologie Forestière

Thèse

présentée pour l'obtention du titre

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie Végétale et Forestière

par **Marc BELLION**

Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance au stress métallique chez les champignons ectomycorhiziens par agrotransformation d'*Hebeloma cylindrosporum*

Soutenue publiquement le 17 octobre 2006

Membres du jury :

Président :	M. Francis Martin	Directeur de Recherches, INRA Nancy
Examineurs :	M. Michel Chalot	Professeur, UHP Nancy I
	M. Eric Gelhaye	Maître de Conférences, habilité, UHP Nancy I
Rapporteurs :	M. Gilles Gay	Professeur Université Claude Bernard, Lyon I
	M. Daniel Wipf	Chargé de recherches, habilité, Université de Bonn, Allemagne

Celui qui s'efforce, avec persévérance et humilité, de pénétrer les secrets des choses, celui-là, même s'il n'en a pas conscience, est comme conduit par la main de Dieu, qui soutient tous les êtres et les fait ce qu'ils sont.

Gaudium et Spes 36.2

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, M. Gilles Gay, M. Daniel Wipf, M. Francis Martin et M. Eric Gelhaye d'avoir accepté de juger mon travail.

Je souhaite aussi remercier chaleureusement les chefs de l'équipe Michel, Annick (∞ : toutes mes félicitations) et Damien, pour leurs accueil, encadrement et gentillesse.

Bien sûr je remercie aussi les autres (ex-)habitants du 4^e :

★ Barbara, fraîchement *campionessa del mondo*, merci pour tout

⊕ Jérémy, prochaine chance dans 4 ans et que vive le ~~PSG~~... l'OM bien sûr

🚲 Mélanie, qui m'a initié aux us et coutumes du 4^e

🍃 Aude ma pseudocompatriote (au moins tu connais le *Cactus* [chaîne de supermarchés au Luxembourg])

☐ Eva

☼ Frédéric *Narcisse* Guinet

★ Lionel, passage court mais efficace

👁️ Chantal

⚡ M. Bernard Botton, bricoleur sans crainte et sans limites

ainsi que les sportifs du 3^e : Jean-Pierre et les 2 Nico

et *jhasta siempre!* les camarades Valérie et Sylvain du 6^e.

Un merci spécial va a Minna Kemppainen et Alejandro G. Pardo pour m'avoir si bien accueilli en Argentine et initié à l'agrotransformation.

Je ne voudrais pas non plus oublier ma famille et mes amis hors-labo de m'avoir soutenu au cours des dernières années.

Abréviations

A _{600nm}	absorbance à 600 nm
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
At-MI	Milieu de culture d'induction d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
At-MM	Milieu minimum de culture d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BET	bromure d'éthidium
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
dNTP	désoxynucléoside 5' triphosphate
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
EST	marqueur de sequence exprimé (<i>expressed sequence tag</i>)
<i>g</i>	accélération de la pesanteur
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
kpb	kilopaire de bases
LB	milieu de culture pour <i>Escherichia coli</i>
N2P2	milieu de culture pour <i>Hebeloma cylindrosporum</i>
nb	nombre
ORF	cadre de lecture ouvert (<i>open reading frame</i>)
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylèneglycol
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	sodium dodécyl sulfate
SOC	milieu de culture pour <i>Escherichia coli</i>
T _m	température d'hybridation
Tris	tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	ultraviolet

Table des matières

Objectifs généraux	7
I Étude bibliographique	8
1 Les mycorhizes, une symbiose entre plantes et champignons	9
1.1 Généralités	9
1.2 Différents types de mycorhizes	9
1.2.1 Ectomycorhizes	9
1.2.2 Mycorhizes à vésicules et arbuscules	10
1.2.3 Ectendomycorhizes	10
1.2.4 Mycorhizes arbutoïdes et monotropoïdes	11
1.2.5 Mycorhizes éricoïdes	11
1.2.6 Mycorhizes des orchidées	11
1.3 Rôle des ectomycorhizes dans l'écosystème	11
1.3.1 Échanges trophiques	11
Bénéfices trophiques pour la plante	11
Bénéfices trophiques pour le champignon	12
1.3.2 Protection de la plante par le champignon	14
Protection contre les pathogènes	14
Protection contre les xénobiotiques	14
2 Les métaux lourds perturbent l'écosystème	16
2.1 Généralités	16
2.2 Toxicité des métaux lourds	17
2.3 Effets des métaux sur les champignons	19
2.4 Article de revue : Les mécanismes moléculaires de résistance à la pollution par les métaux lourds chez les champignons.	20
3 La mutagenèse des champignons	30
3.1 Objectifs possibles de la transgénèse	30
3.1.1 Surexpression	31
Surexpression stable	32
3.1.2 Inactivation	32
Inactivation aléatoire	32
Inactivation ciblée par recombinaison homologue	32
Inactivation ciblée par <i>silencing</i>	33
ARN antisens	33

	ARN interférence	34
3.2	Méthodes de mutagenèse	34
3.2.1	Irradiation aux rayons ultraviolets	34
3.2.2	Utilisation de mutagènes chimiques	35
3.2.3	Techniques de protoplastes	35
	Traitement au polyéthylène glycol	35
	Liposomes	35
	Electroporation	36
3.2.4	Bombardement avec particules	36
3.2.5	Intégration par une enzyme de restriction (REMI)	36
3.3	Agrotransformation	37
3.3.1	Introduction	37
	Avantages	38
3.3.2	Mise en œuvre	38
	Les plasmides binaires	39
3.3.3	Génétique de la virulence	40
 II Matériel et méthodes		42
 4 Matériel biologique		43
4.1	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	43
4.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
4.3	<i>Escherichia coli</i>	44
 5 Méthodes		46
5.1	Compatibilité entre différentes souches d' <i>A. tumefaciens</i> et différents vecteurs binaires.	46
5.2	Les systèmes de vecteurs binaires utilisés.	46
5.2.1	pBGgHg	46
5.2.2	pBIN+	47
5.2.3	pFAT3	47
5.3	Agrotransformation d' <i>H. cylindrosporum</i>	48
5.3.1	Préparation d' <i>A. tumefaciens</i> électro-compétent	48
5.3.2	Électroporation d' <i>A. tumefaciens</i>	49
5.3.3	Préparation d' <i>A. tumefaciens</i> pour la coculture	49
5.3.4	Préparation d' <i>H. cylindrosporum</i> pour la coculture	49
5.3.5	Coculture d' <i>H. cylindrosporum</i> et d' <i>A. tumefaciens</i>	50
5.3.6	Sélection des transformants	50
5.4	Clonage	50
5.4.1	Ligation	50
5.4.2	Transformation d' <i>Escherichia coli</i> par choc thermique	51
5.5	Extraction des acides nucléiques	51
5.5.1	Prélèvement et broyage du matériel fongique	51
5.5.2	Extraction de l'ADN génomique au CTAB	52
5.5.3	Extraction des ARN totaux d' <i>H. cylindrosporum</i>	52
5.5.4	Extraction de l'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	52
5.6	Test de croissance des clones transformés d' <i>H. cylindrosporum</i>	53

5.7	Technique d'amplifications génique ou PCR	53
5.7.1	Généralités	53
5.7.2	Les amorces nucléotidiques	53
5.7.3	Composition de l'essai	54
5.7.4	Conditions d'amplification	55
5.7.5	Analyse des transcrits par RT-PCR	55
5.8	Mesures de la croissance d' <i>H. cylindrosporium</i>	55
III Résultats et discussion		57
6	Résultats	58
6.1	Préliminaire : Croissance d' <i>Hebeloma cylindrosporium</i> sur différents métaux	58
6.2	Utilisation du plasmide pBGgHg	59
6.3	Utilisation du plasmide pBIN+	61
6.4	Utilisation du plasmide pFAT3	61
6.5	Analyse des différents transformants	62
6.5.1	Transporteur de zinc <i>HcZnT1</i>	62
6.5.2	Thiorédoxine <i>PiTrx</i>	64
	Recherche d'un phénotype	64
6.5.3	Métallothionéine <i>PiMt1</i>	65
	Recherche d'un phénotype	66
6.6	Article	67
IV Conclusions générales et perspectives		76
7.1	Choix de l'espèce et de la souche fongique	77
7.2	Choix du système de vecteurs	78
7.3	Choix du promoteur	78
7.4	Choix de la méthode de transformation	79
7.5	Choix des transgènes	79
7.6	Conclusions	80
Références bibliographiques		82

Objectifs généraux

Ce travail de thèse de doctorat réalisé au sein de l'UMR UHP-INRA 1136 Interactions Arbres Micro-organismes vise à mettre au point un système qui permette la transformation génétique de champignons filamenteux ectomycorrhiziens qui sont l'un des sujets d'études principaux de notre unité de recherche, en vue d'une caractérisation fonctionnelle de gènes fongiques.

La possibilité de transformation de ces champignons est un pilier essentiel dans l'étude de leurs génétique et physiologie. Jusqu'à présent la transformation souffre d'un léger sous-développement par rapport aux autres technologies employée en biologie, pour l'étude des interactions mycorrhiziennes. Ainsi, les méthodes microscopiques, moléculaires et transcriptomiques sont bien établies. La transformation génétique devra permettre d'obtenir des individus surexprimant un gène choisi, soit des mutants pour un gène inactivé. Mais comme la transformation n'est pas un but en soi, il faut aussi que les clones obtenus puissent être analysés, les gènes qui ont été inactivés ou surexprimés devront être caractérisés. Ceci se fera grâce à des tests de croissance qui impliqueront des études sur des milieux qui induisent un stress (métallique ou oxydatif) chez le champignon et permettront ainsi de sélectionner des transformants résistants, *i. e.* présentant un phénotype d'intérêt.

Ainsi, il sera possible d'étudier des gènes dans un système d'expression hétérologue qui est phylogénétiquement moins éloigné que *Saccharomyces cerevisiae*, qui est le système d'expression hétérologue le plus fréquent et le plus simple à mettre en œuvre pour le gènes fongiques.

Première partie

Étude bibliographique



Chapitre 1

Les mycorhizes, une symbiose entre plantes et champignons

1.1 Généralités

LES MYCORHIZES (du grec $\muύκης$: champignon et $\rhoίζα$: racine) sont des structures mixtes formées par un champignon et un végétal supérieur. Cette association est qualifiée de symbiotique puisqu'elle est basée sur des échanges réciproques entre les deux partenaires. Il en existe plusieurs types distincts selon leur structure et les espèces végétales et fongiques concernées.

1.2 Différents types de mycorhizes

1.2.1 Ectomycorhizes

Les ectomycorhizes (Fig. 1.1) : les premières traces de ces structures datent d'approximativement 50 millions d'années (LePage *et al.*, 1997). Elles sont formées par l'association d'un champignon de l'ordre des Basidiomycètes, Ascomycètes ou Zygomycètes, et d'un partenaire végétal appartenant aux Angiospermes ou aux Gymnospermes. L'organe symbiotique est constitué de 3 parties : un réseau d'hyphes (réseau de Hartig) qui s'insinuent entre les cellules corticales de la racine sans les pénétrer, un manteau qui forme un manchon autour de la racine et un réseau d'hyphes extramatriciels qui assurent le lien entre le sol et le manteau de l'ectomycorhize et par conséquent, la racine.

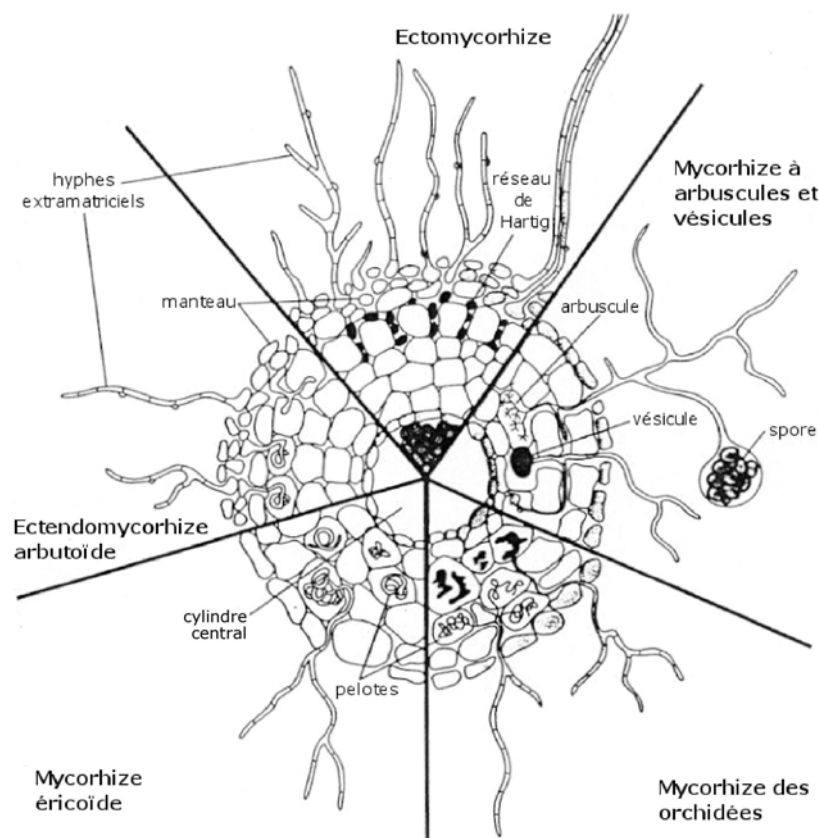


FIG. 1.1 – Différents types de mycorhizes (Selosse et Le Tacon, 1998).

1.2.2 Mycorhizes à vésicules et arbuscules

Les mycorhizes à vésicules et arbuscules (Fig. 1.1) : ces associations sont formées par des champignons de l'ordre des Glomales et une grande variété de partenaires végétaux incluant les Bryophytes, presque tous les groupes de Ptéridophytes, les Gymnospermes et certains Angiospermes. Il s'agit de la plus ancienne des symbioses mycorhiziennes, elle semble être apparue entre 353 et 462 millions d'années (Simon *et al.*, 1993). À la différence des ectomycorhizes, le champignon pénètre à l'intérieur des cellules racinaires et forme des structures intracellulaires, les arbuscules et vésicules.

1.2.3 Ectendomycorhizes

Les ectendomycorhizes sont une symbiose qui concerne essentiellement les conifères et les champignons de l'ordre des Pézizales. Elle ne représente pas un groupe fonctionnel mais plutôt une distinction particulière des ectomycorhizes. En effet, elle présente de nombreuses caractéristiques des ectomycorhizes à la différence que le champignon est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules corticales de la plante hôte.

1.2.4 Mycorhizes arbutoïdes et monotropoïdes

Les champignons associés aux mycorhizes arbutoïdes sont des basidiomycètes. Les plantes qui leur sont associées appartiennent aux Arbutoïdées et Pyrolacées. Les plantes de la famille des Monotropacées sont non-chlorophylliennes et dépendent donc totalement du champignon pour répondre à leurs besoins en carbone, dans le cas des mycorhizes monotropoïdes (Smith et Read, 1997).

1.2.5 Mycorhizes éricoïdes

Les champignons formant des mycorhizes éricoïdes sont des ascomycètes principalement du genre *Hymenoscyphus* et *Oidiodendron*. Dans cette symbiose, la mycorhization a lieu directement au niveau des cellules corticales des Ericacées puisqu'elles ne possèdent pas d'épiderme. Ces mycorhizes se présentent sous la forme de pelotons à l'intérieur des cellules racinaires.

1.2.6 Mycorhizes des orchidées

Toutes les orchidées forment des associations avec des champignons dans les premiers stades de leur développement. La plupart des champignons impliqués appartiennent au genre *Rhizoctonia*.

1.3 Rôle des ectomycorhizes dans l'écosystème

1.3.1 Échanges trophiques

Une ectomycorhize constitue une interface d'échange de nutriments entre plante et champignon. Le schéma de la figure 1.2 résume ces échanges qui ont lieu dans les deux sens et profitent ainsi au développement des deux partenaires.

Bénéfices trophiques pour la plante

Le mycélium extramatriciel peut traverser un volume important de sol, permettant ainsi à la plante, d'augmenter son volume de prospection pour le phosphore et l'azote (Fig. 1.3), deux éléments limitant la croissance des arbres dans les sols forestiers (Rousseau *et al.*, 1994). Par des techniques de marquage au ^{32}P et au ^{15}N en microcosme, il a été établi que les hyphes extramatriciels étaient capable de prélever du phosphore et de l'azote inorganique et de les transférer jusqu'aux racines (Martin *et al.*, 1986 ; Ek *et al.*,

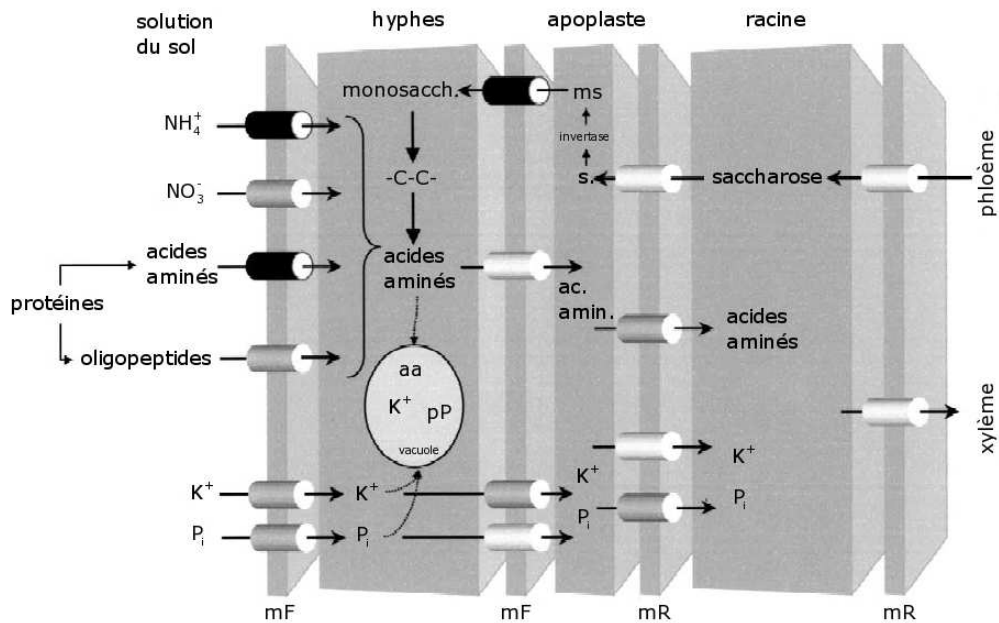


FIG. 1.2 – Résumé des transports dans les tissus ectomycorhiziens. mF : membrane plasmique fongique, mR : membrane plasmique racinaire, pP : polyphosphate. Cylindres noirs : un transporteur de la famille a été caractérisé, cylindres gris : transporteur putatif (séquence disponible dans des banques d'EST), cylindres blancs : transporteur hypothétique (Chalot *et al.*, 2002).

1994, Andersson *et al.*, 1996) contribuant pour 76% à l'absorption totale du phosphore (Brandes *et al.*, 1998) et 12% de l'absorption totale de l'azote du système mycorhizien *Paxillus involutus* / *Picea abies* (Jentschke *et al.*, 2001). D'autres expériences de marquage ont consisté à fournir de l'ammonium marqué au mycélium extramatriciel du système ectomycorhizien *Paxillus involutus* / *Betula pendula* cultivé en microcosme. Des dosages d'ammonium marqué, ont été effectués dans les racines et les feuilles de la plante après traitement du système intact et du système pour lequel le mycélium a été déconnecté des racines. Les résultats montrent que la plante a pu incorporer de plus grandes quantités d'azote à la fois dans les racines et les tiges grâce au champignon lorsque le système est intact (Javelle *et al.*, 1999).

Bénéfices trophiques pour le champignon

Les bénéfices pour le champignon sont essentiellement d'ordre trophique. Dès 1894, Frank suggère que la principale source de nutriments organiques pour les champignons ectomycorhiziens provient des photosynthétats de la plante, même s'il reconnaît que ces nutriments pourraient être prélevés directement dans le sol. Cette hypothèse a été vérifiée

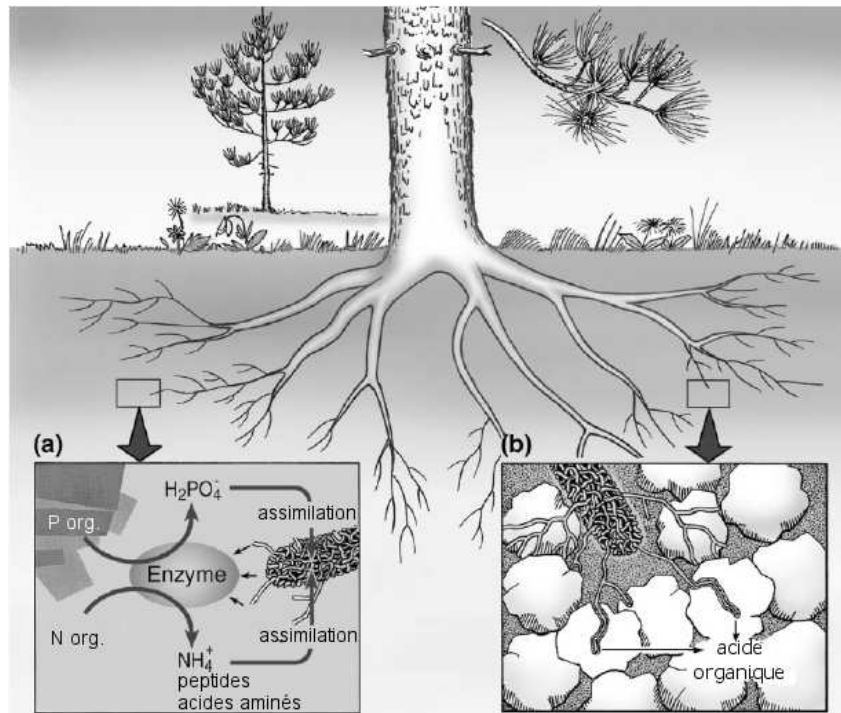


FIG. 1.3 – Mobilisation des éléments nutritifs par les champignons ectomycorhiziens : (a) par production d'enzymes, les champignons peuvent utiliser les formes organiques de N et P, (b) par l'excrétion d'acides organiques ils peuvent mobiliser des éléments nutritifs de sources minérales (d'après Landeweert *et al.*, 2001).

plus tard par Melin (1925) qui a montré que le champignon était dépendant des sucres simples que pouvait lui fournir la plante via la photosynthèse, et que les composés présents dans le sol essentiellement sous forme de cellulose et de lignine, étaient difficilement assimilables par le champignon. Environ 16% de la fixation nette de carbone par la plante sont alloués aux ectomycorhizes (Leake *et al.*, 2001). En fournissant du ¹⁴CO₂ à des plants de pins ou de bouleaux mycorhizés par *P. involutus*, Söderström *et al.* (1988) ont identifié le tréhalose, le mannitol et l'arabitol comme étant les composés carbonés marqués présents dans le champignon en fin d'expérience. Ces composés sont transloqués à raison de 20 cm par heure depuis le site de contact racinaire jusqu'à la marge du mycélium (Finlay et Read, 1986). En effet, ces hyphes en progression représentent un véritable puit de carbone comme cela a été montré par Bending et Read (1995).

À côté de l'acquisition de squelettes carbonés à partir de photosynthétats, une étude plus récente a démontré que des lipides de la plante peuvent constituer aussi une source de squelettes carbonés. Laczko *et al.* (2004) ont montré que *Pinus sylvestris* produisait une grande quantité de lipides neutres contenant des acides gras saturés en réponse à la

présence du champignon. Les auteurs ont proposé l'hypothèse que le mycélium pourrait prélever ces acides gras dès son contact avec la plante c'est-à-dire avant même la formation du réseau de Hartig, et les transférer sous forme de lipides neutres jusqu'aux hyphes extramatriciels. En effet, le dosage de ces lipides montrent que le mycélium extramatriciel de *P. tinctorius* en association avec *P. sylvestris* s'enrichit en lipides neutres en fonction du temps, alors que le mycélium en culture pure ou le mycélium extramatriciel au début de l'expérience présentaient de très faibles concentrations en lipides neutres.

1.3.2 Protection de la plante par le champignon

À côté des bénéfices trophiques mutuels qui ont lieu entre le partenaire fongique et la plante, l'ectomycorhize offre aussi le bénéfice d'une protection à la plante contre divers agents nuisibles.

Protection contre les pathogènes

Les champignons ectomycorhiziens jouent également un rôle important dans la protection des arbres contre les agressions environnementales. Il est clairement établi que l'association ectomycorhizienne permet une meilleure résistance de la plante face aux pathogènes, cependant les mécanismes par lesquels le champignon protège la plante sont encore mal connus. La présence de *Pisolithus tinctorius*, *Thelephora terrestris* et *Laccaria laccata* a permis de réduire l'impact de champignons pathogènes sur des plantules de pin. Cet effet a été attribué à la barrière physique que représente le manteau fongique (Marx, 1973) ou à la production de composés phénoliques dans les tissus végétaux en réponse à la présence du symbiote (Sylvia et Sinclair, 1983). Une autre étude menée sur *P. tinctorius* a mis en évidence la production par le champignon de deux antibiotiques, qui ont été appelés pisolithin A et B.

Protection contre les xénobiotiques

Des substances xénobiotiques potentiellement présentes dans les sols peuvent perturber les échanges décrits précédemment. Ainsi des composés organiques, surtout des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ou des ions métalliques sont susceptibles de modifier l'assimilation de composés azotés ou carbonés par le champignon (Blau-dez *et al.*, 2000). Les cellules fongiques qui entourent les racines des plantes constituent une barrière physique contre les xénobiotiques et protègent ainsi le partenaire végétal du contact direct avec ces substances toxiques. À côté de cette protection physique, les

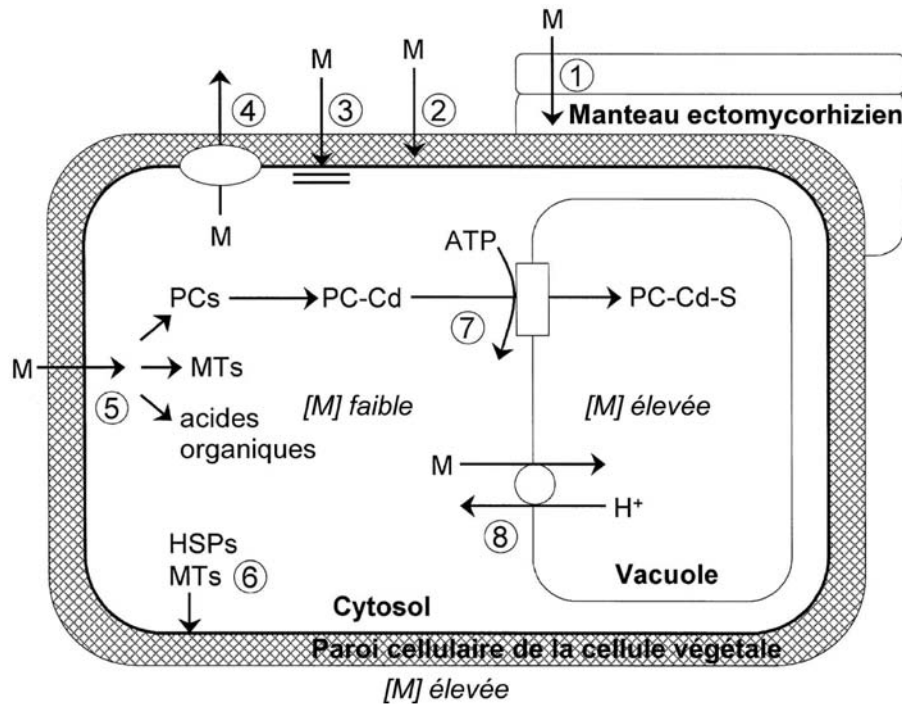


FIG. 1.4 – Mécanismes de tolérance aux métaux lourds dans une ectomycorhize : 1. protection du partenaire végétal par le manteau fongique, 2. complexation par des exudats racinaires et la paroi cellulaire, 3. influx réduit à travers la membrane plasmique, 4. efflux actif dans l'apoplaste, 5. chélation dans le cytosol par différents ligands : phytochélatines (PCs), métallothionéines (MTs), acides organiques, 6. réparation et protection de la membrane plasmique en conditions de stress, 7. transport de complexes PC-Cd dans la vacuole, 8. transport et accumulation de métaux dans la vacuole (Hall, 2002).

champignons possèdent des mécanismes moléculaires de protection. Quant aux HAP, quelques espèces fongiques sont capables de les dégrader par voie enzymatique (p. ex. Braun-Lüllemann *et al.*, 1999 ; Dittmann *et al.*, 2002 ; Genny *et al.*, 2004) La figure 1.4 montre les mécanismes de tolérance dans une ectomycorhize en mettant l'accent sur la cellule végétale, les mécanismes des cellules fongiques font l'objet de la publication présentée au cours du le chapitre 2.

Chapitre 2

Les métaux lourds perturbent l'écosystème

2.1 Généralités

COMME les champignons offrent une protection efficace du partenaire végétal contre la présence de pollutions aux métaux lourds dans les sols, il est intéressant de voir les différentes possibilités qu'ont les champignons pour survivre dans des environnements contenant de fortes concentrations en métaux lourds.

Définition et propriétés des métaux

Les atomes métalliques présentent les propriétés suivantes

- le nombre d'électrons de la couche extérieure est faible et plus petit que le nombre de coordination
- l'énergie d'ionisation est faible (< 10 eV)

Il en résulte que les atomes métalliques ne peuvent pas former, comme beaucoup de non-métaux, de molécules grâce à des liaisons. Ils forment plutôt des liaisons métalliques, c.-à-d. des associations d'atomes dans lesquels les électrons de valence sont mis en commun. Ces électrons mis en commun (« électrons libres ») permettent la conduction métallique, une propriété commune aux métaux. Quatre-vingt huit éléments parmi les 112 du tableau périodique de Mendeleïev répondent à ces critères généraux auxquels il faut ajouter neuf semi-métaux ou métalloïdes, qui ont les propriétés physiques des métaux mais pas les propriétés chimiques. Pour s'associer à des non-métaux, les métaux forment en règle générale des cations, les électrons périphériques sont donnés aux atomes non métalliques. Ainsi se forme une association d'ion (sel) dans lequel les forces électro-

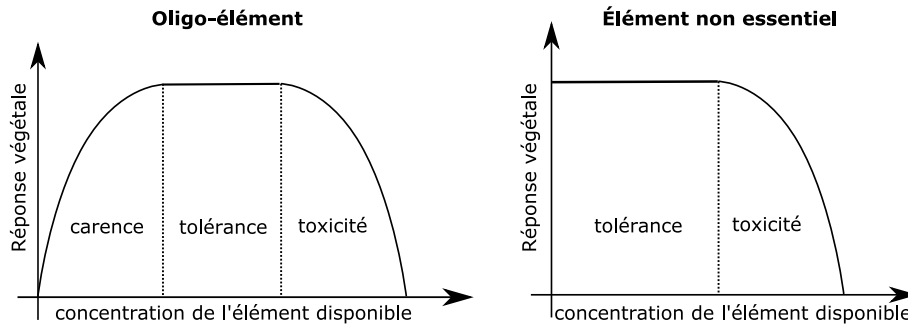


FIG. 2.1 – Courbes schématisées dose/réponse de plantes aux éléments minéraux.

statiques maintiennent les ions associés.

Traditionnellement les métaux sont classifiés

- selon leur réactivité en métaux nobles (potentiel redox positif par rapport à l'électrode hydrogène standard) et non nobles (potentiel redox négatif par rapport à l'électrode hydrogène standard)
- selon leur densité en métaux lourds (densité supérieure à 5 g/cm^3) et métaux légers (densité inférieure à 5 g/cm^3).

Ces classifications ne prennent pas en compte la toxicité d'un métal pour les organismes vivants, qui est indépendante de la densité et de la réactivité.

2.2 Toxicité des métaux lourds

Les effets toxiques des métaux sont dus à leur grande capacité à se fixer sur les atomes d'oxygène, d'azote et de soufre (Nieboer et Richardson, 1980) et surtout sur les résidus cystéine inhibant ainsi l'activité de nombreuses enzymes (van Assche et Clijsters, 1990 ; Meharg, 1994) par le blocage de groupes fonctionnels de molécules biologiques importantes ; le déplacement et/ou le remplacement d'ions essentiels dans les biomolécules ; le changement conformationnel, la dénaturation et l'inactivation d'enzymes et la rupture de tous types de membranes cellulaires (Ochiai, 1987). Les métaux sont aussi connus pour produire des espèces réactives de l'oxygène (Polle, 1997).

Les courbes dose/réponse des plantes aux métaux lourds sont de deux types (Fig. 2.1). Pour les oligo-éléments, elles se présentent sous en forme de cloche, qui identifie trois domaines de concentration dans les tissus : déficience, tolérance et toxicité. Pour les métaux pour lesquels aucune fonction physiologique n'a été démontrée, seules la tolérance et la toxicité sont observées. La présence dans les tissus de métaux non essentiels est donc tolérée tant que le seuil de toxicité n'est pas atteint. Une fois ce seuil atteint, les fonctions

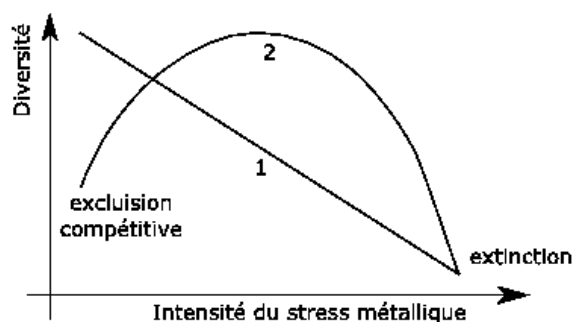


FIG. 2.2 – Deux modèles hypothétiques des effets d'un stress métallique sur la diversité d'une communauté microbienne (modifié d'après Giller *et al.*, 1998).

physiologiques de la plante sont affectées et sa croissance globale est ralentie, ceci étant démontré dans de très nombreuses études (par exemple : Wisniewski et Dickinson 2003 ; Yogeetha *et al.*, 2004 ; Xiong *et al.*, 2006).

La présence de métaux lourds affecte aussi les micro-organismes vivant dans les sols. Comme ces organismes jouent un rôle essentiel dans le maintien de la fertilité des sols (Giller *et al.*, 1998), il est important de connaître les effets de polluants métalliques sur ces communautés. Généralement, on observe une diminution de la biodiversité des organismes du sol (même ceux dont l'utilité n'est pas encore connue) et une augmentation des populations tolérantes (Leita *et al.*, 1995 ; Davis *et al.*, 2004). En règle générale, les métaux toxiques affectent les populations fongiques en réduisant la diversité et l'abondance des espèces et en exerçant une pression de sélection visant à favoriser les populations tolérantes (McGrath *ete al.*, 1995), mais avant que l'extinction ne se produise, deux scénarios sont envisageables (Giller *et al.*, 1998 ; Fig. 2.2) :

- les effets d'un stress de plus en plus intense conduit à une diminution de la diversité microbienne (1) ;
- lorsque le stress est modéré, peu d'espèces bien adaptées dominant, ce qui se traduit par une faible diversité. Par contre lorsque l'intensité du stress augmente, ces espèces pourraient perdre leurs avantages et d'autres pourraient proliférer (Austin et Smith, 1989), jusqu'à ce que l'intensité du stress soit trop importante et conduise à l'extinction des organismes et à une diminution de leur diversité (2).

2.3 Effets des métaux sur les champignons

Les champignons mycorhiziens ne sont pas insensibles à la présence de métaux. De nombreuses études montrent une diminution du potentiel de croissance sur du milieu contaminé (p. ex. Colpaert *et al.*, 2000). Blaudez *et al.* (2000) montrent une inhibition de l'assimilation de l'azote chez *P. involutus* causée par la présence de métaux lourds. La récente étude microscopique de Tuszynska *et al.* (2006) fait apparaître des changements dans la mobilité et la forme des mitochondries et vacuoles de *P. involutus* dus à de fortes concentrations en zinc. Les mécanismes qui en sont responsables ne sont pas encore connus. Régulièrement des études montrent aussi l'accumulation de métaux dans les carpophores, surtout d'espèces de champignons comestibles (p. ex. Isildak *et al.*, 2004; Cocchi *et al.*, 2006; Svoboda *et al.*, 2006).

Il est souvent constaté que cette pression de sélection exercée par les métaux entraîne une augmentation de la tolérance d'individus vivant sur des sols contaminés, appelée évolution adaptative (p.ex Colpaert *et al.*, 2000; Colpaert *et al.*, 2004; Adriaensen *et al.*, 2005).

La mycorhization peut présenter une protection pour le partenaire végétal contre les effets négatifs des métaux (Martino *et al.*, 2000; Adriaensen *et al.*, 2004), voire améliorer la qualité de la phytoextraction (Sell *et al.*, 2005).

2.4 Article de revue :

Les mécanismes moléculaires de résistance à la pollution par les métaux lourds chez les champignons.

Résumé

Cet article de revue analyse les avancées récentes ayant permis d'identifier des mécanismes intra- ou extracellulaire moléculaires potentiellement impliqués dans la tolérance de champignons ectomycorhizien à des excès de métaux lourds dans leur environnement. Il semble que des mécanismes similaires décrits pour des espèces de champignons non-mycorhiziens soient impliqués. Ceux-ci incluent des mécanismes visant à diminuer l'entrée de métaux lourds dans le cytosol par chélation extracellulaire grâce à des ligands excrétés et la fixation sur des éléments des parois cellulaires. À l'intérieur des cellules, la chélation par divers ligands (glutathion, métallothionéines), l'efflux accru du cytosol vers l'extérieur de la cellule ou dans des compartiments subcellulaires ont une grande importance parmi les mécanismes de tolérance. La capacité de neutralisation par l'activité superoxyde dismutase ou la production de glutathion contribuent également à la tolérance vis-à-vis des métaux.

FEMS Microbiology Letters 254, pp. 173-181 (2006)



MINIREVIEW

Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi

Marc Bellion, Mikaël Courbot, Christophe Jacob, Damien Blaudez & Michel Chalot

IFR 110, UMR 1136 INRA/UHP Interactions Arbres Micro-organismes, Université Henri Poincaré – Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques, Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Correspondence: Michel Chalot, Université Henri Poincaré – Nancy I, UMR INRA 1136 Interactions Arbres Micro-organismes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 42 38; fax: +33 3 83 68 42 92; e-mail: michel.chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Present address: Christophe Jacob, IFR 111, UMR 7567 CNRS/UHP Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Université Henri Poincaré – Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques BP239, F54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Received 7 September 2005; revised 13 October 2005; accepted 13 October 2005. First published online January 2006.

doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00044.x

Editor: Richard Staples

Keywords

metal tolerance; ectomycorrhizal fungi; intracellular chelation; extracellular chelation; transport system.

Introduction

Exposure to heavy metals, whether of natural origin, such as metalliferous rocks, or of anthropic activity origin such as pollutions, may be toxic for soil organisms. The degree of toxicity depends mainly on the metallic element and its bioavailability in the soil. Metal bioavailability is a function of abiotic factors such as metal concentration, humidity and soil pH value but also depends on biotic factors such as the presence of metal-liberating soil-bacteria. Various metals, e.g. Zn, Cu and Mn, are essential at low concentrations but become toxic at increasing concentrations, other metals have never been shown to be essential for the development of living organisms and are toxic even at very low concentrations e.g. Hg, Cd, Pb (Trevors *et al.*, 1986; Hall, 2002).

Abstract

This review focuses on recent evidence that identifies potential extracellular and cellular mechanisms that may be involved in the tolerance of ectomycorrhizal fungi to excess metals in their environment. It appears likely that mechanisms described in the nonmycorrhizal fungal species are used in the ectomycorrhizal fungi as well. These include mechanisms that reduce uptake of metals into the cytosol by extracellular chelation through extruded ligands and binding onto cell-wall components. Intracellular chelation of metals in the cytosol by a range of ligands (glutathione, metallothioneins), or increased efflux from the cytosol out of the cell or into sequestering compartments are also key mechanisms conferring tolerance. Free-radical scavenging capacities through the activity of superoxide dismutase or production of glutathione add another line of defence against the toxic effect of metals.

This latter dogma must be reconsidered, given the recent characterization of a protein that is a Cd-containing carbonic anhydrase from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Lane *et al.*, 2005).

Mycorrhizal fungi participate in crucial symbiotic relationships with plants that grow on contaminated sites, and alleviate metal toxicity for their host plants (Godbold *et al.*, 1998; Jentschke & Goldbold, 2000; Schützendübel & Polle, 2002). Previous reviews have summarized the available information on amelioration of metal toxicity by ectomycorrhizal (ECM) associations (Rapp & Jentschke, 1994; Leyval *et al.*, 1997; Jentschke & Goldbold, 2000), and this will not be considered here. Instead, we will focus on the mechanisms involved in ECM fungal cells and possibly on their molecular basis. Various mechanisms potentially involved in metal tolerance have been characterized in ectomycorrhizal fungi and can be described as extracellular (chelation and cell-wall binding) or intracellular (binding to nonprotein thiols and transport into intracellular compartments) detoxification mechanisms. Extracellular mechanisms are mainly implied in avoidance of metal entry, whereas intracellular systems aim to reduce metal burden in the cytosol. Additional antioxidative detoxification systems, which allow the fungus to counteract the accumulation of reactive-oxygen species directly or indirectly, initiated by metals, may be part of tolerance mechanisms.

Extracellular chelation and cell-wall binding

Different organic molecules, and in particular di- and tricarboxylic acids that do not belong to the matrix of the cell wall, are excreted by fungal cells to chelate metal ions (Fig. 1), among other functions. In particular, citrate has been shown to be the most important Al^{3+} complex-former in soil solution from podzolized forest soils (Landeweert *et al.*, 2001; Van Hees *et al.*, 2001). The induction of oxalic acid efflux correlated closely with Cu tolerance in brown rot fungi (Green & Clausen, 2003), and overexcretion of oxalic acid probably contributed to the metal tolerance exhibited by *Beauveria caledonica* (Fomina *et al.*, 2005a). Similarly, ectomycorrhizal fungi also often respond to metal exposure by increased oxalate exudation (Ahonen-Jonnarh *et al.*, 2000; Cumming *et al.*, 2001). Using ^{109}Cd uptake experi-

ments with *Paxillus involutus*, we found that oxalic acid reduced Cd uptake by more than 85% as shown in Fig. 2 (D. Blaudez, unpublished results). Therefore, an increased oxalate exudation inducing a decreased Cd availability would be an efficient mechanism to avoid Cd entry into living cells of ectomycorrhizal fungi.

Exudation of organic acids may provide a source of protons for metal solubilization from metal-containing minerals, often resulting in soil acidification (Devèvre *et al.*, 1996; Fomina *et al.*, 2005b). The recent finding that metal-tolerant ectomycorrhizal fungi grew and solubilized metal-containing minerals better than nontolerant species (Fomina *et al.*, 2005b) confirm a possible relationship between tolerance to metals and extracellular chelation by extruded ligands. However, organic acid exudation should not be regarded as a general tolerance mechanism as it is both metal and species dependent (Meharg, 2003). For

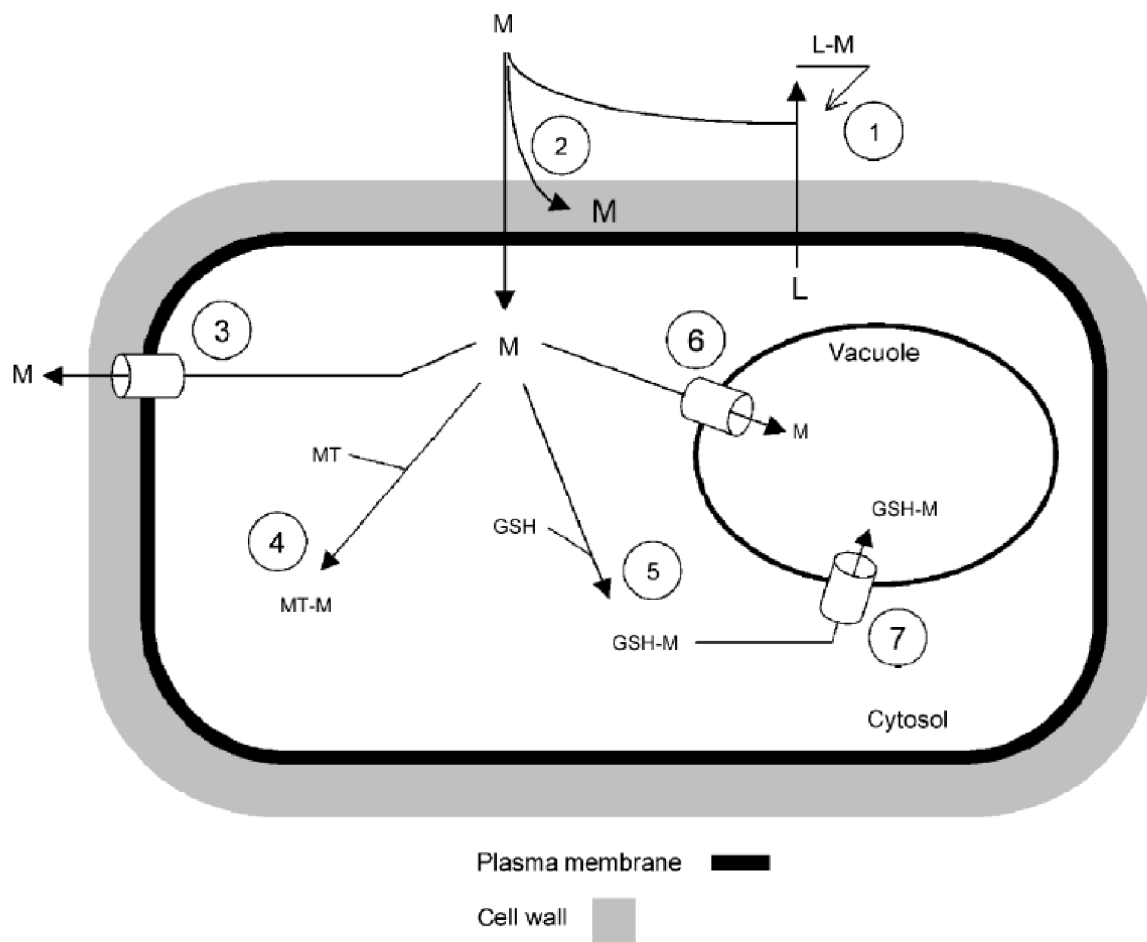


Fig. 1. Schematic representation of cellular mechanisms potentially involved in metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. M, metal-ion; 1, extracellular chelation by excreted ligands (L); 2, cell-wall binding; 3, enhanced efflux; 4, intracellular chelation by metallothionein (MT); 5, intracellular chelation by glutathione (GSH); 6, subcellular compartmentation (vacuole or other internal compartments); 7, vacuolar compartmentation of GSH-M complex (i.e. ycf1).

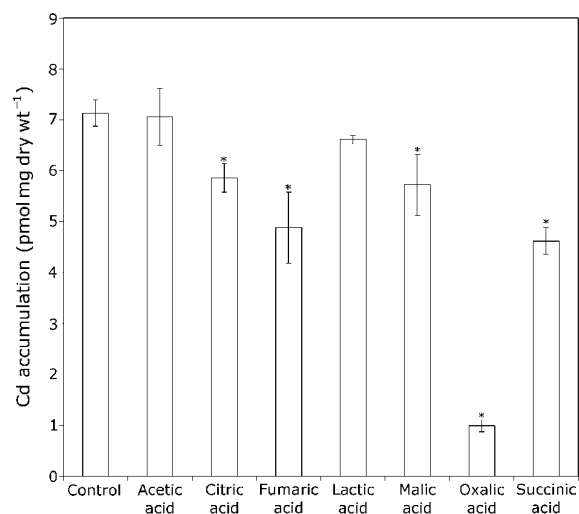


Fig. 2. Effect of organic acids on Cd accumulation by *Paxillus involutus* mycelia. Mycelium discs were exposed for 30 min to a solution containing 0.05 μM Cd^{2+} labelled with ^{109}Cd ($4.3 \text{ mCi mmol}^{-1}$), 0.5 mM CaCl_2 in 2 mM MES at pH 4.5, as described in Blaudez *et al.* (2000). Organic acids were added individually at a 2 mM concentration. Data are expressed as means \pm SE of four replicates. Asterisks indicate significant differences from the control treatment (ANOVA, $P < 0.05$).

instance, strains of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius* isolated from polluted soils showed little ability to solubilize Zn from both ZnO and $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, whereas strains from unpolluted soils showed a higher solubilization potential, which may reflect specific strategies to maintain homeostasis of essential metals under different soil conditions (Martino *et al.*, 2003). These conflicting observations may be explained by the fact that ectomycorrhizal fungi do not adapt to metal toxicity through a downward adjustment of their organic acid capacity but use other mechanisms for tolerance. The metal-sensitive ectomycorrhizal isolates do not dissolve as much metal compounds as tolerant isolates because their growth and metabolism are more quickly affected because of metal toxicity. Interestingly, glomalin, a protein synthesized and excreted by arbuscular mycorrhizal fungi (Wright & Upadhyaya, 1998; González-Chávez *et al.*, 2004) was shown to be able to sequester metal ions, especially Cu, Pb and Cd, found at high concentrations in

polluted soils. There is an urgent need to search for similar proteins, which may be produced by ectomycorrhizal fungi.

However, molecular mechanisms involved in the synthesis and release of organic compounds, are generally still poorly understood, even in the well-studied model organisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. There is no doubt that the understanding of extracellular complexation mechanisms will greatly benefit from advances in molecular studies in this area.

The contribution of cell-wall binding to metal tolerance in mycorrhizal fungi has been extensively reviewed recently (Meharg, 2003). The fungal cell wall is the first site of direct interaction (there could be excreted substances ahead) between the fungus and the metal. Its composition implies glucan-, chitin- and galactosamine-containing polymers, and a minor amount of proteins. Thus a large number of potential-binding sites are exhibited by free carboxyl, amino, hydroxyl, phosphate and mercapto groups (Strandberg *et al.*, 1981). Binding to the wall, also called biosorption (Gadd, 1993), is a mechanism not depending on the metabolic activity of the fungus, whereas precipitation with excreted substances relies on the activity of the cells. Binding of Cd to cell walls was shown to represent a substantial fraction of the metal accumulated by *Paxillus involutus* and may also be part of the mechanisms by which mycorrhizal fungi tolerate high amounts of metals (Blaudez *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2000). Lanfranco *et al.* (2002) showed that changes in hyphal morphology occur when an ericoid mycorrhiza-forming ascomycete is treated with millimolar concentrations of Zn. This led to apical swellings and increased branching in the subapical parts as well as a significant increase in the amount of chitin in metal-treated hyphae. Bhanoori & Venkateswerlu (2000) have shown the formation of a complex between the Cd and chitin in *Neurospora crassa* cell walls and proposed a structure for the chitin–Cd complex based on the results of ^{13}C -NMR spectroscopy, X-ray diffraction and infrared spectroscopy (Fig. 3).

The presence of melanins among the cell-wall components can further increase metal biosorption capacity and strength (Fogarty & Tobin, 1996). Recently, we found an induction of laccase activity and gene expression and production of polyphenolic compounds under Cd exposure,

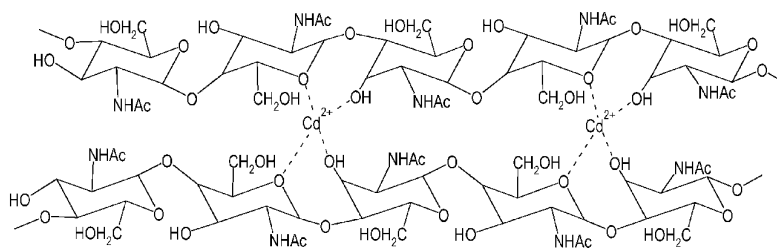


Fig. 3. Hypothetical structure for chitin–cadmium complex. Oxygen molecule of C-3 hydroxyl and ring oxygen of *N*-acetyl glucosamine are participating in complexation (redrawn from Bhanoori & Venkateswerlu, 2000).

which may be an important determinant of the cellular response to excess metals in *Paxillus involutus* (Jacob et al., 2004). It has been previously shown that Cu can induce laccase isozymes in *Pleurotus ostreatus* (Palmieri et al., 2000), and metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters have been recently found (Faraco et al., 2003). In the ericoid mycorrhizal fungus *O. maius*, the activity of polygalacturonase, an extracellular enzyme that hydrolyses the pectin component of the plant cell walls, increased under Cd or Zn exposure, a mechanism that may be considered as a preadaptive factor for the colonization of polluted soils by *O. maius* (Martino et al., 2000).

Intracellular complexation by peptides

Despite extracellular chelation and cell-wall binding capacities of ectomycorrhizal fungi described above, large amounts of metal may enter into the cells. Using a desorption method with ^{109}Cd , Blaudez et al. (2000) have quantified the proportion of Cd in the cytosol and the vacuole of *Paxillus involutus* and estimated it to be 20% and 30%, respectively. This implies the presence of efficient detoxification systems within the cytosol of Cd-stressed cells.

Morselt et al. (1986) first observed that tolerance to metals in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* was based on the presence of 'metallothionein (MT)-like' peptides. Metallothioneins are a class of ubiquitously occurring low-molecular weight cysteine- and metal-rich proteins containing sulphur-based metal clusters. Crucial roles for this protein result in its involvement in homeostasis of essential trace metals, Zn and Cu, or sequestration of the environmentally toxic metals, Cd and Hg. However, experimental evidence currently available suggests that the proteins may play a role in multiple biological processes. They have been found in fungi and other kingdoms of life (Clemens & Simm, 2003). Other studies have observed Cu-binding proteins related to metallothioneins in various isolates of the ectomycorrhizal fungi *Laccaria laccata* and *Paxillus involutus* (Howe et al., 1997). More recently, glutathione was found to be increased under Cd exposure in *Paxillus involutus* (Ott et al., 2002; Courbot et al., 2004), as well as γ -glutamylcysteine and a compound mostly related to a metallothionein (Courbot et al., 2004). The finding of this metallothionein is supported by the presence of a metallothionein sequence (Table 1), homologous to a known metallothionein from *Agaricus bisporus*, in the cDNA array analysis of *Paxillus involutus* exposed to Cd (Jacob et al., 2004). The full-length sequence of the *Paxillus involutus* metallothionein expressed in yeast restored the growth of a yAP-1 mutant strain and the polypeptide gives the same eluting peak in high-performance liquid chromatography (Courbot et al., 2004). The expression of this

metallothionein was studied at the transcriptional level in *Paxillus involutus* exposed to different metal stress, and the result indicated a correlation between metal exposure and expression level (M. Courbot and M. Chalot, unpublished results).

Conversely, these studies have highlighted the complete lack of phytochelatin (PCs) among the Cd-responsive thiols produced in *Paxillus involutus* (Courbot et al., 2004) and *Suillus bovinus* (J. V. Colpaert et al., personal communication) and seem to confirm the general lack of phytochelatin in fungi, except in rare cases such as *Candida glabrata* which produces phytochelatin in response to Cd (Zhou & Goldsbrough, 1995), *Schizosaccharomyces pombe* (Clemens & Simm, 2003) and in the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* (Jaeckel et al., 2005). From this perspective, *Paxillus involutus* and probably most of the ectomycorrhizal fungi are closer to *Saccharomyces cerevisiae* than to *Schizosaccharomyces pombe*, with respect to their intracellular chelation mechanisms. A search for gene homologues in the recently sequenced genome of *Laccaria bicolor* confirms the lack of phytochelatin synthase gene, which explains the absence of phytochelatin synthase activity in this fungus. However, production of PC2-like compounds, via a phytochelatin synthase independent pathway, has been documented in *Saccharomyces cerevisiae* (Kneer et al., 1992) and in an arsenate-hypertolerant *Aspergillus* isolate (Canovas et al., 2004), that should prompt us to reconsider the role of phytochelatin in fungi.

A good correlation between nonprotein sulphhydryl groups and the concentration of Hg and Cd has been found in the fruit bodies of various ectomycorrhizal species (Kojo & Lodenius, 1989). Under Cd exposure, an increase in sulphate assimilation and cysteine synthesis, and an increase of the nonprotein thiols glutathione and its precursor γ -glutamylcysteine were observed in *L. laccata*, although no metallothionein could be detected (Dameron et al., 1989; Galli et al., 1993). The role of glutathione as a metal chelator in fungi is now clearly established (Pocsi et al., 2004). Intracellular glutathione hinders the progression of heavy metal-initiated cell injuries by chelating and sequestering the metal ions themselves. Putative gene sequences encoding enzymes involved in the synthesis of glutathione and γ -glutamylcysteine have been identified in expression sequence tag (EST) databases obtained from the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma cylindrosporum* and *Paxillus involutus* (Table 1).

Transport mechanisms involved in metal tolerance

There has been little recent work on the transport of metals in ectomycorrhizal fungi. Metal transport proteins may be involved in metal tolerance either by extruding toxic metal

Table 1. Putative proteins from ectomycorrhizal fungi similar to proteins belonging to yeast metal tolerance pathways

Mechanism	Pathway	Function	Organism	GenBank accession no
Transcription factors	YAP1-like	Regulation of genes involved in oxidative stress tolerance and metal resistance	<i>Tuber borchii</i>	CN488390
	ZAPI-like	Regulation of zinc transporters	<i>Paxillus involutus</i>	CN072154
Transport systems involved in metal tolerance and homeostasis	Metal efflux into organelles	Cation diffusion facilitator	<i>Hebeloma cylindroposrum</i>	CK993155
		Cd-conjugate ABC transporter	<i>Hebeloma cylindroposrum</i> <i>Pisolithus microcarpus</i>	CK995083, CK992826 CB010722
		Metal-transporting ATPase	<i>Hebeloma cylindroposrum</i> <i>Tuber borchii</i>	CK992318, CK994170 AF487323
	Metal influx	Manganese transporter	<i>Hebeloma cylindroposrum</i> <i>Tuber borchii</i>	CK995213, CK992334, CK995203 CN487781
Intracellular metal binding	Metal delivery to other proteins	Copper transporter	<i>Paxillus involutus</i>	CD274893
		Iron transporter	<i>Paxillus involutus</i>	AAT91247, AAT31333, AAT91334 AAT91335, AAT91336, CD273262 CD273746, CD273829, CD275306 CD274894
	Metallochaperone	<i>Paxillus involutus</i> <i>Hebeloma cylindroposrum</i>	BU964154	
Protection against metal-induced oxidative stress	Cu and Cd binding	Glutathione γ -glutamylcysteine synthetase	<i>Paxillus involutus</i> <i>Hebeloma cylindroposrum</i> <i>Paxillus involutus</i>	AAS19463 CK995328 CD273087
		Glutathione synthetase	<i>Paxillus involutus</i> <i>Paxillus involutus</i>	BG141319
	Regulation of cell redox homeostasis	Thioredoxin	<i>Paxillus involutus</i> <i>Hebeloma cylindroposrum</i> <i>Tuber borchii</i>	AAS19462, CD275083, CD275423, CD276018 CK995145, CK995656 BM26656, CN487764, CN487812
		Glutaredoxin	<i>Pisolithus microcarpus</i> <i>Laccaria bicolor</i> <i>Tuber borchii</i> <i>Pisolithus microcarpus</i> <i>Laccaria bicolor</i>	CB011224, BF942541 CB012066 BM266155 BF942586 CB010230, CB010243
Removal of reactive-oxygen species	Catalase		<i>Laccaria bicolor</i>	CB010617
		Superoxide dismutase	<i>Tuber borchii</i> <i>Paxillus involutus</i> <i>Tuber borchii</i> <i>Laccaria bicolor</i> <i>Hebeloma cylindroposrum</i>	BM266201 AAD25353, AQ064502, AW064510 BM266232 CB010250, CB010696 CK994166, CK991636, CK993733, CK992059, CK992841, CK994504, CK995143, CK991818, CK994684, CK994504, CK994795, CK991819

Selected protein sequences identified in *Saccharomyces cerevisiae* being involved in metal tolerance pathway were used to search for expression sequence tags or open reading frames from ectomycorrhizal fungi encoding putative proteins similar to them. Searches were made by TBLASTn or BLASTp in the NCBI database (P value < 2.e-05).

ions from the cytosol out of the cell or by allowing metal sequestration into intracellular compartments (Fig. 1) (Williams *et al.*, 2000; Hall, 2002). Using radiotracer flux analyses, the significant accumulation of Cd found in the

vacuolar compartment has been suggested as an essential Cd detoxification mechanism in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Blaudez *et al.*, 2000). A crucial step in Cd detoxification, certainly in fission yeasts and probably in

higher plants, involves the accumulation of Cd-conjugated glutathione or Cd-conjugated phytochelatins in the vacuole. This process appears to be mediated by the ATP-binding cassette transporter Hmt1 located at the tonoplast (Ortiz *et al.*, 1992), which would be of no significance in ectomycorrhizal fungi, given the lack of phytochelatin synthesis. The yeast cadmium factor (Ycf1) gene encodes a MgATP-energized glutathione S-conjugate transporter responsible for the vacuolar sequestration of bis(glutathionato) cadmium (Li *et al.*, 1997) as well as bis(glutathionato) mercury (Gueldry *et al.*, 2003). The presence of this specific permease in the tonoplast of *Paxillus involutus* could explain the high Cd content in the vacuole (Blaudez *et al.*, 2000). This hypothesis was further supported by X-ray microanalysis, which revealed that the accumulation of Cd correlated tightly with the accumulation of sulphur in electron-dense bodies in the vacuolar compartment (Ott *et al.*, 2002). However, the chemical nature of these sulphur components involved in Cd complexation was not confirmed in this study.

With a similar approach, it was recently found that an enhanced Zn efflux may act as a potential tolerance mechanism in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* (Adriaensen, 2005). Alternatively, downregulation of transporter genes involved in the uptake of metal at the plasma membrane may also be part of tolerance mechanisms, as described in other fungi (Eide, 2003) and plants (Clemens, 2001; Hall, 2002).

Interestingly, an EST sequence showed a high similarity with the yeast transcription factor Zap1 (Table 1), involved in the regulation of numerous metal transporters in yeast (Zhao *et al.*, 1998). Zap1 plays a direct role in controlling Zn-responsive gene expression in yeast by binding to Zn-responsive elements in the promoters of genes that it regulates. It thus constitutes an interesting target for Zn tolerance studies in ectomycorrhizal fungi.

However, it is clear that the molecular mechanisms underlying metal transfer in intracellular compartments are still ignored in ectomycorrhizal fungi and more generally, nothing has been published in relation to the genes encoding proteins mediating intracellular metal transport in ectomycorrhizal fungi. A search for EST sequences encoding metal transporters promisingly indicates the presence of potential genes belonging to the ATP-binding cassette (the Ycf1 Cd-conjugate ABC transporter), cation diffusion facilitator, natural resistance-associated macrophage protein (the Smf1 Mn transporter) or P-type ATPase families (Table 1). Members of these transporter families have been shown to actively participate in metal detoxification of cells in a broad range of organisms (Williams *et al.*, 2000), and therefore they could also play a crucial role in metal protection in ectomycorrhizal fungi.

Antioxidative mechanisms

The formation of free radical species, which can be initiated directly or indirectly by metals, can cause severe damage to different cellular components. Formation of metal-induced reactive-oxygen species could occur via several mechanisms. The Fenton or Haber-Weiss reactions are catalysed by redox-active metals (e.g. Cu, Fe, Cr, V) and generate the highly reactive hydroxyl (OH[•]) radical from H₂O₂ and superoxide (O₂^{•-}) substrates (Halliwell & Gutteridge, 1999). Redox-inactive metals such as Cd, Ni, Hg and Zn deplete glutathione and protein-bound sulphhydryl groups, resulting in the production of reactive-oxygen species. Several indirect mechanisms are considered to account for the action of redox-inactive metals, for example, these metals might displace redox-active metals from cellular-binding sites (Avery, 2001). Evidence for a role of reactive-oxygen species in metal-induced damage to yeast includes increased metal tolerance during anaerobicity, protection exerted by certain free radical scavengers, and the many overlaps in the molecular mechanisms used by yeasts to cope with oxidative and metal stress (Avery, 2001).

In a previous paper, we hypothesized that Cd²⁺, although it is not a redox-active metal, induced an oxidative stress in *Paxillus involutus* (Jacob *et al.*, 2001). It is possible that Cd²⁺ indirectly contributes to oxidative stress by affecting the cellular thiol redox balance. Indeed, we found that Cu²⁺ and Cd²⁺ markedly induced *PiTrx1*, a gene encoding a thioredoxin in *Paxillus involutus* (Table 1) (M. Courbot and M. Chalot, unpublished results). Thioredoxins are small heat-stable oxidoreductases, which contain two conserved cysteine residues in their active sites (Holmgren, 1989). Proposed roles include many cellular processes such as protein folding and regulation, reduction of dehydroascorbate, repair of oxidatively damaged proteins and sulphur metabolism. More recently it was also demonstrated that thioredoxins are required to maintain redox homeostasis in response to both oxidative and reductive stress conditions (Trotter & Grant, 2002). We suggest that upregulation of *PiTrx1* expression is a rapid response determinant in the handling of Cu²⁺ or Cd²⁺, which might function as a first line of defence against intracellular metal ions. Similarly, thioredoxin was found to be induced upon exposure of yeast cells to Cd (Vido *et al.*, 2001).

Ott *et al.* (2002), in a comprehensive study, analysed the antioxidative systems in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in response to Cd, which revealed the induction of superoxide dismutase (SOD) and the accumulation of glutathione, as well as the induction of glutathione-related systems at low Cd concentration (glutathione-dependent peroxidase, glutathione reductase) (Ott *et al.*, 2002). Their study confirmed that Mn-dependent SOD activity was induced in response to exposure of *Paxillus involutus* to Cd

(Jacob *et al.*, 2001). In addition, SOD could promote Cd resistance through its capacity to bind and buffer cellular Cd as demonstrated for Cu and yeast (Culotta *et al.*, 1995). The large number of ESTs found for SOD (Table 1) probably denotes a crucial function of these enzymes against oxidative stress in ectomycorrhizal fungi. It was found that a fast glutathione accumulation and maintenance of a relatively stable redox state prevented an accumulation of H₂O₂ in *Paxillus involutus* (Ott *et al.*, 2002). The authors concluded that *Paxillus involutus* is able to detoxify high concentrations of Cd by a strong induction of glutathione synthesis accompanied by a rapid sulphur-dependent transport of Cd into the vacuole. This latter observation is in full agreement with our previous results (Blaudez *et al.*, 2000), as discussed above. Interestingly, we found, under Cd exposure, a downregulation of hydrophobin genes, a family of small hydrophobic cysteine-rich proteins implicated in various developmental processes such as the emergence of aerial hyphae (Jacob *et al.*, 2004). The synthesis of these cysteine-rich compounds may be efficiently reduced in *Paxillus involutus*, thus redirecting cysteine to the manufacture of cysteine-enriched compounds needed for the chelation of Cd. It was also suggested that metallothioneins have antioxidant activity *in vivo*, which could be involved in the cellular response to oxidative stress (Tamai *et al.*, 1993). However this was not the case for the metallothionein detected in *Paxillus involutus*, which was unable to complement a gene-deficient yeast strain exposed to an oxidative stress (M. Courbot and M. Chalot, unpublished results).

Outlook

This review has focused on recent evidence that identifies potential extracellular and cellular mechanisms that may be involved in the tolerance of ectomycorrhizal fungi to excess metals in their environment. It appears likely that mechanisms described in other nonmycorrhizal fungal species are also used by the ectomycorrhizal fungi. These include mechanisms that reduce uptake into the cytosol by extracellular chelation or binding onto cell-wall components, intracellular chelation of metals in the cytosol by a range of ligands (glutathione, metallothioneins), or efflux from the cytosol into sequestering compartments. Specific features such as the lack of phytochelatin synthesis have also been described. However, most of the molecular mechanisms remain to be elucidated, among which transport mechanisms are of key interest. Furthermore, observations with a particular fungus exposed to a particular metal must be generalized with caution. It appears for instance that the major mechanism involved in Cd detoxification in *Paxillus involutus* consists in its compartmentation within the vacuole as sulphur-rich complexes, whereas Zn tolerance in *Suillus bovinus* could be primarily because of a reduced Zn

accumulation within cells. Beyond these mechanisms, of course, is the problem of understanding tolerance in symbiosis, and this introduces a further level of complexity that is beyond the scope of this review.

With the completion of the *L. bicolor* genome sequencing project, together with genome sequences from other fungi, one can expect that the full range of genes that are potentially involved in metal tolerance and homeostasis will be revealed. One approach will be the use of full-genome gene arrays to study the potential interactions and synergies between different tolerance mechanisms in response to metal exposure. However, these data are limited to transcriptional-level responses. Proteomic approaches should provide the additional information that would be more closely related to cell function. Such studies on yeast have revealed that several proteins with antioxidant properties were induced when the cells were exposed to acute Cd exposure (Vido *et al.*, 2001). In *Schizosaccharomyces pombe*, 27 proteins functionally classified as cell rescue and defence factors were upregulated for oxygen and radical detoxification (Bae & Chen, 2004). Further proteome analyses using mycorrhizal fungi will contribute to a more integrated understanding of the molecular events involved in metal stress alleviation in these fungi.

The ultimate demonstration that a particular gene product is involved in metal tolerance will require the development of more functional tools than are available now, while many research groups are actively working on transformation systems for ectomycorrhizal fungi that should provide for the efficient overexpression or disruption of target genes. Knowledge about metal tolerance mechanisms in ectomycorrhizal fungi will further lead to powerful applications in bioremediation, such as those suggested for *Aspergillus* (Vala *et al.*, 2004).

References

- Adriaensen K (2005) Adaptive heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal fungi *Suillus bovinus* and *Suillus luteus*. PhD thesis, Limburgs Universitair Centrum.
- Ahonen-Jonnarth U, Finlay RD, Van Hees PAW & Lundström US (2000) Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytol* **146**: 557–567.
- Avery SV (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* **49**: 111–141.
- Bae W & Chen X (2004) Proteomic study for the cellular responses to Cd²⁺ in *Schizosaccharomyces pombe* through amino acid-coded mass tagging and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **3**: 596–607.
- Bhanoori M & Venkateswerlu G (2000) In vivo chitin-cadmium complexation in cell wall of *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* **1523**: 21–28.

- Blaudez D, Botton B & Chalot M (2000) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* **146**: 1109–1117.
- Canovas D, Vooijs R, Schat H & de Lorenzo V (2004) The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P37 to arsenic. *J Biol Chem* **279**: 51234–51240.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475–486.
- Clemens S & Simm C (2003) *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. *New Phytol* **159**: 323–330.
- Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M & Leroy P (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7413–7417.
- Culotta VC, Joh H-D, Lin S-J, Slekar KH & Strain J (1995) A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J Biol Chem* **270**: 29991–29997.
- Cumming JR, Swiger TD, Kurnik BS & Panaccione DG (2001) Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum in vitro. *Can J For Res* **31**: 703–710.
- Dameron CT, Smith BR & Winge DR (1989) Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J Biol Chem* **264**: 17355–17360.
- Devèvre O, Garbaye J & Botton B (1996) Release of complexing organic acids by rhizosphere fungi as a factor in Norway spruce yellowing in acidic soils. *Mycol Res* **100**: 1367–1374.
- Eide DJ (2003) Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr* **133**: 1532S–1535S.
- Faraco V, Sannia G & Giardina P (2003) Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* **149**: 2155–2162.
- Fogarty RV & Tobin JM (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol* **19**: 311–317.
- Fomina M, Hillier S, Charnock JM, Melville K, Alexander IJ & Gadd GM (2005a) Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 371–381.
- Fomina MA, Alexander IJ, Colpaert JV & Gadd GM (2005b) Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* **37**: 851–866.
- Frey B, Zierold K & Brunner I (2000) Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies*–*Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. *Plant Cell Environ* **23**: 1257–1265.
- Gadd GM (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* **124**: 25–60.
- Galli U, Meier M & Brunold C (1993) Effects of cadmium on nonmycorrhizal and mycorrhizal norway spruce seedlings *Picea abies* (L) Karst and its ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* (Scop ex Fr) Bk and Br – sulfate reduction, thiols and distribution of the heavy-metal. *New Phytol* **125**: 837–843.
- Godbold DL, Jentschke G, Winter S & Marschner P (1998) Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. *Chemosphere* **36**: 757–762.
- González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF & Nichols KA (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ Pollut* **130**: 317–323.
- Green F & Clausen CA (2003) Copper tolerance of brown-rot fungi: time course of oxalic acid production. *Int Biodeterior Biodegrad* **51**: 145–149.
- Guedry O, Lazard M, Delort F, Dauplais M, Grigoras I, Blanquet S & Plateau P (2003) Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **270**: 2486–2496.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1–11.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Science Publications, New York.
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**: 13963–13966.
- Howe R, Evans RL & Ketteridge SW (1997) Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* **135**: 123–131.
- Jacob C, Courbot M, Brun A, Steinman HM, Jacquot JP, Botton B & Chalot M (2001) Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Eur J Biochem* **268**: 3223–3232.
- Jacob C, Courbot M, Martin F, Brun A & Chalot M (2004) Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *FEBS Lett* **576**: 423–427.
- Jaeckel P, Krauss G, Menge S, Schierhorn A, Rucknagel P & Krauss GJ (2005) Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. *Biochem Biophys Res Commun* **333**: 150–155.
- Jentschke G & Goldbold DL (2000) Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiol Plant* **109**: 107–116.
- Kneer R, Kutchan TM, Hochberger A & Zenk MH (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch Microbiol* **157**: 305–310.
- Kojo MR & Lodenius M (1989) Cadmium and mercury in macrofungi – mechanisms of transport and accumulation. *Angew Bot* **63**: 279–292.
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW & Van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* **16**: 248–254.
- Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC & Morel FM (2005) Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**: 42.
- Lanfranco L, Balsamo R, Martino E, Perotto S & Bonfante P (2002) Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. *Eur J Histochem* **46**: 341–350.
- Leyval C, Turnau K & Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function:

- physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139–153.
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ & Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 42–47.
- Martino E, Coisson JD, Lacourt I, Favaron F, Bonfante P & Perotto S (2000) Influence of heavy metals on production and activity of pectinolytic enzymes in ericoid mycorrhizal fungi. *Mycol Res* **104**: 825–833.
- Martino E, Perotto S, Parsons R & Gadd GM (2003) Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites. *Soil Biol Biochem* **35**: 133–141.
- Meharg AA (2003) The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol Res* **107**: 1253–1265.
- Morselt AFW, Smits WTM & Limonard T (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **96**: 417–420.
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G & Ow DW (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J* **11**: 3491–3499.
- Ott T, Fritz E, Polle A & Schützendübel A (2002) Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Barsch) Fr. and its reaction to cadmium. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 359–366.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B & Sannia G (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 920–924.
- Pocsi I, Prade RA & Penninckx MJ (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* **49**: 1–76.
- Rapp C & Jentschke G (1994) Acid deposition and ectomycorrhizal symbiosis: field investigations and causal relationships. *Effects of Acid Rain on Forest Processes* (Godbold DL & Hüttermann A, eds), pp. 183–230. Wiley, New York.
- Schützendübel A & Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53**: 1351–1365.
- Strandberg GW, Shumate SE II & Parrott JR Jr (1981) Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **41**: 237–245.
- Tamai KT, Gralla EB, Ellerby LM, Valentine JS & Thiele DJ (1993) Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8013–8017.
- Trevors JT, Stratton GW & Gadd GM (1986) Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can J Microbiol* **32**: 447–464.
- Trotter EW & Grant CM (2002) Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **46**: 869–878.
- Vala AK, Anand N, Bhatt PN & Joshi HV (2004) Tolerance and accumulation of hexavalent chromium by two seaweed associated aspergilli. *Mar Poll Bull* **48**: 983–985.
- Van Hees PAW, Tipping E & Lundström US (2001) Aluminium speciation in forest soil solution – Modelling the contribution of low molecular weight organic acids. *Sci Total Environ* **278**: 215–229.
- Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB & Labarre J (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 8469–8474.
- Williams LE, Pittman JK & Hall JL (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *BBA-Biomembranes* **1465**: 104–126.
- Wright SF & Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **198**: 97–107.
- Zhao H, Butler E, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S & Eide D (1998) Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem* **273**: 28713–28720.
- Zhou J & Goldsbrough PB (1995) Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Gen* **248**: 318–328.

Chapitre 3

La mutagenèse des champignons

VEU l'importance des mycorhizes dans le revégétalisation et la phytoremédiation de sites pollués par des métaux, il est indispensable de connaître les mécanismes qui peuvent conférer une tolérance plus importante aux champignons et de les étudier par les outils de la biologie moléculaire. Ceci peut viser *in fine* à pouvoir sélectionner, voire produire des clones résistants. À côté de ce rôle écologique, les champignons ont une grande importance en biotechnologie pour la production de métabolites secondaires et cela même à échelle industrielle. Il existe aussi beaucoup de champignons qui sont des pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes ce qui plaide aussi en faveur d'une étude approfondie de ces organismes.

Comme de plus, la biologie des champignons est entrée dans l'ère de la génomique fonctionnelle, de plus en plus de séquences de génomes fongiques complets sont publiées (Tab. 3.1) et d'autres sont en cours d'analyse. Comme la connaissance des génomes est incomplète tant qu'une analyse approfondie des gènes prédits n'a pas été faite, la possibilité de disposer de mutants fongiques semble incontournable et ceci si possible à grande échelle. Or pour les champignons filamenteux la transformation génétique – aussi bien ciblée qu'aléatoire – est pour l'instant difficile à mettre en œuvre. La suite de notre étude bibliographique portera sur les différentes techniques de transformation connues et plus spécialement l'agrotransformation qui a été retenue dans le cadre de cette thèse.

3.1 Objectifs possibles de la transgénèse

L'étude de la fonction d'un gène dans un organisme utilise souvent des techniques d'inactivation et/ou de surexpression (éventuellement en tant que gène de fusion avec un marqueur) de ce gène. Ces deux objectifs sont aussi poursuivis par la transgénèse de

Espèce souche	taille du génome nombre d'orfs	Réf.
Ascomycètes		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	35000 kb	non-publié
<i>Candida glabrata</i> CBS138	nd	Dujon <i>et al.</i> , 2004
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> CBS767	10117 kb 6318 orfs	Dujon <i>et al.</i> , 2004
<i>Kluyveromyces lactis</i> CLIB210	nd	Dujon <i>et al.</i> , 2004
<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB99	nd	Dujon <i>et al.</i> , 2004
<i>Ashbya (Eremothecium) gossypii</i>	9000 kb 4720 orfs	Dietrich <i>et al.</i> , 2004
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	43000 kb 10082orfs	Galagan <i>et al.</i> , 2003
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h	14000 kb 4824 orfs	Wood <i>et al.</i> , 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	12069 kb 6294 orfs	Clayton <i>et al.</i> , 1997
<i>Tuber melanosporum</i> *		
Basidiomycètes		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	21000 kb	Loftus <i>et al.</i> , 2005
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> RP-78	30000 kb	Teeri, 2004
<i>Laccaria bicolor</i> ** S238N		
Microsporidia		
<i>Encephalitozoon cuniculi</i> GB-M1	2500 kb 1997 orfs	Katinka <i>et al.</i> , 2001

*séquençage en cours

**séquençage achevé, annotation en cours

URL : <http://www.genomesonline.org>

TAB. 3.1 – Espèces fongiques dont le génome a été séquençé.

champignons.

3.1.1 Surexpression

La surexpression d'un transgène, hétérologue ou homologue, vise à produire une protéine qui n'est que peu ou pas produite dans le type sauvage. Cette expression peut être transitoire, par exemple pour étudier la localisation de protéines de fusion avec de

la GFP. Dans ce cas, le plasmide utilisé, n'a pas besoin d'être autorépliatif, il ne sera contenu que dans quelques cellules et ne se transmettra pas à la descendance.

Surexpression stable

Pour utiliser des clones transformés dans des expériences de longue durée, p. ex. culture de mycorhization (Combie *et al.*, 2004), il faut disposer de transformants stables. Cette stabilité qui correspond au fait que le transgène est présent aussi dans la descendance des cellules initialement transformées, peut être garantie de deux manières : d'une part par la présence de plasmides autorépliatifs (autonomes) portant un gène de résistance et une culture maintenant la pression de sélection sur la présence de ce gène de résistance et donc du plasmide (p. ex. Nicolás *et al.*, 2003); d'autre part la stabilité de la transformation peut être obtenue par intégration du transgène dans le génome de l'individu transformé (p. ex. Rodríguez-Tovar *et al.*, 2005).

3.1.2 Inactivation

Inactivation aléatoire

Pour l'obtention de mutants aléatoires, la mutation ne peut pas être épigénique, mais doit affecter le génome. Principalement deux techniques peuvent être envisagées : l'utilisation d'un agent mutagène comme l'irradiation par les UV (p. ex. Fierro *et al.*, 2004) et la mutagenèse insertionnelle aléatoire (p. ex. Kemppainen *et al.*, 2005; Sugui *et al.*, 2005; Combie *et al.*, 2003). Une forte limitation de cette méthode est l'obtention d'un phénotype clair qui doit pouvoir être criblé facilement et à grande échelle, puisqu'il faudra analyser un grand nombre de transformants. Ce criblage de transformants est bien plus coûteux que celui de bactéries ou de levures. Mais cette limitation de la mutagenèse aléatoire laisse pourtant apparaître un avantage majeur : pouvoir trouver des phénotypes pour lesquels le(s) gène(s) en cause ne sont pas connus, par exemple des mutants non-mycorhizogène (Myc^-) d'*Hebeloma cylindrosporum* (Combie *et al.*, 2004). Dans ce cas, ce sera seulement après avoir trouvé le mutant d'intérêt qu'au sein de celui-ci le gène affecté sera recherché.

Inactivation ciblée par recombinaison homologue

L'inactivation d'un gène se fait couramment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Wach *et al.*, 1994) et *Schizosaccharomyces pombe* (Bähler *et al.*, 1998). Mais, tandis que pour les

levures des séquences homologues de 60 à 80 bp sont suffisantes et donnent des taux de recombinaison élevés, pour les champignons filamenteux des séquences homologues de plusieurs kpb donnent encore des taux de recombinaison faibles (Asch et Kinsey 1990). Une possibilité est de passer par une étape intermédiaire dans *Escherichia coli* dans lequel un événement de recombinaison homologue est possible entre un cosmide du génome du champignon à transformer et un plasmide contenant une courte séquence homologue du gène à déléter ainsi que des marqueurs de sélection pour les bactéries et le champignon. Cette technique a été mise au point en premier pour *Aspergillus nidulans* (Chavroche *et al.*, 2000), puis d'autres espèces ont suivi, p. ex. *Aspergillus fumigatus* (Langfelder *et al.*, 2002) et *Podospora anserina* (Hamann *et al.*, 2005). Par contre, Sugui *et al.* (2005) ont construit un plasmide contenant une région homologue dans laquelle se trouvait aussi le gène *hph* de l'hygromycine B phosphotransférase qui confère une résistance à l'hygromycine, pour l'utiliser directement dans une transformation par *Agrobacterium*. Dans tous les cas, la recombinaison homologue est toujours concurrencée par de la recombinaison ectopique ou illégitime (non homologous end joinig, NHEJ). Pour cela, l'utilisation de mutants pour les facteurs permettant le NHEJ peut être intéressante. En effet, chez ces mutants, le taux d'intégration ectopique est faible. Cette technique a été utilisée pour des mutants KU80 de la levure *Kluyveromyces lactis* (Kooistra *et al.*, 2004) et différents mutants de *Neurospora crassa* (Ninomiya *et al.*, 2004). Une autre possibilité pour distinguer entre intégration ciblée et intégration ectopique a été proposée par Hamer *et al.* (2001 ; fig. 3.1) : TAGKO (transposon-arrayed gene knockout) : un transposon est intégré *in vitro* dans le cosmide contenant le gène cible. Après transformation du champignon, la présence du transposon dans le gène recombiné augmente la taille de ce dernier de manière à ce que son profil d'amplification par PCR permettra de différencier les événements de recombinaison homologue des événements d'intégration ectopique.

Inactivation ciblée par *silencing*

L'expression d'un gène cloné en sens inverse ou d'un ARNm autocomplémentaire en tige-boucle peut conduire à des phénomènes de *silencing* ou d'ARN interférence.

ARN antisens La technique d'ARN antisens (ou RNA silencing) consiste à faire exprimer à une cellule un ARN qui est complémentaire à un ARNm issu de la transcription normale d'un gène. À cette fin l'ORF du gène en question doit être cloné en sens inverse derrière le promoteur utilisé pour la transgénèse. Le messenger normal peut s'hybrider à

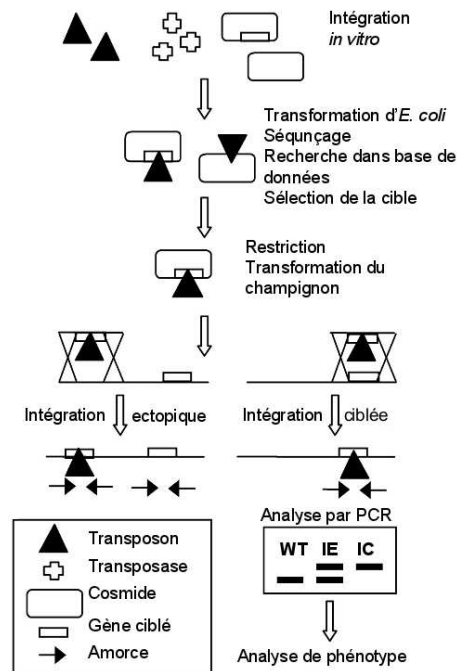


FIG. 3.1 – Événement de recombinaison homologue visualisée par la présence d'un transposon (Hamer *et al.*, 2001).

l'antisens ce qui va empêcher la traduction et peut déclencher le phénomène d'interférence aux ARN (voir ci-dessous). Ainsi le taux de la protéine issue du gène ciblé va décroître dans la cellule.

ARN interférence Le phénomène d'ARN interférence repose sur la capacité d'une cellule à détecter la présence d'ARN double brin dans le cytosol et de déclencher une cascade de réactions qui vise à éliminer cet ARN double brin ainsi que tous les ARN simple brin ayant la même séquence que le double brin initial. On pense que ce mécanisme retrouvé chez les animaux, les plantes et les champignons, constitue une défense contre d'éventuelles attaques virales, par des virus ayant un génome sous forme d'ARN double brin. Ainsi aussi bien le génome viral que d'éventuels produits de transcription de ce génome sont neutralisés.

3.2 Méthodes de mutagenèse

3.2.1 Irradiation aux rayons ultraviolets

L'irradiation de conidies par des rayons ultraviolets peut être utilisée pour faire de la mutagenèse aléatoire. Cette technique peut même être appliquée à la mutagenèse

spécifique, si un phénotype et un mode de sélection pour les mutants désirés sont connus (Chand *et al.*, 2005 ; Fierro *et al.*, 2004). L'avantage de cette méthode est la mise en œuvre assez facile. Il est par contre plus difficile de pré si un mutant sélectionné ne contient qu'une seule mutation, celle souhaitée et sélectionnée, ou s'il en contient d'autres qui n'ont pas été contre-sélectionnés.

3.2.2 Utilisation de mutagènes chimiques

Des composés mutagènes peuvent aussi servir à faire de la mutagenèse aléatoire, suivi d'une sélection par phénotype. Chand *et al.* (2005) ont utilisé le bromure d'éthidium (BET) et la 1-méthyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) comme agent mutagène, soit en incubant des spores dans des solutions de ces composés, soit en les faisant pousser sur un milieu contenant une concentration sub létale de BET et de MNNG. Les avantages et désavantages sont les mêmes que pour l'irradiation aux UV.

3.2.3 Techniques de protoplastes

Les techniques mettant en œuvre des protoplastes sont également très répandues pour la transformation de plantes ainsi que pour celle des champignons. La première étape commune consiste en l'obtention de protoplastes qui sont des cellules dont la paroi a été digérée au moins partiellement par des enzymes entraînant la lyse des polysaccharides pariétaux. Ensuite différents modes pour introduire l'ADN dans les cellules sont possibles.

Traitement au polyéthylène glycol (PEG)

Les protoplastes mélangés avec l'ADN sont incubés avec du polyéthylène glycol 4000 (Yelton *et al.*, 1984). Cette méthode est basée sur celle décrite par Hinnen *et al.* (1978) pour la transformation de protoplastes de levure. Koukaki *et al.* (2003) ont appliqué cette technique aussi bien à du mycélium qu'à des conidiospores germées ou non. Liu *et al.* (2004) ont utilisé des microbilles d'alginate de Ca recouvertes d'ADN pour transformer des protoplastes de plantes.

Liposomes

Une autre méthode pour intégrer de l'ADN dans les protoplastes est l'utilisation de liposomes. L'ADN sera encapsulé dans des vésicules phospholipidiques artificielles qui

vont fusionner avec la membrane plasmique des protoplastes et libérer ainsi l'ADN dans le cytosol.

Electroporation

Les protoplastes peuvent aussi être mélangés avec l'ADN et ce mélange sera soumis à une suite de chocs électriques de haute tension et de courte durée qui déstabilisera les membranes et permettra l'entrée de l'ADN dans les protoplastes.

Après la réception de l'ADN par une des méthodes précitées, les protoplastes sont mis en culture.

3.2.4 Bombardement avec particules

Le bombardement de tissus fongiques se fait avec un canon à particules (Biolistic®). Il projette, grâce à de l'hélium sous pression (environ 9 MPa), des particules d'or de 0,6 μm de diamètre recouvertes d'ADN (en l'occurrence du plasmide) sur le tissu. Aussi bien du mycélium (Sunagawa et Magae, 2002) que des spores (Aboul-Soud *et al.*, 2005) peuvent être bombardés.

3.2.5 Intégration par une enzyme de restriction (REMI)

La technique d'intégration d'ADN à l'aide d'une enzyme de restriction (restriction enzyme mediated integration, REMI), utilisée pour la mutagenèse aléatoire (p. ex. Thon *et al.*, 2000), consiste à transformer un champignon simultanément avec une enzyme de restriction et un plasmide linéarisé par la présence de l'enzyme. L'enzyme va couper dans le génome et le plasmide pourra s'y insérer (Kahmann et Basse, 1999). Mais il arrive qu'une partie des mutants ne contienne pas de marqueur de sélection (Lu *et al.*, 1994), probablement parce qu'il y a eu digestion intempestive et réparation imparfaite du chromosome sans intégration du marqueur (Sweigard *et al.*, 1998). De même l'intégration ne peut se faire que là où il y a un site de restriction et peut ne pas être tout à fait aléatoire mais présenter une prépondérance pour les régions avec un niveau élevé de transcription (Sweigard *et al.*, 1998).

3.3 Agrotransformation

3.3.1 Introduction

Les bactéries gram-négatives de l'espèce *Agrobacterium tumefaciens* sont connues depuis 1974 comme agents responsables de la galle du collet, une sorte de cancer, chez de nombreuses plantes vertes (Van Larebeke *et al.*, 1974). Cette galle est due à un transfert d'ADN de la bactérie à la plante et c'est l'unique exemple connu où une tumeur est due à un tel transfert (Stafford, 2000). La possibilité d'*A. tumefaciens* à transférer un fragment d'ADN, appelé ADN-T (pour ADN transféré), à une plante a été pour une première fois mise à profit en 1983 où un gène choisi, différent de celui de la virulence, c'est-à-dire celui de la résistance à la kanamycine, a été utilisé pour transformer des plantes de tabac (Fraley *et al.*, 1983).

L'utilisation de l'agrotransformation pour la transgénèse de champignons date de 1995 pour *Saccharomyces cerevisiae* (Bundock *et al.*, 1995) et de 1998 pour les champignons filamenteux (de Groot *et al.*, 1998) et est donc assez récente. L'utilisation de basidiomycètes est beaucoup moins fréquente que celle d'ascomycètes (8 espèces de basidiomycètes contre 48 d'ascomycètes selon Michielse *et al.* (2005).

La capacité à transférer de l'ADN et donc de provoquer les tumeurs végétales est due à un plasmide présent dans les cellules d'*A. tumefaciens* virulentes appelé plasmide Ti (pour "tumor inducing"). Ce plasmide Ti contient normalement aussi bien les gènes *vir* nécessaires à réaliser le transfert d'ADN que l'ADN-T (Zhu *et al.*, 2000; Zupan *et al.*, 2000). L'ADN-T s'insère aléatoirement dans le génome actif de la plante hôte et induit (i) une forte prolifération du tissu végétal à cause d'une plus grande sensibilité à des substances de croissance et donc la formation d'une tumeur ainsi que (ii) la synthèse d'opines qui serviront comme source de carbone et d'azote aux cellules bactériennes. Pour les besoins de la recherche, l'ADN-T et les gènes codant les protéines nécessaires au transfert ont été séparés et se trouvent sur deux plasmides différents (Hoekema *et al.*, 1983). Celui codant les protéines du transfert est appelé plasmide T, il fait partie de la souche d'*A. tumefaciens* utilisée, sa perte étant dans la plupart des cas létale pour la bactérie (Tab. 4.2). L'ADN-T est "désarmé", c.-à-d. les gènes de la virulence sont éliminés, il va varier selon les expériences et se trouve dans un deuxième plasmide, appelé plasmide binaire (*vide infra*).

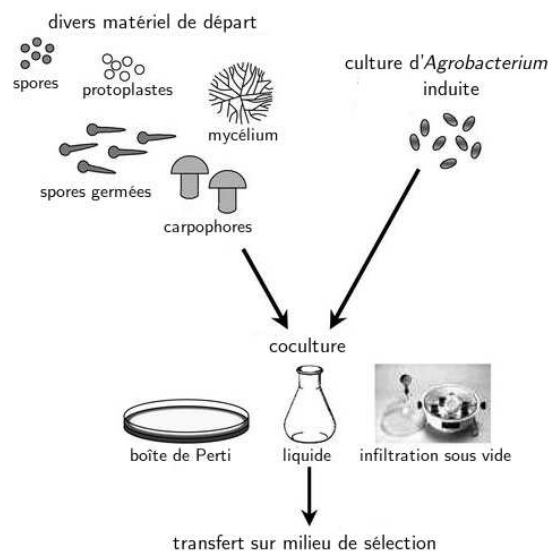


FIG. 3.2 – Schéma du protocole de l'agrotransformation, d'après Michielse *et al.* (2005).

Avantages

L'agrotransformation présente divers avantages par rapports aux autres techniques de transformation discutées avant : comme le montre la figure 3.2, différents matériaux de départ sont possibles pour beaucoup de champignons : spores (germées ou non), mycélium, protoplastes, fructifications et protoplastes, l'étape critique de la production de protoplastes n'est donc pas obligatoire et ne sera plus limitante. D'après Gouka *et al.* (1999), même la recombinaison homologe est possible au cours de l'agrotransformation et peut éviter la présence de gènes marqueurs de sélection. Idnurm *et al.* (2004) ont trouvé que les transformants de *Cryptococcus neoformans* issus de l'agrotransformation sont plus stables que ceux obtenus par biolistique. De Groot *et al.* (1998) postulent que l'agrotransformation est 100 à 1000 fois plus efficace que les autres méthodes de transformation. Des expériences de récupération de l'ADN-T ont permis de montrer que son intégration dans le génome se fait de façon aléatoire, il n'y a pas d'homologie constatable entre les différents sites d'intégration (Mulins *et al.*, 2001).

3.3.2 Mise en œuvre

Pour obtenir des plantes ou des champignons transgéniques il faut mettre en contact direct *i. e.* en coculture les cellules d'*Agrobacterium* et la plante ou le champignon (Fig. 3.2; Casas-Flores *et al.*, 2004). Les deux sont préparés séparément en précultures puis réunis en coculture. De plus, il faut induire le transfert d'ADN par un composé phénolique,

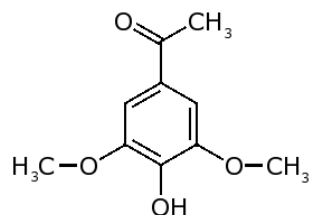


FIG. 3.3 – Formule de l'acétosyringone

couramment la 3,5-diméthoxy-4-hydroxyacétophénone ou acétosyringone (Hanif *et al.*, 2002 ; Fig. 3.3) qui est ajoutée au milieu de coculture. Dans la nature, ce sont des composés phénoliques émanant de blessures de plantes qui induisent le transfert. La nécessité de l'acétosyringone dans le milieu de la préculture bactérienne n'est pas établie (Combiér *et al.*, 2003).

Après la phase de coculture, le matériel fongique est mis sur un milieu de sélection qui permet uniquement aux transformants de pousser. En même temps ce milieu de sélection contient un mélange d'antibiotiques qui permet d'arrêter la croissance des cellules d'*Agrobacterium*.

Les plasmides binaires

Un plasmide binaire contient les éléments suivants (Fig. 3.4) :

- un bord droit et un bord gauche qui sont des répétitions directes imparfaites d'une séquence particulière de 25 paires de bases. Entre ces bords se trouve l'ADN-T comprenant :
 - ★ un marqueur de sélection sous le contrôle d'un promoteur fongique proche du bord gauche, p.ex. un gène de résistance à l'hygromycine qui permet la sélection de tous les clones ayant acquis l'ADN-T. Comme le transfert de l'ADN-T est orienté, c.-à-d. commence au bord droit et se termine par le bord gauche, il est préférable que le marqueur de sélection se trouve près du bord gauche, ainsi les transformants exprimant le gène de résistance contiennent sûrement le transgène qui a été transféré en premier, par contre tous les clones pour lesquels le transfert a avorté ne seront pas résistants et ne seront pas sélectionnés ;
 - ★ un multisite de clonage derrière un promoteur fongique proche du bord droit ;
- des origines de réplication pour *E. coli* et *A. tumefaciens* ;
- un marqueur de sélection bactérien, utilisable dans *E. coli* (au cours des étapes d'assemblage du transgène) et dans *A. tumefaciens*.

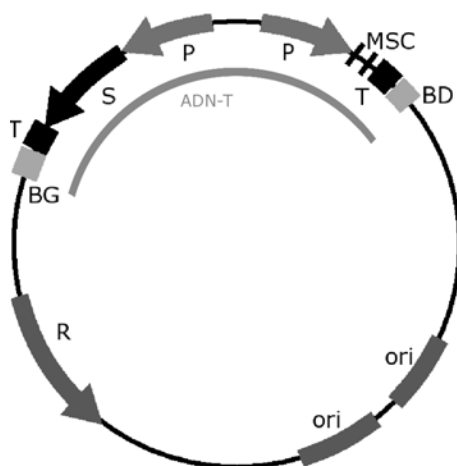


FIG. 3.4 – Carte schématique d'un plasmide binaire : promoteur (P), multisite de clonage (MSC), terminateur (T), bord gauche (BG), bord droit (BD), marqueur de sélection (S), origine de réplication (ori), résistance (R).

3.3.3 Génétique de la virulence

La virulence et donc le transfert d'ADN n'étant possible qu'en présence d'un composé phénolique comme l'acétosyringone, les mécanismes impliqués dans le transfert commencent par la perception de ces substances dans le milieu extérieur. C'est la protéine VirA de la membrane interne associée à la protéine ChvE (codée par le chromosome bactérien) qui sont activées par l'acétosyringone (Cangelosi *et al.*, 1990) : il y a auto-phosphorylation de VirA, ensuite le résidu phosphate est transféré à la protéine VirG qui peut se lier à l'ADN et agit comme activateur transcriptionnel pour elle-même et d'autres gènes impliqués dans la virulence.

Les protéines VirD1 et VirD2 font des coupures dans le brin du bas au niveau des séquences répétées des bords. Il y aurait alors synthèse d'ADN à partir du 3'OH libre de la coupure dans le bord droit, jusqu'à la séquence répétée du bord gauche, ce qui entraîne la libération d'un ADN simple brin. La protéine VirD2 reste covalamment liée à l'extrémité 5' de l'ADN-T (Fig. 3.5 et 3.6).

Le transfert de l'ADN-T se fait par un mécanisme de sécrétion de type IV apparenté à celui de la formation du pilus au cours de la conjugaison bactérienne. Les protéines de la famille VirB forment un pore de transport et une structure appelée pilus T constituée de piline T (dérivant de VirB2; Christie 1997; Kado, 2000). VirD4 de la membrane interne sert d'intermédiaire pour l'interaction entre l'ADN-T et le complexe VirB. Le système transporte en même temps les protéines VirE2, VirE3 et VirF dans la cellule hôte (Vergunst *et al.*, 2000).

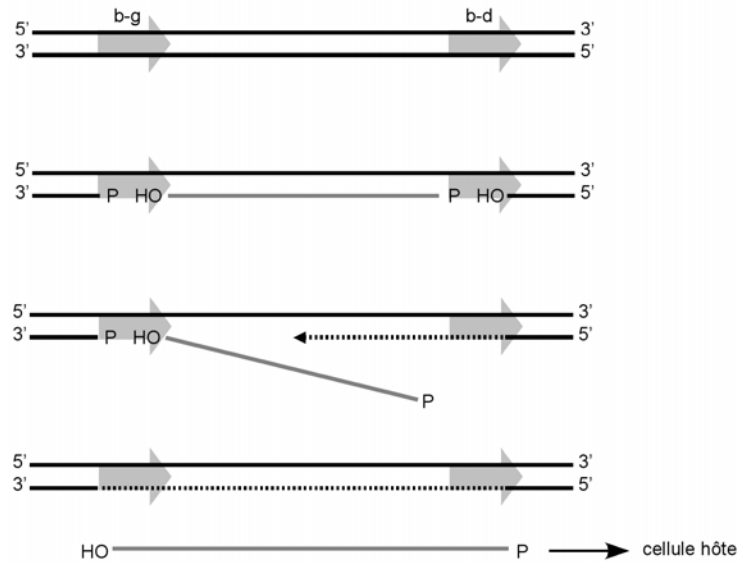


FIG. 3.5 – Mécanisme de la production de l'ADN-T.

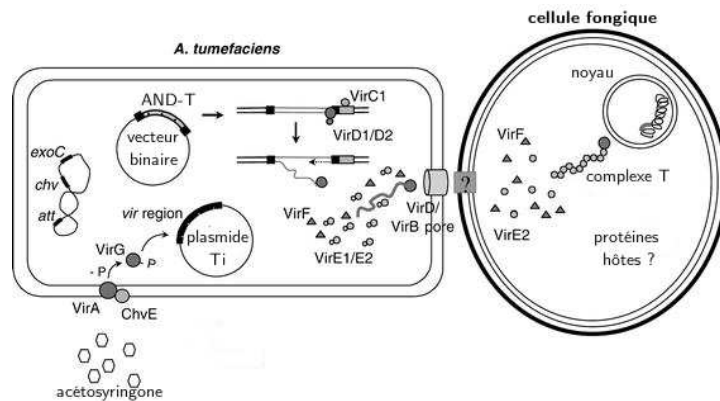
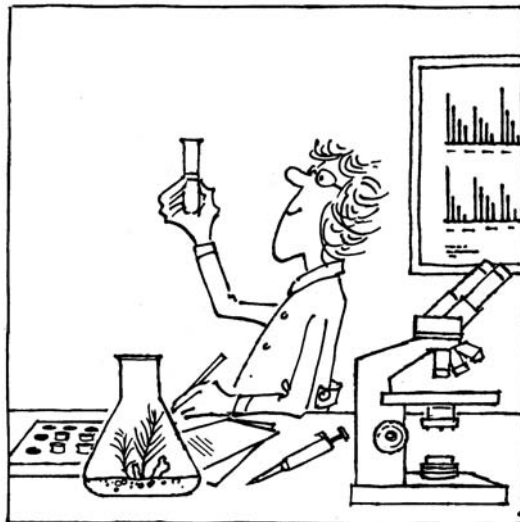


FIG. 3.6 – Transfert d'ADN entre *Agrobacterium* et la cellule fongique, d'après Michiels *et al.*, 2005.

Arrivé dans l'hôte, l'ADN-T serait entouré de molécules VirE2 qui le protégeraient contre les nucléases de l'hôte et le maintiendraient linéaire pour faciliter le passage des pores nucléaires (Citovsky *et al.*, 1989). VirD2 contient une séquence de localisation nucléaire. Une fois arrivé dans le noyau, l'ADN-T peut s'intégrer, apparemment au hasard, dans les régions transcriptionnellement actives au sein du génome de l'hôte, par recombinaison ectopique et troncation des bords de l'ADN-T (Bundock et Hooykaas, 1996). On retrouve au sein du génome une ou plusieurs copies, indépendantes ou en tandem, d'ADN-T double brin, qui va être répliqué et se comporter comme tout autre caractère chromosomique.

Deuxième partie

Matériel et méthodes



Chapitre 4

Matériel biologique

4.1 *Hebeloma cylindrosporum*

Hebeloma cylindrosporum est un basidiomycète qui appartient à l'ordre des Agaricales, famille des Cortinariacées. Un homocaryon de type sauvage, h1 (type conjugal sexuel A1B2), descendant du dikaryon Hcl a été utilisé dans cette étude (Debaud et Gay, 1987 ; Fig. 4.1).

L'entretien des souches est assuré par repiquages successifs à partir des souches mères conservées à 25 °C et à l'obscurité. Ces dernières sont cultivées pendant 10 jours sur du milieu N2P2 gélosé, dont la composition est donnée dans le tableau 4.1.



FIG. 4.1 – *Hebeloma cylindrosporum* en culture *in vitro* (Debaud et Gay, 1990).

N2P2	
CaCl ₂	50 mg/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	150 mg/l
Na ₂ HPO ₄	160 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	250 mg/l
KH ₂ PO ₄	250 mg/l
NaH ₂ PO ₄	4,5 mg/l
citrate ferrique	12 mg/l
glucose	2,5 g/l
thiamine	40 µg/l
Kanieltra	100 µl/l
agar	15 g/l
MES pH 5,7	5 g/l

TAB. 4.1 – Composition du milieu N2P2 (Gay, 1990).

4.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sont utilisées. Le tableau 4.2 regroupe ces souches et présente leur fond génétique d'origine et le plasmide Ti qu'elles contiennent. La souche retenue doit être compatible avec le vecteur binaire utilisé pour la transformation. Le milieu de culture d'*A. tumefaciens* est un milieu minimum dont la composition est donnée dans le tableau 4.3.

4.3 *Escherichia coli*

La souche d'*E. coli* utilisée est la souche DH5 α F' : F', *hsdR17*(r_K⁻m_K⁺), *supE44*, Δ (*lacIZYA-argF*)U169, *deoR*, (Φ 80*dlacD(lacZ)*M15), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Cette souche permet la synthèse d'un grand nombre de copies de plasmides, son taux de transformation est élevé. Elle permet également le criblage blanc-bleu.

Escherichia coli est cultivé à 37 °C soit sur milieu LB gélosé, soit dans du milieu TB liquide sous agitation (la composition des milieux est donnée dans le tableau 4.4).

souche d' <i>Agrobacterium</i>	chromosomique		plasmide Ti	
	fond	g. marq.		g. marq.
LBA1100	TiAch5	rif	pAL1100	spec, strep
LBA4404	C58	rif	pAL4404	spec, strep
GV3101	C58	rif	traité	–
EHA101	C58	rif	pEHA101 (pTiBo542 Δ T-DNA)	kan
AGL1	C58, RecA	rif, carb	pTiBo542 Δ T-DNA	–

TAB. 4.2 – Souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'après Mullins *et al.*, 2000.

At-MM		At-MI	
K ₂ HPO ₄	10,5 g/l	K ₂ HPO ₄	10,5 g/l
KH ₂ PO ₄	4,5 g/l	KH ₂ PO ₄	4,5 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
Na ₃ -citrate, 2H ₂ O	0,5 g/l	Na ₃ -citrate, 2H ₂ O	0,5 g/l
MgSO ₄	0,8 mM	MgSO ₄	0,8 mM
thiamine	0,001‰ (p/v)	thiamine	0,001‰ (p/v)
glucose	0,2% (p/v)	glucose	0,2% (p/v)
		glycérol	0,5% (v/v)
		MES pH 5,3	40 mM
		acétosyringone	200 μM

TAB. 4.3 – Composition des milieux de culture normale (milieu minimum, At-MM) et d'induction (milieu d'induction, At-MI) d'*A. tumefaciens*.

LB (Luria Bertani)		SOC	
Bactotryptone	10 g/l	Bactotryptone	20 g/l
Extrait de levure	5 g/l	Extrait de levure	5 g/l
NaCl	10 g/l	NaCl	10 mM
		KCl	2,5 mM
		MgCl ₂	10 mM
		MgSO ₄	20 mM
		Glucose	20 mM

TAB. 4.4 – Composition des milieux LB et SOC (Sambrook *et al.*, 1989).

Chapitre 5

Méthodes

5.1 Compatibilité entre différentes souches d'*A. tumefaciens* et différents vecteurs binaires.

DIFFÉRENTES souches d'*Agrobacterium tumefaciens* peuvent être utilisées pour réaliser des transformations, mais à condition que le vecteur binaire puisse être sélectionné quand il est porté par la souche en question. En effet, les souches d'*A. tumefaciens* ont des résistances différentes. Les souches listées dans le tableau 4.2 sont testées sur les antibiotiques suivants : ampicilline, céfotaxime, chloramphénicole, gentamycine, kanamycine, rifampicine, spectinomycine, streptomycine et tétracycline.

5.2 Les systèmes de vecteurs binaires utilisés.

5.2.1 pBGgHg

Le plasmide pBGgHg (Chen *et al.*, 2000 ; Fig. 5.1) contient un gène de résistance à l'hygromycine et le gène de l'EGFP, les deux sont sous le contrôle du promoteur de la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase d'*Agaricus bisporus* et se terminent par le terminateur ARNr 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). De plus, il porte en dehors de l'ADN-T, une résistance à la kanamycine pour la sélection dans les cellules bactériennes. Pour l'utiliser en tant que vecteur d'expression, il faut remplacer le cadre de lecture EGFP par le fragment d'intérêt en digérant par *Nco* I (ou *Asp* I ou *Age* I) et *Not* I, les seules enzymes permettant de préserver le reste du plasmide. S'il y a incompatibilité entre les sites de restrictions disponibles, il est possible de remplacer toute la cassette promoteur-gène-terminateur en l'excisant avec *Eco*R I et *Sal* I et en réintroduisant une cassette promoteur-gène-terminateur assemblée dans le vecteur pUC20. Le sous-clonage

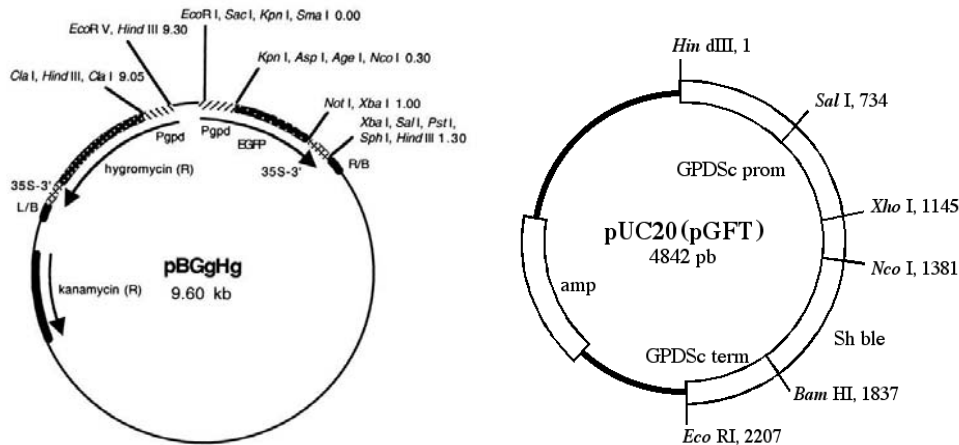


FIG. 5.1 – Cartes des plasmides pBGgHg (Chen *et al.*, 2000) et pUC20.

du fragment dans pUC20 (Calmels *et al.*, 1991 ; Fig. 5.1) se fait alors grâce aux sites de restriction *Nco* I et *Bam*H I.

5.2.2 pBIN+

Le plasmide pBIN+ (van Engelen *et al.*, 1995) est un vecteur binaire qui dérive du vecteur pBIN19 (Bevan, 1984) dans lequel le fragment entre les bords gauche et droit a été retourné afin de permettre au gène à cloner de se situer du côté du bord droit et dont le multisite de clonage a été agrandi. S'agissant d'un vecteur produit pour la transformation de plantes, il contient le marqueur de sélection NPTII qui est le gène de la néomycine phosphotransférase et qui est sous le contrôle de Pnos, le promoteur de la nopaline synthase, le terminateur (Tnos) provient également de la nopaline synthase. De plus, il porte en dehors de l'ADN-T, une résistance à la kanamycine pour la sélection dans les cellules bactériennes. Comme le marqueur de sélection est potentiellement inefficace dans des cellules fongiques, il faut en introduire un autre provenant du vecteur pSGHT (Pardo, communication personnelle).

5.2.3 pFAT3

Le système pFAT3 (Fitzgerald *et al.*, 2003 ; Fig. 5.2) est basé sur deux vecteurs. Le premier est le vecteur pSK+ contenant le promoteur An p-gpd d'*Aspergillus nidulans* ainsi que le terminateur Gc gpd 3 de *Glomerella cingulata* et appelé pSK-GPD. Le fragment à cloner peut être introduit en utilisant les sites *Nco* I et *Bam*H I entre le promoteur et le terminateur. La compatibilité entre les bouts cohésifs fait que le fragment à cloner peut

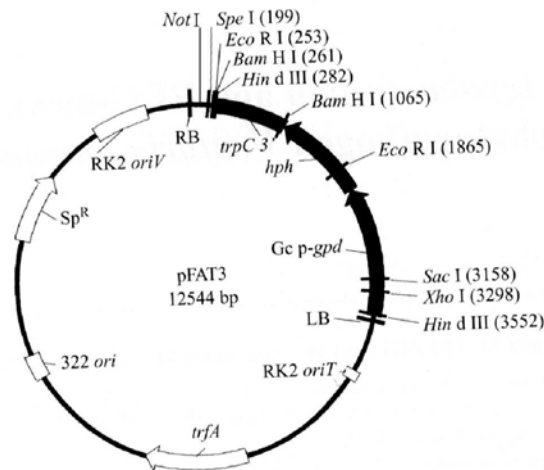


FIG. 5.2 – Carte du plasmide pFAT3 (Fitzgerald *et al.*, 2003).

contenir la séquence de restriction de l'enzyme *Bsp*H I et être digéré par cette enzyme pour le clonage dans le pSK-GPD (sans restitution du site de restriction). L'ensemble comprenant le promoteur, le fragment cloné et le terminateur est récupéré grâce à une digestion enzymatique par *Not* I. Cet ensemble est ensuite cloné dans le vecteur binaire pFAT3, linéarisé par *Not* I et déphosphorylé.

5.3 Agrotransformation d'*H. cylindrosporium*

Les gènes suivants ont été utilisés :

- L'ADNc de la métallothionéine (*PiMt1*) de *Paxillus involutus* (issu d'une banque d'ADNc criblée par un stress au Cd, Jacob *et al.*, 2004 ; n° d'accension AY525379)
- L'ADNc de la thiorédoxine (*PiTrx1*) de *Paxillus involutus* (*ibid.* ; n° d'accension AY525378)
- L'ADNc de *HcZnT1* : un CDF (cation diffusion facilitator) de *Hebeloma cylindrosporium* transportant du zinc (Blaudez, communication personnelle)

La méthode de transformation est basée sur celle publiée par Pardo *et al.* (2002).

5.3.1 Préparation d'*A. tumefaciens* électro-compétent

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* faite à partir d'une culture stockée à -80 °C ou d'une boîte de Pétri fraîche est réalisée pendant une nuit, sous agitation à 30 °C , dans du milieu TB + 0,1% (p/v) glucose. Un volume de 250 ml de TB + 0,1% glucose est inoculé avec 2,5 ml de cette préculture et incubé sous agitation à 30 °C ,



FIG. 5.3 – Explants colorés d'*H. cylindrosporum* âgés de 2 jours sur cellophane.

jusqu'à une $A_{600\text{nm}}$ entre 0,5 et 1. La culture est refroidie dans la glace pendant 15 min et ensuite centrifugée 15 min à 4 °C, à 4000×*g*. Le culot de cellules est lavé 2 fois avec de l'eau stérile froide et une fois dans 10 ml de glycérol 10% (v/v), puis remis en suspension dans 500 à 750 μl de glycérol 70% (v/v) et aliquoté par 50 μl pour être stocké à -80 °C.

5.3.2 Électroporation d'*A. tumefaciens*

L'électroporation se fait avec un volume de 50 μl de cellules compétentes auxquelles sont mélangés 1 à 2 μg de plasmide binaire. Ce mélange subit un choc électrique de 25 μF , 2,5 kV, 200 W et 5 msec. Immédiatement après le choc, 1 ml de milieu SOC est ajouté au mélange. Ce mélange est ensuite incubé 2 heures sous agitation à 30 °C, puis étalé sur milieu LB avec antibiotique (en fonction du vecteur binaire).

5.3.3 Préparation d'*A. tumefaciens* pour la coculture

La souche d'*A. tumefaciens* portant le plasmide binaire est cultivée pendant une nuit sous agitation à 30 °C dans du milieu At-MM + antibiotique. Les cellules sont récupérées et remises en suspension à une $A_{600\text{nm}}$ de 0,5 dans du milieu d'induction (At-MI, Tab. 4.3) + antibiotique pour 6h de culture sous agitation à 30 °C. Cette culture sera étalée sur les colonies fongiques.

5.3.4 Préparation d'*H. cylindrosporum* pour la coculture

Les hypes utilisées pour la transformation doivent être les plus jeunes possibles. À partir de cultures d'*H. cylindrosporum* âgées d'une dizaine de jours sont prélevés des explants de diamètre 1 mm, à l'aide d'une pipette Pasteur. Ceux-ci sont cultivés pendant 48 heures sur cellophane, déposé sur du milieu N2P2 (Fig. 5.3). Les cellophanes ont été

traitées avant l'autoclavage en les mettant à bouillir pendant 10 min dans une solution d'EDTA 10mM.

5.3.5 Coculture d'*H. cylindrosporum* et d'*A. tumefaciens*

Les cultures d'*H. cylindrosporum* sont transférées avec la cellophane sur du milieu N2P2 d'induction et elles sont recouvertes de gouttes de culture d'*A. tumefaciens* dans du milieu At-MI. Cette coculture est incubée pendant 3 jours à 24 °C. Le milieu N2P2 d'induction correspond au milieu N2P2 normal (Tab. 4.1) mais avec 2 g/l de glucose (au lieu de 2,5 g/l) et avec 0,5% (v/v) de glycérol et 200 μ M d'acétosyringone.

5.3.6 Sélection des transformants

Les colonies fongiques issues de la coculture sont transférées sur du milieu N2P2 de sélection et placées une nuit à 4 °C puis incubés à 24 °C. À partir du dixième jour après la mise sur milieu de sélection, les transformants peuvent être repiqués sur du milieu de sélection frais. Les transformants ainsi recueillis sont repiqués toutes les semaines sur du milieu de sélection frais afin de confirmer la stabilité de la transformation. Le milieu N2P2 d'induction correspond au milieu N2P2 normal (Tab. 4.1) additionné de 200 μ g/ml d'hygromycine et d'un mélange d'antibiotiques (ampicilline, céfotaxime, kanamycine, spectinomycine).

5.4 Clonage

Trois μ g du plasmide utilisé sont mélangés à une ou deux enzymes de restriction à raison d'une unité d'enzyme par μ g d'ADN et incubé pendant 2 heures à 37 °C. Si la digestion se fait par une seule enzyme, le plasmide digéré est déphosphorylé par la suite avec 1 unité de phosphatase par μ g de plasmide pendant 1 heure à 37 °C. Les fragments de PCR sont traités de la même manière, sauf qu'il n'y a jamais de déphosphorylation.

5.4.1 Ligation

La ligation de fragments d'ADN avec des extrémités du vecteur linéarisé est réalisée en présence de l'ADN ligase du phage T4 d'*E. coli*. Cette enzyme catalyse la formation de ponts phospho-diester entre les extrémités 3'OH du vecteur et les extrémités 5'P de l'insert.

Les ligations sont généralement effectuées avec un rapport molaire insert/vecteur = 3/1. La quantité d'insert requise est alors calculée à partir de la formule suivante :

$$\frac{\text{taille (kpb)} \cdot \text{ng de vecteur}}{\text{taille (kpb)}} \times \text{ratio molaire} \frac{\text{insert}}{\text{vecteur}} = \text{ng d'insert}$$

La ligation est conduite à 20 °C pendant 16 h dans un volume final de 10 µl contenant 50 à 100 ng de vecteur, la quantité d'insert calculée, 1 U de T4 ADN ligase dans le tampon de réaction préconisé par le fournisseur.

5.4.2 Transformation d'*Escherichia coli* par choc thermique

La transformation d'*Escherichia coli* DH5α se fait par choc thermique. Après décongélation dans la glace l'ADN (plasmide ou mélange de ligation) est mélangé à la suspension de cellules. Ensuite ce mélange est incubé 45 sec à 42 °C, puis immédiatement refroidi dans la glace, ensuite 600 µl de milieu SOC sont ajoutés. Après une heure de culture sous agitation à 37 °C les cellules sont étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB et de l'antibiotique.

Vérification de la présence et de l'orientation des fragments à cloner

Pour repérer les clones bactériens ayant intégré le fragment cloné, une PCR sur colonie est réalisée : une colonie bactérienne est mise en suspension dans le mélange réactionnel de la PCR contenant les amorces ayant servi à produire le fragment. Pour vérifier l'orientation du clonage d'un fragment cloné grâce à un seul site de restriction, l'amorce pSK-GDP-f qui peut s'hybrider avec la fin du promoteur An p-gpd contenu dans le plasmide pSK-GPD est utilisée au lieu de l'amorce "start" du clonage.

5.5 Extraction des acides nucléiques

5.5.1 Prélèvement et broyage du matériel fongique

Les explants des cultures de champignon sur cellophane sont excisés et le mycélium est placé dans un tube de broyage (Eppendorff) et plongé immédiatement dans l'azote liquide. Ainsi congelés les cultures peuvent être conservées à -80 °C.

Le broyage se fait à l'état congelé par des billes carbure de tungstène (Qiagen) dans un broyeur (Retsch) pendant 2 min à une fréquence de 30 s⁻¹ ce qui réduit le mycélium

en poudre fine. S'il s'agit d'une extraction d'ARN, les billes et le matériel de prélèvement sont traités préalablement dans une solution de NaOH 2 M pendant 20 min et rincés 5 fois à l'eau traitée au DEPC.

5.5.2 Extraction de l'ADN génomique au CTAB

1 à 10 mg de champignon broyé sont repris dans du tampon CTAB (100 mM Tris pH 9; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% (p/v) bromure d'hexadecyl-triméthyl-ammonium (CTAB); 0,2% (v/v) β -mercaptoéthanol) contenant 0,3 mg/ml de protéinase K et incubé 30 min à 65 °C. Les protéines sont éliminées par une extraction avec 1 volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1). L'extrait est rincé par une extraction avec 1 volume de chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1). L'ADN dans l'extrait est précipité à l'éthanol et à l'acétate de sodium.

5.5.3 Extraction des ARN totaux d'*H. cylindrosporum*

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen) à partir d'environ 60 mg de mycélium congelé. Les ARN sont repris dans 50 μ l d'eau "RNase free" (traitée au DEPC) avec un rendement moyen de 1 μ g/ μ l, estimé par spectrophotométrie. Les ARN sont dosés grâce à un spectrophotomètre et leur qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 1% (p/v) où les ARNr 25 S et 17 S apparaissent comme deux bandes intenses. La bande correspondant aux ARNr 25 S doit être approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARN 17 S.

5.5.4 Extraction de l'ADN plasmidique d'*E. coli*

La préparation de l'ADN plasmidique est réalisée à l'aide du kit "Quantum Prep Plasmid Miniprep" (Biorad) à partir de 4 ml de culture bactérienne en milieu TB en fin de la phase exponentielle de croissance. Le volume final d'ADN est de 100 μ l avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 1 μ g/ μ l. La qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 1% (p/v) où il doit apparaître sous forme de trois bandes correspondant aux trois formes d'enroulement du plasmide.

5.6 Test de croissance des clones transformés d'*Hebeloma cylindrosporum*.

En premier lieu la résistance de la souche sauvage aux différents stress doit être établie. Pour cela celle-ci est mise en culture sur des concentrations différentes de la substance à tester. Au bout de 6, 8 10 et 12 jours le diamètre de la colonie est mesuré. Les concentrations sont choisies en vue d'obtenir des croissances résiduelles de 50 et 25% ainsi qu'une concentration létale.

5.7 Technique d'amplifications génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction)

5.7.1 Généralités

La technique PCR utilisée est celle décrite par Saiki *et al.* (1985, 1988). Elle repose sur la capacité de synthèse d'un fragment d'ADN déterminé *in vitro* à l'aide d'une polymérase thermostable : la Taq polymérase. Pour catalyser cette synthèse, cette enzyme a besoin d'une amorce : un fragment oligonucléotidique complémentaire à une région de l'ADN à amplifier. Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes : une dénaturation thermique des brins d'ADN matriciel, une hybridation des amorces à leur séquence cible et une élongation à partir des amorces par l'action de la Taq polymérase.

5.7.2 Les amorces nucléotidiques

La spécificité de la réaction PCR repose sur la spécificité de l'hybridation entre les amorces oligonucléotidiques et leur séquence cible sur l'ADN matriciel. Pour cela, différents critères ont été définis dans le choix des amorces : une longueur minimale en dessous de laquelle l'hybridation n'est plus fiable (20 nucléotides); une absence de complémentarité entre les amorces; un T_m théorique proche pour que la température d'hybridation choisie soit adéquate pour les 2 amorces. Le T_m est la température de fusion qui correspond à la température pour laquelle deux brin d'ADN sont associés par 50% de leurs séquences complémentaires. La formule permettant de calculer la valeur du T_m est la suivante : $T_m(^{\circ}C) = 2(A+T) + 4(C+G)$. Le tableau 5.1 donne les séquences des différentes amorces utilisées.

Nom	Séquence
PSK-GDP-f	5'-CAT CCA AGA ACC TCG AGC TTT C-3'
PSK-GDP-r	5'-CTC CAA TGC TCA GCA CAT GG-3'
PiMt-f	5'-ATG AAC ACC ATC ACC TCT GTC C-3'
PiMt-r	5'-TTA GCA CTT GCA TTC ACC AGG-3'
PiMtBam-f	5'-CCC CGG ATC CAT GAA CAC CAT CAC CTC TGT-3'
PiMtBam-r	5'-CCC GGA TCC ATG AAC ACC ATC ACC TCT GT-3'
PiTrxNco	5'-CCC CCC CCA TGG CTC CCG CTG AAG ATA TCA AGT CC-3'
PiTrxBam	5'-GGG GGG GAG TCC TGT ACA CTG TGC TTT GGG GCA TGC-3'
HcZnTBam-f	5'-CCC CGG ATC CAT GAA GAA TAC AAC CAA GAT A-3'
HcZnTBam-r	5'-CCC CGG ATC CTC AAG CTG CAT CGC CGA CCT TTA T-3'
HcZnTm-f	5'-ATT GGC TTG GGA TTG AAT ATC GTC A-3'
HcZnTm-r	5'-TCA CTT TCG CGA GGT CGA GAT GTA T-3'
HPH-f	5'-ATG CCT GAA CTC ACC GCG ACA GTC TGT-3'
HPH-r	5'-CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AGT-3'
GFP-f	5'-ATG AGC AAG GGC GAG GAA CTG TTC-3'
GFP-r	5'-TCA CTT GTA CAG CTC GTC CAT TG-3'
Spec-f	5'-ATG AGG GAA GCG GTG ATC GCC GAA-3'
Spec-r	5'-TTA TTT GCC GAC TAC CTT GGT GAT-3'

TAB. 5.1 – Séquences des amorces nucléotidiques utilisées.

5.7.3 Composition de l'essai

La composition de l'essai pour un volume réactionnel de 25 μ l est la suivante : 0,5 à 2 ng d'ADN plasmidique respectivement 20 à 40 ng d'ADN génomique sont mis au contact de 0,2 μ M de chaque amorce nucléotidique et de 200 μ M de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP). La composition du tampon de réaction est 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ et 0,001% gélatine, lorsque l'enzyme utilisée est l'ADN polymérase recombinante d'*E. coli* fournie par Sigma et est additionnée à raison de 0,5 U.

Dans le cas où les produits de PCR sont clonés dans un vecteur en vue de la sur-expression, l'“Advantage 2 Polymerase Mix” sera préférée à l'ADN polymérase fournie par Sigma. L'“Advantage 2 Polymerase Mix” est un mélange de deux ADN polymérases commercialisé par Clontech qui permet d'amplifier de longs fragments d'ADN avec une grande fidélité. Elle est fournie en solution concentrée 50 fois et fonctionne dans son tampon de réaction dont la composition est la suivante : 40 mM Tricine-KOH pH 8,7; 15 mM KOAc; 3,5 mM Mg(OAc)₂; 3,75 μ g/ml SAB; 0,005% Tween-20 et 0,005% Nonidet-P40.

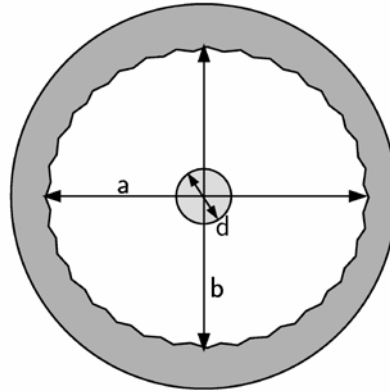


FIG. 5.4 – Mesure de la croissance radiale x : $x = \frac{a+b-d}{2}$

5.7.4 Conditions d'amplification

L'amplification est réalisée dans un appareil automatisé (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Les conditions de dénaturation sont de 2 min à 94 °C pour le premier cycle et de 30 sec pour les cycles suivants. Les conditions d'hybridation sont de 45 sec à des températures comprises entre 50 et 55 °C, cette valeur étant fonction des T_m de chaque amorce. Les conditions de d'élongation sont de 1 min pour 1000 pb à amplifier à 72 °C.

5.7.5 Analyse des transcrits par RT-PCR

Entre 300 ng et 1 μ g d'ARN préalablement extraits (§ 5.5.3), sont rétrotranscrits en utilisant le Kit Omniscript (Qiagen) selon le protocole décrit par le fournisseur. Pour un volume réactionnel de 20 μ l, sont ajoutés 2 μ l d'oligo-dT₁₈ (10 μ M), 2 μ l de dNTP (5 mM), 5 μ l de tampon 10 \times et 1 μ l de transcriptase inverse (4 U/ μ l). La réaction se déroule à 37 °C pendant une heure. Un volume de 1,5 μ l d'ADNc ainsi produits sont amplifiés par PCR.

5.8 Mesures de la croissance d'*H. cylindrosporium*

S'il n'est pas précisé différemment, la mesure de croissance se fait de la manière suivante : un explant de diamètre 9 mm pris dans une zone jeune de la culture mère est placé sur la boîte de Pétri. Après incubation à l'obscurité et à 24 °C, le diamètre de la colonie est mesuré deux fois par colonie (décalé de 90°), de la moyenne de ces valeurs est soustrait le diamètre de l'explant initial et la valeur est divisée par deux. Ceci donne alors la croissance en millimètres de la frange de mycélium qui a poussé (Fig. 5.4).

Pour déterminer la biomasse fraîche produite, les colonies sont cultivées sur cellophane. À la mesure l'explant est retiré et le mycélium est pesé. La détermination de la masse sèche est sans intérêt, comme aux fortes concentrations en métaux dans le milieu, la croissance est tellement réduite que la masse sèche devient indéterminable.

Troisième partie

Résultats et discussion



Chapitre 6

Résultats

6.1 Préliminaire : Croissance d'*Hebeloma cylindrosporum* sur différents métaux

A_{FIN} d'évaluer la croissance possible à *Hebeloma cylindrosporum* sur différents métaux et à différentes concentrations, des tests ont été réalisés sur Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+} (Fig. 6.1). Ces résultats laissent apparaître que pour *H. cylindrosporum* la toxicité est décroissante de $\text{Ni} < \text{Cd} < \text{Cu} < \text{Zn}$. La diminution de la croissance résiduelle moins rapide à de faibles concentrations en métal surtout visible pour le cuivre et le nickel peut être due à la capacité de chélation extracellulaire du mycélium. Pour avoir environ un quart de croissance résiduelle il faut utiliser les concentrations suivantes :

$$[\text{Ni}^{2+}]_{1/4} = 0,05 \text{ mM}$$

$$[\text{Cd}^{2+}]_{1/4} = 0,15 \text{ mM}$$

$$[\text{Cu}^{2+}]_{1/4} = 0,6 \text{ mM}$$

$$[\text{Zn}^{2+}]_{1/4} = 2,5 \text{ mM}$$

Il ne serait pourtant pas judicieux de donner une portée trop grande à ces constatations, en effet, beaucoup de mesures de ce genre ont déjà été réalisées dans différentes études et font apparaître de fortes variations quant aux effets des métaux. Souvent les résultats ne sont pas comparables d'une étude à l'autre car un ou plusieurs paramètres ne sont pas identiques ou les grandeurs mesurées ne sont les mêmes. Blaudez *et al.* (2000) ont montré de fortes variations pour différents isolats d'une même espèce fongique. Ainsi le but de mesures exposées ici est principalement d'avoir une référence pour les conditions et la souche utilisée dans la suite des expériences.

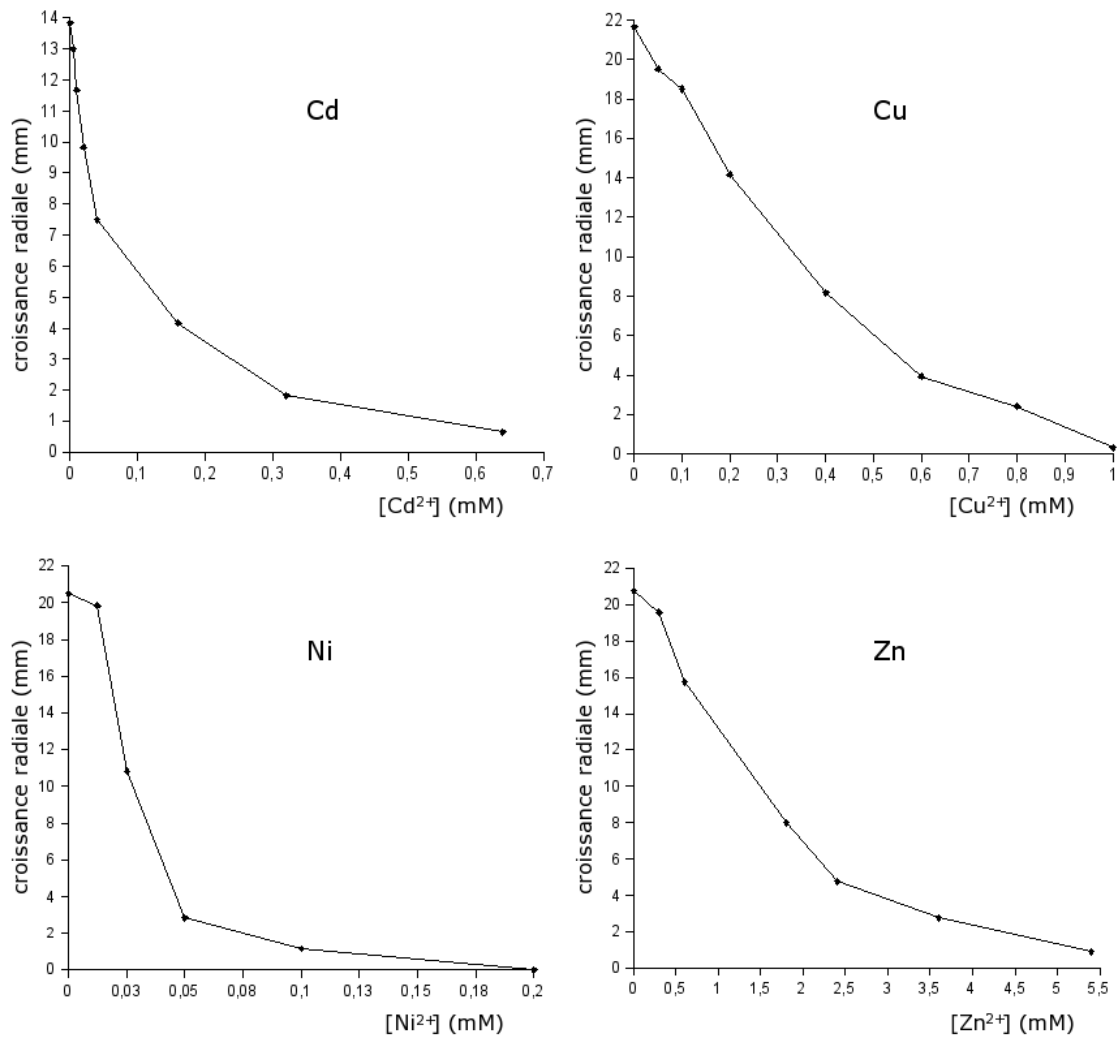


FIG. 6.1 – Croissance radiale d'*H. cylindrosporium* en fonction de la concentration de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} dans le milieu N2P2.

6.2 Utilisation du plasmide pBGgHg

Le plasmide binaire pBGgHg (Chen *et al.*, 2000) donne des transformants s'il est utilisé sous forme native dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Ces transformants contiennent à la fois le gène de résistance à l'hygromycine et celui de la GFP, tandis que celui de la résistance à la spectinomycine n'est plus présent (Fig. 6.2). On s'aperçoit que tous les clones portant le gène *hph* ne portent pas le gène *gfp* et cela malgré le fait que *gfp* se trouve près du bord droit de l'ADN-T et *hph* près du bord gauche. Ainsi, on voit que l'intégration de l'ADN-T n'est pas toujours totalement correcte. Comme la sélection se fait sur hygromycine, les clones qui ont uniquement intégré le gène *gfp* ne peuvent pas être trouvés. On peut néanmoins estimer que le taux de faux positifs serait plus élevé si

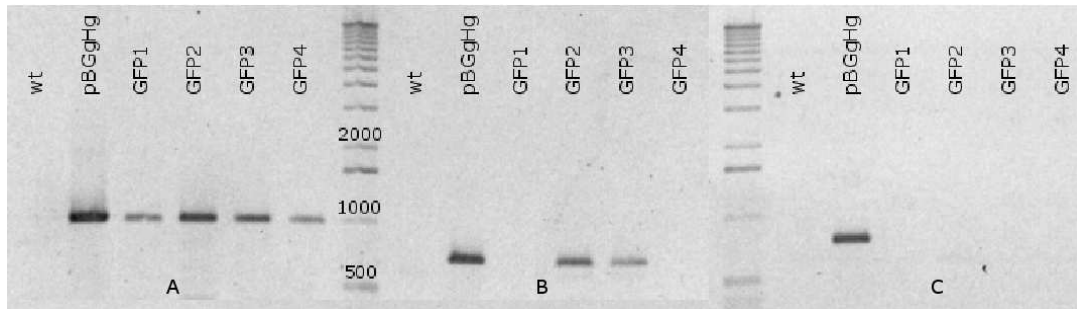


FIG. 6.2 – Amplification sur ADN génomique des gènes *hph* (A), *gfp* (B) et spectinomycine (C), sur le champignon sauvage (wt), le plasmide pBGgHg et 4 transformants.

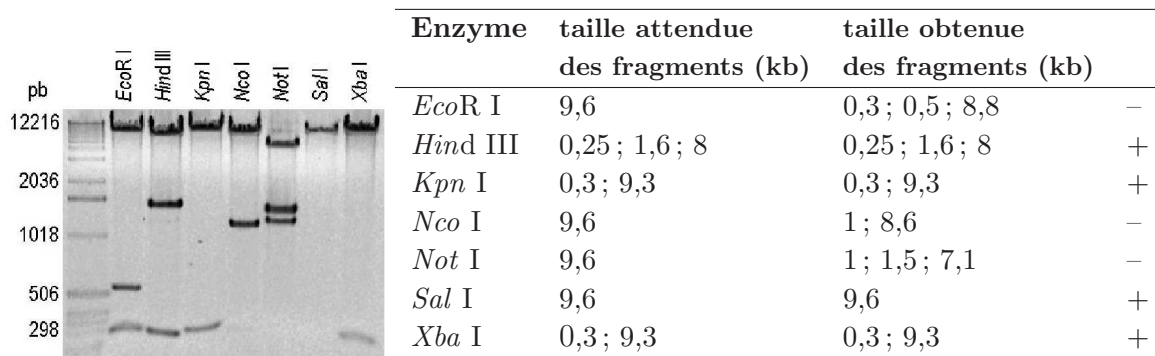


FIG. 6.3 – Digestion du plasmide pBGgHg par différentes enzymes de restriction.

les positions de *hph* et *gfp* étaient inversées sur le plasmide binaire. La visualisation de la GFP au niveau protéique n'a pas été possible, pour celle-ci il faudrait des conditions de culture et d'observation spécifiques à mettre au point pour assurer l'expression et la stabilité optimales de la protéine fluorescente.

L'utilisation du vecteur pBGgHg pour réaliser des constructions contenant en lieu et place de la GFP un autre gène s'est avérée impossible. En effet, la digestion par les endonucléases de restriction indiquées sur la carte publiée du plasmide par Chen *et al.* (2000) ne donne pas les profils de digestion attendus et rend donc le plasmide impropre à l'utilisation comme point de départ pour la construction de plasmides dérivés (Fig. 6.3). Ceci est, d'une certaine manière, corroboré par la littérature qui, jusqu'à présent, relate uniquement l'utilisation de pBGgHg natif (Hanif *et al.*, 2002 ; Combier *et al.*, 2003 ; Grimaldi *et al.*, 2005) et jamais comme point de départ pour d'autres constructions.

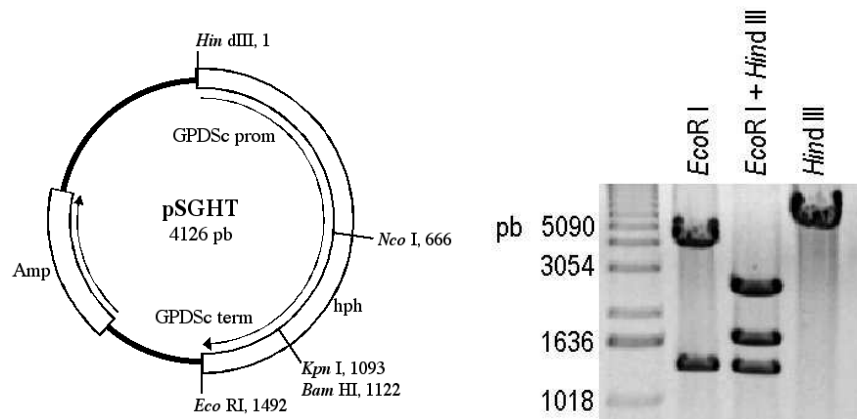


FIG. 6.4 – Digestion du plasmide pSGHT par les enzymes de restriction *Eco*R1 et *Hind*III.

6.3 Utilisation du plasmide pBIN+

L'utilisation du plasmide pBIN+ (van Engelen *et al.*, 1995) nécessitait l'intégration dans ce vecteur d'un fragment *Hin* dIII – *Eco* RI issu du vecteur pSGHT contenant le marqueur de sélection *hph*. Il s'est avéré qu'il n'était pas possible d'exciser correctement le fragment *hph* avec les enzymes indiquées sur la carte de restriction (Fig. 6.4). Ainsi l'utilisation du plasmide pBIN+ pour des clonages subséquents était impossible.

6.4 Utilisation du plasmide pFAT3

La combinaison des deux vecteurs pSK-GPD et pFAT3 (Fitzgerald *et al.*, 2003, Fig. 5.2) avec des clonages successifs dans le vecteur pSK-GPD pour l'obtention d'une cassette promoteur – ORF – terminateur puis le clonage de cette cassette dans le plasmide binaire pFAT3 a permis d'obtenir les gènes souhaités dans un vecteur binaire. Ainsi le transporteur *HcZnT1* d'*H. cylindrosporium* ainsi qu'une thiorédoxine *PiTrx* et une métallothionéine *PiMt1* de *Paxillus involutus* ont pu être clonés et des transformants ont pu être récupérés. Ce système est donc utilisable, bien que sa mise en œuvre nécessite un double clonage car les uniques sites de restriction utilisables pour placer l'ORF choisie entre promoteur et terminateur se retrouvent aussi sur le plasmide ce qui rend impossible un clonage direct dans le vecteur pFAT3.

L'utilisation du système pSK-GDP/pFAT3 et de la souche EHA110 d'*Agrobacterium tumefaciens* permet d'obtenir une vingtaine de transformants (*i. e.* clones résistants à l'hygromycine) à partir d'une centaine de colonies de départ. Ces transformants mettent au moins dix jours pour apparaître sur le milieu contenant l'hygromycine. Des transfor-

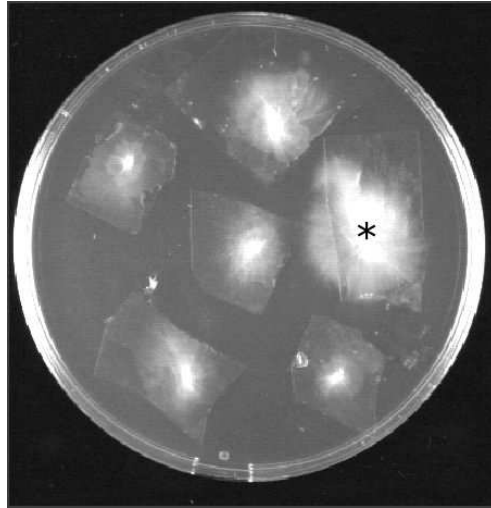


FIG. 6.5 – Colonies fongiques après agrotransformation, * colonie transformée poussant sur le milieu de sélection.

mants peuvent pourtant apparaître encore un mois après le transfert, probablement en fonction de l'endroit de la colonie où la transformation a eu lieu (la transformation ne peut pas avoir lieu seulement sur le milieu de sélection comme celui-ci contient le cocktail d'antibiotiques qui est censé tuer les cellules d'*A. tumefaciens*, par contre si la transformation a eu lieu vers le centre de la colonie, les hyphes résistants mettent plus de temps à apparaître au bord de la colonie). La figure 6.5 montre une colonie de champignon transformé qui parvient à pousser sur le milieu de sélection, elle pousse au delà du bord du morceau de cellophane avec lequel elle a été placée sur le milieu de sélection, tandis que les autres colonies restent à la taille qu'elles avaient au moment du transfert.

6.5 Analyse des différents transformants

6.5.1 Transporteur de zinc *HcZnT1*

L'ADNc du transporteur de zinc *HcZnT1* d'*H. cylindrosporum*, appartenant à la famille des *cation diffusion facilitator*, cloné dans le vecteur pFAT3 a permis d'obtenir 25 transformants stables à partir de 108 colonies fongiques. L'amplification par PCR avec les amorces HcZnTBam-f et HcZnTBam-r sur de l'ADN génomique permet de différencier la présence du transgène du gène endogène qui donne un amplicon de plus grande taille, à cause d'un ou plusieurs introns dans sa séquence. Ainsi, une amplification sur l'ADN génomique donne un profil à deux bandes pour les transformants *HcZnT1* (Fig. 6.6). La détection d'un ARNm spécifique du transgène ne sera par contre pas possible à

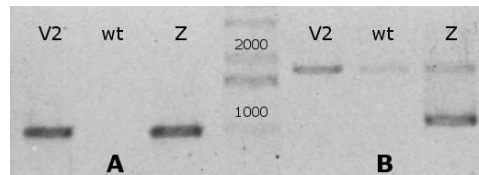


FIG. 6.6 – Amplification sur ADN génomique des gènes *hph* (A) et *cdf* (B) sur le champignon sauvage (wt) et deux transformants : vecteur vide (V2) et *HcZnT1* (Z).

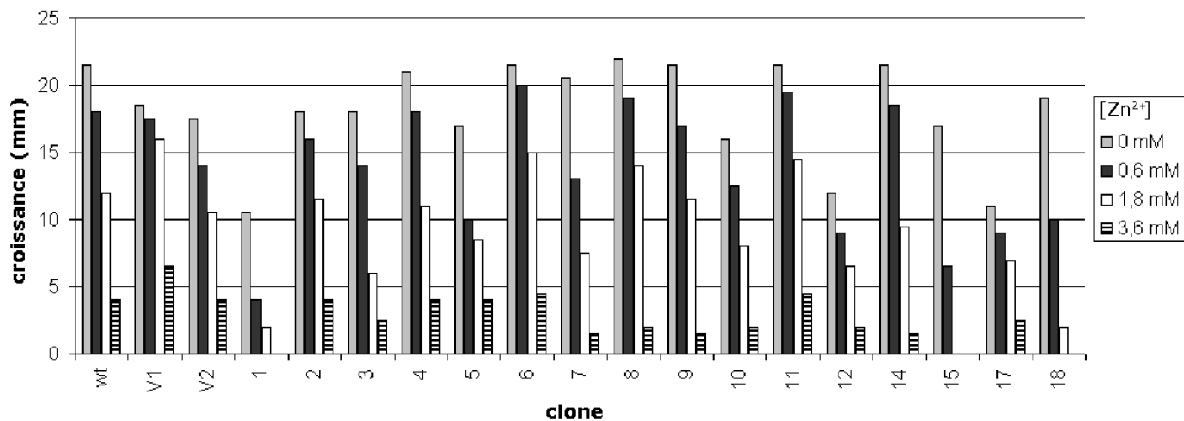


FIG. 6.7 – Croissance de différents clones *HcZnT1* sur 0 ; 0,6 ; 1,8 et 3,6 mM Zn^{2+} .

cause de l'expression simultanée et probablement peu régulée et constitutive (Blaudez, communication personnelle) du gène *HcZnT1* endogène.

Recherche d'un phénotype

La complémentation fonctionnelle avec *HcZnT1* des souches *cot1*Δ et *zrc1*Δ de *Saccharomyces cerevisiae*, toutes les deux mutantes pour un gène de CDF vacuolaire et sensibles au zinc fait réapparaître une croissance normale (Blaudez, communication personnelle). Selon ces résultats, la surexpression du gène *HcZnT1* dans *H. cylindrosporum* pourrait entraîner un phénotype de tolérance accrue face à des concentrations importantes en zinc. La culture des clones transformés d'*H. cylindrosporum* sur différentes concentrations en zinc ne permet pas de constater une croissance différente des clones *HcZnT1* par rapport au sauvage ou des témoins vecteur vide (Fig. 6.7). Ceci peut être dû au fait que le champignon initialement transformé n'est pas un mutant délété mais dispose encore de ses mécanismes de tolérance endogènes. La surexpression de *HcZnT1* n'apporte donc pas de vrai avantage, d'autant plus que cette surexpression est éventuellement relativement faible en termes de taux de transcrits.

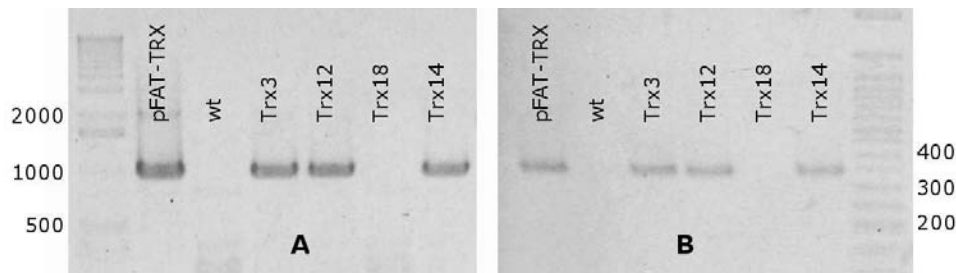


FIG. 6.8 – Amplification sur ADN génomique des gènes *hph* (A) et *PiTrx* (B) sur le plasmide pFAT-TRX, le champignon sauvage (wt) et 4 transformants.

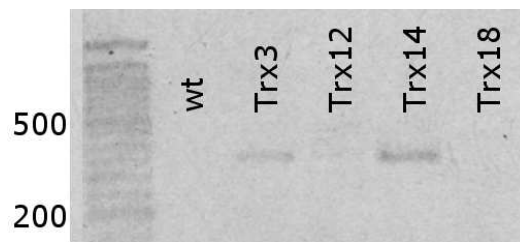


FIG. 6.9 – RT-PCR du gène *PiTrx* sur le champignon sauvage (wt) et 4 transformants.

6.5.2 Thiorédoxine *PiTrx*

La transformation d'*H. cylindrosporium* avec l'ADNc du gène *PiTrx*, une thiorédoxine de *P. involutus* a permis de récolter 28 transformants stables à partir de 91 colonies fongiques mises en coculture. L'analyse de l'ADN génomique de certains clones montre qu'ils ont intégré le transgène (Fig. 6.8). Alors que pour le transgène *HcZnT1* il n'était pas possible de montrer son expression, l'expression hétérologue de *PiTrx* pouvait être montrée par RT-PCR (Fig. 6.9), le(s) gène(s) de thiorédoxine endogène(s) ne sont pas reconnus et c'est donc uniquement le transgène qui est visualisé. De plus il a été montré chez *P. involutus* que la thiorédoxine n'est pas exprimée dans des conditions de culture sans stress oxydatif (Courbot, communication personnelle), comme c'était le cas des cultures utilisées pour l'extraction des ARN en vue de la RT-PCR. Les transcrits visualisés doivent donc correspondre à l'expression constitutive du transgène.

Recherche d'un phénotype

Les gènes *Trx1* et *Trx2* de *S. cerevisiae* protègent la levure contre le stress oxydant (Garrido et Grant, 2002). S'agissant d'*H. cylindrosporium* surexprimant *PiTrx*, un phénotype de croissance résiduelle supérieure à la souche sauvage et au transformant vecteur vide serait donc imaginable sur un milieu provoquant un stress oxydant, *i. e.* favorisant l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène, *p. ex.* OH^{\bullet} (Grant 2001). L'eau

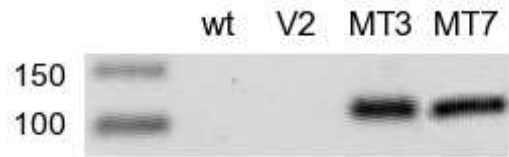


FIG. 6.10 – Amplification sur ADN génomique du gène *PiMt1* sur la souche sauvage (wt), le transformant plasmide vide (V2) et les clones MT3 et MT7.

```

Pi   ATGAACACCATCACCTCTGTCCCCGTCAACTTCAACAACCTGCGGCAGCAACTCCTGCGGCTG
Le   ATGTCCACTACCACCTCAGACTCCCGTTTTCTCAAGCCAACCTGTGGCAGTAGCAGCTGCAGCTG
Ac   ATGTTACCGCCGTCGAAGTCCCTAAGAACTTTGCTGCTTGGCGCTCCAGCTCGTGCAACTG
    ***  ***  *          **                **  ***  *  *  ***  ***

Pi   CGGTTCCCTCCTGCGCCTGCAAGCCTGGTGAATGCAAGTGCTAA
Le   CGGCGACTCCTGCGCCTGCCAGCCTAATGAGTGCAAGTGCTGA
Ac   CGGCGACAGCTGCACCTGCAAGCCTGAGGAGTGCAAGTGCTAA
    ***  *  ****  *****  *****  **  *****  *

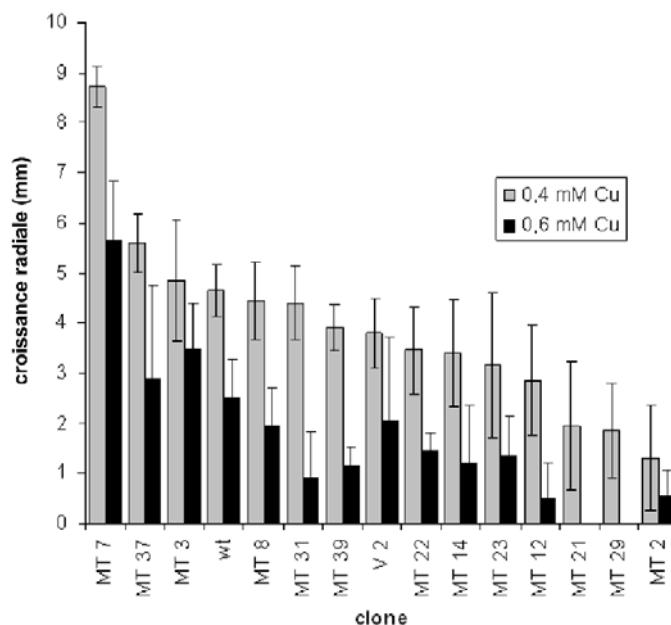
```

FIG. 6.11 – Alignement des séquences d'ADNc de métallothionéines de 3 basidiomycètes : *PiMt1* de *P. involutus* (Pi), de *Lentinula edodes* (Lc, CO501612) et d'*Antrodia cinnamomea* (Ac, DR031991).

oxygénée ainsi que le paraquat (méthylviologen) sont des substances qui induisent un tel stress et une diminution significative de la capacité de croissance du champignon. Pourtant, il n'était pas possible de trouver un phénotype sur les différents milieux pouvant induire un tel stress oxydatif. Ceci peut être dû au promoteur qui est trop faible ou au fait que le champignon possède des mécanismes de défense endogènes qui sont tels que l'expression de *PiTrx* n'apporte pas de protection supplémentaire.

6.5.3 Métallothionéine *PiMt1*

L'ADNc de la métallothionéine *PiMt1* de *P. involutus* clonée dans le plasmide pFAT3 a permis d'obtenir 42 transformants à partir de 233 colonies initiales mises en coculture. La détection du transgène dans le génome des transformants a été réalisée grâce au couple d'amorces PiMt-f/PiMt-r qui amplifient l'ORF de *PiMt1*. Malgré une forte identité potentielle entre *PiMt1* et des séquences de métallothionéines d'*H. cylindrosporum* et donc des amplifications non-spécifiques, il était possible, en choisissant une température d'hybridation assez élevée (65°C) d'amplifier uniquement l'ADNc de *P. involutus* (Fig. 6.10). La figure 6.11 montre la forte conservation de séquence qu'il eut y avoir entre métallothionéines de différentes espèces fongiques basidiomycètes.

FIG. 6.12 – Criblage des transformants *PiMt1* sur cuivre.

Recherche d'un phénotype

Un transformant surexprimant constitutivement une métallothionéine devrait présenter une croissance résiduelle supérieure à la souche sauvage et au transformant vecteur vide s'il est en présence d'une concentration élevée en métaux lourds. La capacité de croissance résiduelle des transformants *PiMt1* a été criblée sur du milieu contenant du cuivre, du zinc, du cadmium ou du nickel. La figure 6.12 montre le résultat du criblage sur 0,4 et 0,6 mM de Cu^{2+} . Il apparaît que de nombreux clones ont une capacité de croissance non significativement différente de de la souche sauvage ou du transformant vecteur vide. Ceci peut être dû au même raisons qui ont déjà été invoquées pour les transformations antérieures : mécanismes endogènes trop efficaces, faiblesse du promoteur ou localisation non-favorable du transgène dans le génome. Mais trois clones MT3, MT7 et MT37 présentent au cours ce criblage préliminaire une meilleure croissance que les souches témoins. Les résultats d'une analyse plus approfondie des clones MT3 et MT7 sont présentés dans la publication se trouvant au § 6.6. Les transformants *PiMt1* ne présentaient pas de phénotype sur Ni^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+} .

6.6 Article soumis :

Induction par des métaux de PiMt1, une métallothioneine du champignon ectomycorhizien Paxillus involutus et son expression hétérologue dans Hebeloma cylindrosporum.

Résumé

- Les métallothioneines sont de petits polypeptides impliqués dans la tolérance aux métaux des plantes. Ici nous avons caractérisé le gène *PiMt1*, une métallothioneine du champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus*.
- L'expression de *PiMt1* dans *P. involutus* en condition de stress métallique a été mesurée par northern blot, le gène a été utilisé pour faire de la complémentation fonctionnelle dans la levure et utilisé pour l'agrotransformation d'*Hebeloma cylindrosporum*.
- *PiMt1* est capable de compléter des souches de levure sensibles au Cd et au Cu, il est régulé positivement dans *P. involutus* sous stress de Cd et Cu et il est capable d'accroître la tolérance au cuivre d'*Hebeloma cylindrosporum*.
- L'étude présente identifie *PiMt1* comme une métallothionéine fongique capable de protéger de champignons contre un stress de Cu.

New Phytologist 174, pp.151-158 (2007)

Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*

Marc Bellion*, Mikael Courbot*, Christophe Jacob, Frédéric Guinet, Damien Blaudez and Michel Chalot
Nancy-University, Research Unit 1136 INRA/UHP 'Tree-microbe Interactions', BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Summary

Author for correspondence:

Michel Chalot

Tel: +33 3-83 68 42 38

Fax: +33 3 83 68 42 92

Email: Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Received: 12 September 2006

Accepted: 14 November 2006

- Metallothioneins are small polypeptides involved in metal tolerance of many eukaryotes. Here we characterized the *Pimt1* gene, coding for a metallothionein from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*.
- Expression of *Pimt1* in *P. involutus* under metal stress conditions was measured by northern blot and RT-PCR analyses. The full-length cDNA was used to perform functional complementation in yeast mutant strains and agrotransformation of *Hebeloma cylindrosporum*.
- Heterologous expression in yeast showed that PiMT1 was able to complement the hypersensitivity of mutant strains to cadmium (Cd) and copper (Cu), but not to zinc (Zn). Transcripts were almost undetectable under control conditions, whereas Cu and Cd, but not Zn, strongly induced *Pimt1* expression in *P. involutus*. Constitutive overexpression of *Pimt1* in *H. cylindrosporum* conferred a higher copper tolerance.
- The present study identified PiMT1 as a potential determinant in the response of mycorrhizal fungi to Cu and Cd stress. Additionally, we demonstrated the usefulness of mycorrhizal fungi transformation using *Agrobacterium* technology to approach gene function.

Key words: agrotransformation of *Hebeloma cylindrosporum*, ectomycorrhizal fungi, metallothioneins, metal tolerance, *Paxillus involutus*, yeast heterologous expression.

New Phytologist (2007) **174**: 151–158

© The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01973.x

Introduction

Like most other organisms, ectomycorrhizal fungi possess a range of molecular mechanisms at the cellular level to tolerate heavy metals (reviewed in Bellion *et al.*, 2006). Cysteine-rich heavy metal-binding peptides, metallothioneins (MTs) and phytochelatins (PCs), are important chelators of metal ions in the cytosol (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Unlike PCs, which are enzymatically synthesized polypeptides, MTs are genome-encoded peptides. They are spread over pro- and eukaryotic kingdoms, but their precise physiological role has

not yet been elucidated. Proposed functions of MTs in eukaryotic cells include metal homeostasis and cellular detoxification of metals. This was demonstrated by overexpression experiments of MTs in various organisms: yeast *CUP1* gene transferred to cauliflower resulted in a 16-fold higher Cd tolerance and accumulation (Hasegawa *et al.*, 1997). Transfer of mouse MT1 or human MT2 to *Nicotiana tabacum* and *Brassica napus* (Misra & Gedamu, 1989; Pan *et al.*, 1994) resulted in a constitutively enhanced Cd tolerance in these plants.

Fungal MTs show highly distinct patterns of constitutive or metal-inducible gene expression. The *Saccharomyces cerevisiae cup1* is specifically regulated by copper, while zinc, cadmium and gold are unable to induce *cup1* (Butt *et al.*, 1984; Okuyama *et al.*, 1999). Induction of MT synthesis led to a binding of

*These authors contributed equally to this work.

excess free Cu ions in the cytosol, and conferred resistance to Cu (Welch *et al.*, 1983; Fogel *et al.*, 1988).

The response of mycorrhizal fungi to toxic metals is of interest in view of their importance in the reclamation of polluted sites and their role in tree growth. As we reported earlier, the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* is particularly tolerant to metal (Blaudez *et al.*, 2000b). We have also demonstrated that *P. involutus* could tightly bind cadmium to cell walls, accumulate Cd within the cytoplasm or in the vacuolar compartment (Blaudez *et al.*, 2000a). We further hypothesized that Cd could induce oxidative stress (Jacob *et al.*, 2001), as already demonstrated for *S. cerevisiae*. There are few reports on MT-like sequences in mycorrhizal fungi, obtained in the course of expressed sequence tag projects. Genes coding for putative MTs have been isolated in the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* (Voiblet *et al.*, 2001) and in the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Gigaspora rosea* (Stommel *et al.*, 2001) [Correction added after online publication 7 February 2007: in the preceding sentence *Glomus intraradices* was corrected to *Gigaspora rosea*]. More recently, the existence of a MT-encoding gene from the AM fungus *Gigaspora margarita* was reported (Lanfranco *et al.*, 2002).

We screened 2040 arrayed cDNAs of *Paxillus involutus* to identify Cd-responsive genes using differential hybridization. Our results suggest that Cd complexation by phenolic compounds or by complexing peptides such as MTs is probably a key determinant of the cellular response to Cd in *P. involutus* (Jacob *et al.*, 2001). In addition, using an improved HPLC method for the simultaneous measurement of thiol-containing compounds from cysteine and its derivatives (γ -glutamylcysteine, glutathione) to higher molecular mass (PCs), we found that glutathione and γ -glutamylcysteine contents increased when *Paxillus involutus* was exposed to Cd. The content of an additional compound with a high molecular mass, most probably related to a MT, increased drastically in mycelia exposed to Cd (Courbot *et al.*, 2004).

Here we report the cloning and characterization of the *Pimt1* gene coding for a MT in *P. involutus*. The full-length cDNA was able to complement the growth deficiency of the *S. cerevisiae* mutant $\Delta yap1$ on Cd as well as the growth deficiency of $\Delta cup2$ on Cu. Abundance of the *Pimt1* transcript increased dramatically during induction by Cu and Cd, but not by Zn. Moreover, using agrotransformation, we were able to generate transgenic strains of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* overexpressing the *Pimt1* gene, conferring increased Cu tolerance.

Materials and Methods

Organisms and culture media

The origin and the growth conditions of the ectomycorrhizal fungi *P. involutus* (Batsch) Fr. (ATCC 200175) and *H. cylindrosporum* (Romagnesi) (strain h1) have been described

by Jacob *et al.* (2001) and Javelle *et al.* (2001), respectively. Classical procedures for manipulating *E. coli* have been described previously (Sambrook & Russell, 2001). For transcriptional induction experiments, *P. involutus* colonies were grown on cellophane-covered agar medium for 10 d and transferred to liquid medium for 24 h (adaptation period). Colonies were further transferred to liquid medium containing various metal concentrations for various lengths of time (see the legend in Fig. 3).

The yeast strains used for heterologous expression of *Pimt1* were *cup2::kanMX4* ($\Delta cup2$) and *zrc1::kanMX4* ($\Delta zrc1$), derived from the wild-type strain BY4741 (*MATa his3 leu2 met15 ura3*), and the strain *yap1::TRP1* ($\Delta yap1$), derived from the wild-type strain W303B (*MATa his3 can1-100 ade2 leu2 trp1 ura3*). Growth was on SD medium (yeast nitrogen-based (YNB) medium without amino acids, with 2% (w/v) galactose or glucose as carbon source and 0.192% yeast synthetic drop-out medium without uracil). Yeast cultures were adjusted to OD = 1.0, and 5 μ l of serial dilutions were spotted on SD medium without extra metal or supplemented with 40 μ M CdCl₂, 150 μ M CuSO₄ or 10 mM ZnCl₂. Plates were incubated for 4 d at 30°C.

Pimt1 cloning and functional expression in yeast

The *Pimt1* cDNA (accession number AY525379) was cloned from a cDNA array experiment (Courbot *et al.*, 2004) and subcloned from the pGEM[®]-T clone into the pYES2 plasmid (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), using MT1 (5'-CCCCAAGCCTT-ATGAACACCATCACCTCTG-3') and MT2 (5'-CTGCA-GAATTCTTAGCACTTGCATTACCAGG-3') primers, introducing *Hind*III and *Eco*RI sites (sites underlined). The pYES2-*Pimt1* construct and the empty vector pYES2 were used to transform the $\Delta yap1$, $\Delta cup2$ and $\Delta zrc1$ strains as described previously (Gietz *et al.*, 1992). The various transformants were selected on SD medium without *ura*. They were further cultured in liquid SD medium before being transferred for 4 d at 30°C onto SD-agar plates supplemented (or not) with CdCl₂, CuSO₄ or ZnCl₂.

The adjacent DNA sequence upstream from *Pimt1* in the *P. involutus* genome was investigated with the Clontech Universal GenomeWalker kit (Clontech Laboratories, Inc., Heidelberg, Germany). Briefly, *P. involutus* genomic DNA was digested with one of four different blunt-end restriction enzymes (provided by the manufacturer). A *Pimt1*-specific primer (MTgw; 5'-TTAGCACTTGCATTACCAGGCTTG-3') was designed and used in combination with the adaptor-specific primer AP1 (and AP2 in a second step) to amplify large genomic segments adjacent to *Pimt1*. PCR products were gel-purified with the Qiagen QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) for sequencing.

DNA and RNA isolation and northern blot analysis

Fungal colonies were fixed in liquid nitrogen. Tissues were ground (Blender RETSCH model MM 300; Qiagen) and

total RNA isolation was performed with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) from approx. 100 mg of frozen mycelia. According to the manufacturer's recommendations, a buffer containing guanidium hydrochloride was used instead of one containing guanidium isothiocyanate, to avoid solidification of samples as a result of secondary metabolites in mycelia of filamentous fungi. DNA removal was achieved by incubating samples with RNase-free DNase (Qiagen) as described by the manufacturer. An average of 800 ng total RNA per mg frozen material was isolated and stored in DEPC-treated water at -70°C until further use. Genomic DNA was obtained from fungal colonies fixed and ground as described above and extracted with the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) from approx. 100 mg of frozen mycelia, according to the manufacturer's recommendations.

Samples of total RNAs (20 μg) were separated on 1.5% w/v formaldehyde agarose gels, transferred to positive nylon membranes (Appligene-Oncor, Illkirch Graffenstaden, France) by capillary elution according to standard procedures (Sambrook & Russell, 2001), and fixed by UV irradiation for 4 min. Membranes were then prehybridized for 2 h at 37°C , as previously described (Jacob *et al.*, 2001). The radioactive probe [α - ^{32}P]dCTP-labeled cDNA *Pimt1* was denatured and added to the prehybridization buffer. After 24 h of incubation with the probe, membranes were subjected to three washes in $2 \times \text{SSC}/0.5\%$ SDS at room temperature for 30 min, followed by one wash in $1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS at 65°C for 40 min. Blots were rehybridized with a 5.8 S rRNA probe to monitor RNA amounts and to ensure equal RNA loading. Autoradiographs were analyzed by densitometric scanning using the Molecular Analyst computer software Quantity one (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Agrotransformation of *H. cylindrosporum* with *Pimt1* cDNA

The *Pimt1* cDNA was PCR-amplified using the primers PiMtBamF 5'-CCCGGATCCATGAACACCATCACCTCTGT-3' and PiMtBamR 5'-CCCGGATCCTTAGCACTTGCAATTCACCA-3' and subcloned from the pGEM[®]-T clone into the *Bam*HI-digested pSK-GPD plasmid (Fitzgerald *et al.*, 2003). The *Pimt1* cDNA was thus under the control of the *Aspergillus nidulans gpd*-promoter and the *Glomerella cingulata gpd*-terminator. The promoter/*Pimt1*/terminator cassette was *Not*I excised and subcloned into the pFAT3 binary plasmid (Fitzgerald *et al.*, 2003) to obtain the pFAT3-*Pimt1* construction, which was further used to transform the *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101. Transformation of cells with the empty vector (EV) pFAT3 containing the *hph* gene within the T-DNA region was also performed, to obtain a control transgenic strain, named the EV strain.

A. tumefaciens-mediated transformation of *H. cylindrosporum* was carried out as described previously (Pardo *et al.*, 2002). Briefly, fungal colonies were grown from 2 mm agar plugs on

cellophane membranes on N_2P_2 medium (Gay, 1990) at 22°C in the dark for 2 d and then transferred to N_2P_2 -induction plates (N_2P_2 medium with lower sugar content (glucose 2 g l^{-1} as the sole carbon source) supplemented with 40 mM MES at pH 5.3, 0.5% glycerol and 200 μM acetosyringone). The colonies were then inoculated with 50 ml of an induced *A. tumefaciens* culture prepared according to Pardo *et al.* (2002). The cocultivation plates were incubated at 22°C for 3 d in the dark; cellophane membranes containing the fungal colonies were transferred to new plates containing the selection medium (N_2P_2 medium supplemented by 100 mg l^{-1} chloramphenicol, 100 mg l^{-1} gentamycin and 12.5 mg l^{-1} tetracycline for killing *A. tumefaciens* cells, and 200 mg l^{-1} hygromycin B for selection of *H. cylindrosporum* transformants) and kept at 22°C for 10 d in the dark. Resistant colonies were individually harvested and isolated for vegetative propagation in N_2P_2 medium containing 200 mg l^{-1} hygromycin B.

PCR amplification from *H. cylindrosporum* colonies

PCR amplifications were done on cDNA obtained through reverse transcription of 500 ng RNA for 60 min at 37°C (Qiagen Omniscript RT Kit), using the primers PiMt-f (5'-ATGAACACCATCACCTCTGTCC-3') and PiMt-r (5'-TTAGCACTTGCAATTCACCAGG-3') for *Pimt1*, and *hph*-f (5'-ATGCCTGAACTCACCGCGACAGTCTGT-3') and *hph*-r (5'-CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT-3') for the hygromycin resistance gene. The RT products were amplified by PCR under the following conditions: 94°C for 2 min followed by 32 cycles for *hph* and *Pimt1* at 94°C for 30 s, 65°C for 45 s and 72°C for 1 min using an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France). For PCR amplification on genomic DNA, similar amplification conditions were used on extracted genomic DNA, except that 40 cycles were used.

Phenotype screening for *H. cylindrosporum* overexpressors

To screen for a phenotype, experiments were performed in which the transformed clones were grown on solid cellophane covered medium containing different metal concentrations. The concentration ranges of metals used were 0.05–1.0 mM, 0.01–0.6 mM and 0.5–5.5 mM for CuSO_4 , CdCl_2 and ZnCl_2 , respectively. Radial growth and fresh weight were recorded after 14 d of growth.

Results

Cloning and sequence analysis of *Pimt1*

The *Pimt1* cDNA encodes a 34-amino-acid protein (3.42 kDa) with a predicted pI of 7.6. All but one of the cysteine residues are part of the characteristic MT motif C-X-C and *P. involutus* MT1 contains only one domain bearing three C-X-C motifs

```

PiMT1      MNTITSVPVNFNNCGSNSCGCGSSCAKCPG-----EKKC-----
A. bisporus 1  MPATTCASKCGEA-CACANNCCCSNNE---VPKNQ-HCGMSSCGCGDS
A. bisporus 2  MPATMCTFKCGEA-CACTNNGCQRKDNNSSTVPENHGHCGIDGQN---
U. fabae      MNPCSSN-CSCGASCTCS-----GSSHKK-----
A. cinnamomea MFTAVEVPKNFAACGSSSCGSGDSCTCKPE-----EKKC-----
L. edodes    MSTTTQTFPVSOANGSSSCGSGDSCACQFN-----EKKC-----
    
```

Fig. 1 Multiple alignment of fungal metallothionein protein sequences. Fully conserved and partially conserved cysteine residues are written in black and gray boxes, respectively. Accession numbers are as follows: PiMT1, AAS19463; *Agaricus bisporus* 1, CAC85298; *Agaricus bisporus* 2, CAC85299; *Uromyces fabae*, AAB39879; *Antrodia cinnamomea*, DR031991; *Lentinula edodes*, CO501612.

(Fig. 1), as found for other fungal MTs. The size of the polypeptide and the proportion of cysteine (seven conserved cysteine residues, representing 20.7% of the total amino acid content of the peptide) indicate that PiMT1 could be assigned to subfamily f1 of fungal MTs (Binz & Kägi, 1999). However, the sequence pattern (C-G-C-S-x(4)-C-x-C-x(3,4)-C-x-C-S-x-C), which identified the members of this subfamily, does not exactly match the PiMT1 sequence. PiMT1 is most closely related to MT-like polypeptides from *Agaricus bisporus*, *Uromyces fabae* and two translated cDNA sequences from *Antrodia cinnamomea* and *Lentinula edodes* (Fig. 1). It shares only 21.5% identity with MT1 from the AM fungus *G. margarita* (Lanfranco *et al.*, 2002), with 13 identical amino acids.

Genome walking experiments allowed us to isolate a fragment of 0.8 kb upstream from the start codon of *Pimt1*. Interestingly, a MRE (metal responsive element) motif was found at position -695 relative to the first nucleotide of the ORE. The MRE consists of a conserved 7 bp core sequence (5'-TGCRNC-3') (with R = A/G; N = any residue) surrounded by semiconserved flanking sequences. MREs are *cis*-regulatory

DNA sequences that specifically bind transcription factors and are essential and sufficient for transcriptional induction upon heavy metal load (Stuart *et al.*, 1985).

Expression of *Pimt1* in yeast mutants

To characterize PiMT1 further, the *Pimt1* cDNA was expressed in three *S. cerevisiae* mutant strains, which are unable to grow on high concentrations of various metals, and growth was then monitored on both control and metal-supplemented media (Fig. 2). The *yap1* gene encodes a transcription factor related to the mammalian AP-1 complex that positively controls various genes involved in metal tolerance and, more generally, oxidative stress tolerance in yeast (Kuge & Jones, 1994). Its deletion renders the yeast mutant highly sensitive to Cd (Wu *et al.*, 2003). Figure 2 shows that the $\Delta yap1$ strain transformed with the empty vector was unable to grow at 40 μM Cd, whereas the Cd-sensitive phenotype of the $\Delta yap1$ mutant was fully complemented by *Pimt1*. The yeast mutant $\Delta cup2$ is highly sensitive to Cu because of the complete disruption of the

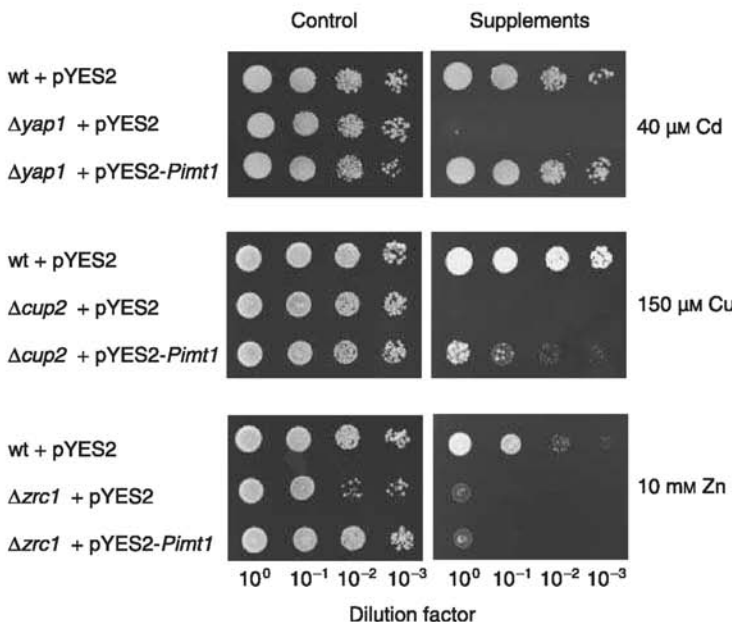


Fig. 2 Functional complementation of yeast mutants on selective media. *Saccharomyces cerevisiae* mutant strains were transformed with the empty vector pYES2 or with pYES2-*Pimt1*. Wild-type cells were also transformed with pYES2 as a control. Yeast cultures were spotted on SD medium supplemented (or not) with extra metal.

factor CUP2 that regulates *cup1* expression (Welch *et al.*, 1983; Buchman *et al.*, 1989). Complementing the results obtained with the $\Delta yap1$ mutant, an increased tolerance to Cu (Fig. 2) was conferred to $\Delta cup2$ cells by *Pimt1*. Deletion of the *zrc1* gene, which encodes a transporter that sequesters Zn into the vacuole, renders the mutant highly sensitive to Zn (Li & Kaplan, 1998). However, transformation with *Pimt1* did not restore growth of $\Delta zrc1$ on 10 mM Zn (Fig. 2).

Transcript expression pattern of *Pimt1*

In order to gain further insight at the molecular level concerning responses towards metals in ectomycorrhizal fungi, we followed the expression of *Pimt1* by northern blot analysis. A single mRNA of c. 100 bp was detected (Fig. 3). The basal mRNA expression of *Pimt1* remained relatively constant at low levels during transfer of the mycelium on medium without excess metal ions. However, the expression of *Pimt1* could be markedly enhanced by addition of Cu (Fig. 3a) or Cd (Fig. 3b). The induction of *Pimt1* expression reached a maximum at 0.8 mM Cu and 0.176 mM Cd, after 24 and 48 h incubation, respectively. Conversely, *Pimt1* was not induced by Zn (Fig. 3c). Rehybridization with a 5.8 S rRNA probe showed a similar signal in all treatments, which ensured equal RNA loading (data not shown).

Transformation of *H. cylindrosporum*

Two hundred and thirty-three *H. cylindrosporum* colonies were cocultivated with *Agrobacterium* containing the pFAT3-*Pimt1* construction, including the *Pimt1* cDNA under the control of a promoter for constitutive expression and a hygromycin resistance gene (*hph*). From this set of 233 colonies, 42 hygromycin-resistant transformants could be isolated. Amplification on genomic DNA demonstrated that pFAT3-*Pimt1*-transformed *H. cylindrosporum* colonies had integrated the *Pimt1* transgene, which was not detected in wild-type and EV-transformed colonies (Fig. 4a). Analyses of gene expression by RT-PCR showed expression of the hygromycin resistance gene in pFAT3-*Pimt1*-transformed and EV-transformed but not in wild-type colonies (Fig. 4b). Conversely, expression of *Pimt1* was detected only in pFAT3-*Pimt1*-transformed *H. cylindrosporum* colonies, but not in wild-type and EV-transformed colonies (Fig. 4c). In a further control, we found that genomic amplification of the spectinomycin resistance gene (present on the binary vector) occurred only in transformed *A. tumefaciens* cells but not in *H. cylindrosporum*-transformed colonies, demonstrating that transformants were *Agrobacterium*-free. All transformants retained resistance to hygromycin after several sequential cultures on nonselective medium. Thus *hph* appeared to be a stable selection marker for *H. cylindrosporum*.

The MT7 transformant did show a phenotype of higher Cu tolerance with increased diameter colony already at 0.6 mM Cu (Fig. 5a). The two transformants, MT3 and MT7, showed

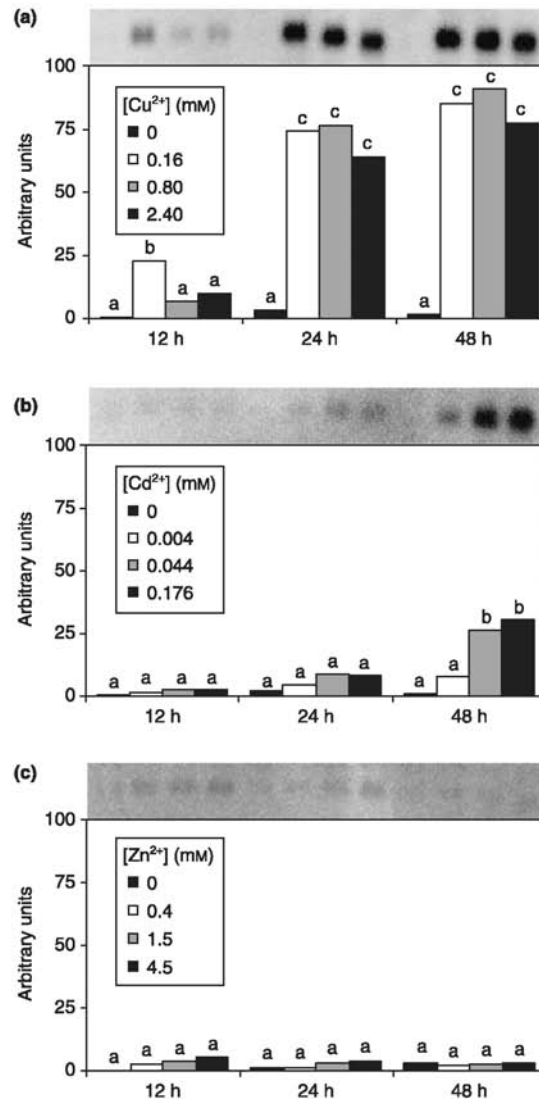


Fig. 3 Expression of *Pimt1* in *Paxillus involutus* cultures after incubation in medium supplemented with various concentrations of copper (a), cadmium (b) or zinc (c) for 12, 24 and 48 h. Data are means ($n = 3$). Statistically significant differences between treatments for a given metal ($P = 0.01$, ANOVA followed by Fisher's LSD test) are indicated by different letters above the bars. Gel pictures are provided illustrating *Pimt1* (a single signal of c. 100 bp) transcription abundance in the corresponding treatments.

increased biomass production as compared with EV-transformed colonies on 0.8 mM Cu (Fig. 5b). The phenotype was mostly evidenced on 1.0 mM Cu, where the empty vector control showed no residual growth and a similar pattern was observed for the wild-type colony (data not shown). There was no increased tolerance to Zn, Cd or Ni (data not shown).

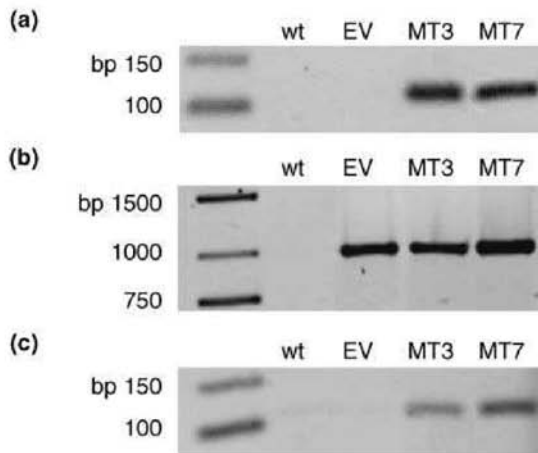


Fig. 4 Amplification of *Pimt1* and *hph* in transformed and untransformed *Hebeloma cylindrosporium* colonies. (a) PCR amplification of *Pimt1* with the primers PiMt-f and PiMt-r from genomic DNA; (b) RT-PCR amplification of hygromycin resistance gene *hph* with the primers hph-f and hph-r from extracted RNA; (c) RT-PCR amplification of *Pimt1* with the primers PiMt-f and PiMt-r from extracted RNA. The tested clones were the *H. cylindrosporium* wild type (wt), and the EV-transformed and pFAT3-*Pimt1*-transformed MT3 and MT7 strains.

Discussion

Metallothioneins are low-molecular-weight, cysteine-rich metal-binding proteins found in a wide variety of organisms, including bacteria, fungi, plant and animal species. MTs bind essential and nonessential heavy metals. Data on functional characterization of *P. involutus* MT1 obtained with the three yeast mutant strains further suggest that PiMT1 specifically binds Cd and Cu, but not Zn. We also describe here the MT gene expression patterns. *Pimt1* transcript expression was strongly induced by Cu and Cd, but not by Zn. These findings on Cd induction contrast with those on *Podospora anserina* MT1 transcription, which could be clearly up-regulated by Cu ions but not by Cd, Zn or Mn ions (Averbeck *et al.*, 2001). MT1 from *G. margarita* also responded to Cu, but not to Cd exposure (Lanfranco *et al.*, 2002). In *Candida glabrata*, both genes coding MTs were induced by Cu and Ag but not by Cd salts (Mehra *et al.*, 1989). However, in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*, a MT gene was markedly increased under Cd and Zn exposure (Liu *et al.*, 2003). However, it seems that the *Pimt1* response to Cu was faster and more intense than the response to Cd, because Cd detoxification may also involve other mechanisms, as discussed later. Alternatively, the isolated MT may have a higher binding capacity for Cu than for Cd, which is also reflected by the ability of the PiMT1 overexpression to confer a higher tolerance to Cu but not to Cd in *H. cylindrosporium*. Many eukaryotic organisms contain a family of MT genes. In *P. involutus* another distantly

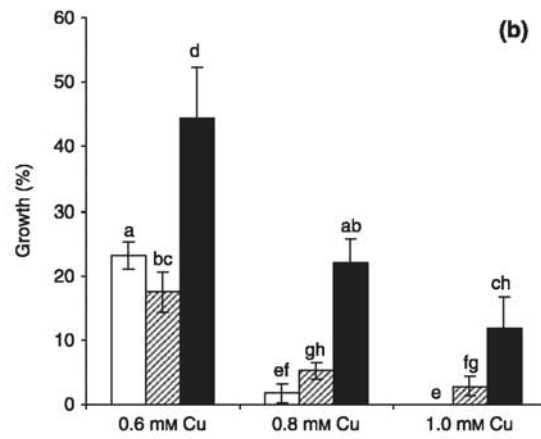
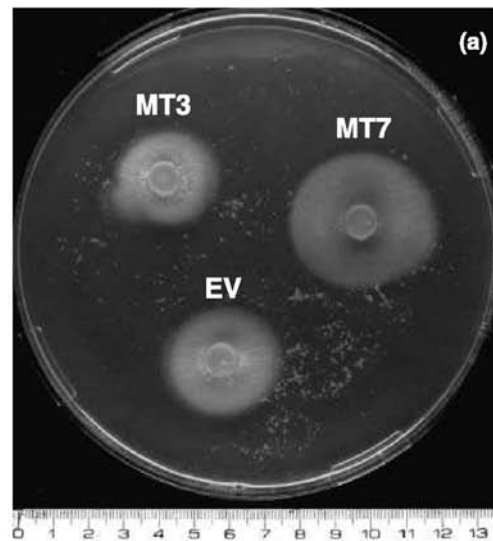


Fig. 5 Growth of *Hebeloma cylindrosporium* transformants on copper (Cu)-containing media. (a) Growth of the EV-transformed and the pFAT3-*Pimt1*-transformed MT3 and MT7 strains on 0.6 mM Cu, photographed after 14 d of growth. (b) Residual growth (expressed as percentage of fresh weight of colonies grown without extra Cu) of *H. cylindrosporium* transformants containing the EV (open bars), MT3 (hatched bars) and MT7 (closed bars) strains on three different Cu concentrations and harvested after 14 d. Data are means \pm SE ($n = 5$), and statistically significant differences ($P = 0.01$, ANOVA followed by Fisher's LSD test) are indicated by different letters above the bars; 100% growth corresponded to 0.34, 0.35 and 0.19 g for the EV, the MT3 and MT7 transformants, respectively.

related MT was found in the EST library (named *Pimt2*). However, transcripts corresponding to this partial cDNA did not increase under Cd exposure (M. Courbot, unpublished). This is in agreement with the finding that *C. glabrata* MT2 dominates in cellular resistance to Cu salts, whereas MT1 does not confer any appreciable Cu tolerance

(Thorvaldsen *et al.*, 1995). The differential metal inducibility of MTs could originate from different metal binding domains present in the MT promoters and/or to distinct metal-specific transcription factors involved in the regulation of MTs. In animal cells, MT gene expression is induced by metals via multiple metal-responsive elements (MRE) present in the MT gene 5'-regulatory region (Samson & Gedamu, 1998). Moreover, in *S. cerevisiae*, *cup1* and *crs5*, the two MT genes counteracting metal cytotoxicity by sequestration of cytosolic copper are also induced at the transcriptional level by ACE1 in response to copper excess (Thiele, 1988; Culotta *et al.*, 1994). The transcription factor ACE1 binds to the *cup1* and *crs5* promoters, increasing their rate of transcription by as much as 50-fold (Thorvaldsen *et al.*, 1995). Similarly, the *crf1* gene isolated from *Yarrowia lipolytica* codes for a transcription factor that confers resistance to Cu and Cd, with MTs as potential target genes (Garcia *et al.*, 2002). Promoter sequence analysis of the *Pimt1* gene revealed the presence of at least one putative metal regulatory sequence, suggesting that, similarly to yeast MTs, *Pimt1* may also be transcriptionally activated by metal species through a transcription factor binding to MRE.

The ultimate demonstration that a particular gene encodes a protein with a specific function (e.g. metal chelation) relies on an efficient transformation system, either to knock out or to overexpress the gene of interest. To perform genetic transformation of filamentous fungi, two strategies prevail nowadays: transformation of protoplasts and agrotransformation. *Agrobacterium*-mediated transformation has proven itself to be a simple and reproducible fungal transformation method in many instances. Unlike protoplast transformation, *Agrobacterium*-mediated transformation does not rely on cell-wall-degrading enzymes and avoids the widely reported inconsistencies that arise through differences in activity of enzyme batches. DNA transfer from *A. tumefaciens* has been used for both gene knockout (Zeilinger, 2004) and gene transformation studies (De Groot *et al.*, 1998) in filamentous fungi, including mycorrhizal fungi (Pardo *et al.*, 2002, 2005; Kempainen *et al.*, 2005) and is being developed as a system for insertional mutagenesis in other filamentous fungi (Comber *et al.*, 2003). This technique is reported to be easier to set up and to give higher efficiency in transformation than PEG-mediated transformation of protoplasts (Fitzgerald *et al.*, 2003). The present work has demonstrated that the overexpression of genes through agrotransformation is also a reliable procedure to study gene function in ectomycorrhizal fungi. The increased tolerance to Cu, but not other metals, in *H. cylindrosporium* transformants overexpressing the *Pimt1* transcript, together with the greatest degree of transcript induction in *P. involutus* by Cu, point to a primary role for this MT in Cu tolerance. The lack of any phenotype for many of the tested transformed clones could be the result of: (i) promoter weakness, eventually combined with an unfavorable transgene localization in the genome or truncated T-DNA

transfer (although the *Pimt1* sequence is close to the first transferred right border); (ii) endogenous defense mechanisms overwhelming the effects of the transgene expression.

Our previous studies suggested that metal tolerance in *P. involutus* is achieved by complex mechanisms involving nonspecific binding to cell walls (Blaudez *et al.*, 2000a), responses to oxidative stress (Jacob *et al.*, 2001) and further chelation of metals within cells by Glutathione (GSH) and complexing cysteine-rich peptides that we hypothesized to be MT (Courbot *et al.*, 2004). In the present study, we improve our understanding of the Cd and Cu tolerance mechanisms in *P. involutus* by demonstrating the key role of a MT in Cd and Cu tolerance. It was demonstrated that constitutive expression of MT can inhibit the biosynthesis or accumulation of PCs in both *C. glabrata* and *Schizosaccharomyces pombe* cultures, and the authors further suggested that if expression of MT occurs, sequestration of metal ions by MTs appears the dominant metal detoxification pathway (Yu *et al.*, 1994). However, we unsuccessfully searched for PC-like compounds in *P. involutus* using an improved HPLC procedure (Courbot *et al.*, 2004). We might therefore conclude that under the present growth conditions, Cu and Cd sequestration in the cytosol of *P. involutus* occurs mainly through MT complexation. However, given the high glutathione content in *P. involutus* (Courbot *et al.*, 2004) and the measured flow of Cd into the vacuoles (Blaudez *et al.*, 2000a), we cannot exclude that Cd may also be transferred into the vacuoles as GSH complexes. Knowledge about metal tolerance mechanisms in ectomycorrhizal fungi will lead on to powerful applications in bioremediation.

Acknowledgements

We thank K. M. Plummer (University of Auckland, New Zealand) for the gift of the vectors pSK-GPD and pFAT3 and Prof. S. Ottonello (University of Parma, Italy) for the gift of the strains W303B, $\Delta yap1$ and EHA 101. We thank Prof. A. G. Pardo (University of Quilmes, Argentina) for helpful discussions within the course of the France-Argentina ECOS-Sud program and Dr S. Mugford (University of Oxford, UK) for carefully reading the manuscript.

References

- Averbeck NB, Borghouts C, Hamann A, Specke V, Osiewacz HD. 2001. Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics* 264: 604–612.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 254: 173–181.
- Binz PA, Kägi JHR. 1999. *Metallothionein: molecular evolution and classification*. Basel, Switzerland: Birkhäuser-Verlag, 7–13, pp.
- Blaudez D, Botton B, Chalot M. 2000a. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Pisicium involutus*. *Microbiology* 146: 1109–1117.

- Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert J, Finlay RD, Botton B, Chalot M. 2000b. Differential responses of ectomycorrhizal fungal isolates to heavy metals in vitro. *Mycological Research* 104: 1366–1371.
- Buchman C, Skroch P, Welch J, Fogel S, Karin M. 1989. The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Molecular and Cellular Biology* 9: 4091–4095.
- Butt TR, Sternberg EJ, Gorman JA, Clark P, Hamer D, Rosenberg M, Crooke ST. 1984. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 81: 3332–3336.
- Cobbett C, Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159–182.
- Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Gay G, Marmeisse R. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters* 220: 141–148.
- Courbot M, Chalot M, Diez L, Leroy P, Ruotolo R. 2004. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7413–7417.
- Culotta VC, Howard WR, Liu XF. 1994. CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 25295–25302.
- De Groot MJA, Beijersbergen AGM, Bundock P, Hooykaas PJJ, Chapman JW. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16: 839–842.
- Fitzgerald AM, Plummer KM, Mudge AM, Gleave AP. 2003. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycological Research* 107: 803–810.
- Fogel S, Welch JW, Maloney DH. 1988. The molecular genetics of copper resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: a paradigm for non-conventional yeasts. *Journal of Basic Microbiology* 28: 147–160.
- García S, Prado M, Degano R, Domínguez A. 2002. A copper-responsive transcription factor, CRF1, mediates copper and cadmium resistance in *Xarowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37359–37368.
- Gay G. 1990. Effects of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in derooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Canadian Journal of Botany* 68: 1265–1270.
- Gietz D, Stjean A, Woods RA, Schiestl RH. 1992. Improved method for high-efficiency transformation of intact yeast-cells. *Nucleic Acids Research* 20: 1425–1425.
- Hasegawa I, Terada E, Sunairi M, Wakita H, Shinmachi F, Noguchi A, Nakajima M, Yazaki J. 1997. Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). *Plant and Soil* 196: 277–281.
- Jacob C, Courbot M, Brun A, Steinman HM, Jacquot JP, Botton B, Chalot M. 2001. Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *European Journal of Biochemistry* 268: 3223–3232.
- Javelle A, Rodríguez-Pastrana BR, Jacob C, Botton B, Brun A, André B, Marini AM, Chalot M. 2001. Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Letters* 505: 393–398.
- Kemppainen M, Circosta A, Tagu D, Martin F, Pardo AG. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 16: 19–22.
- Kuge S, Jones N. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO Journal* 13: 655–664.
- Lanfranco L, Bolchi A, Ros EC, Ottonello S, Bonfante P. 2002. Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiology* 130: 58–67.
- Li L, Kaplan J. 1998. Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22181–22187.
- Liu T, Nakashima S, Hirose K, Uemura Y, Shibasaki M, Katsuhara M, Kasamo K. 2003. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Letters* 542: 159–163.
- Mehra RK, Garey JR, Butt TR, Gray WR, Winge DR. 1989. *Candida glabrata* metallothioneins. Cloning and sequence of the genes and characterization of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 264: 19747–19753.
- Misra S, Gedamu L. 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. & *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 161–168.
- Okuyama M, Kobayashi Y, Inouhe M, Tohyama H, Joho M. 1999. Effect of some heavy metal ions on copper-induced metallothionein synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomaterials* 12: 307–314.
- Pan A, Yang M, Tie F, Li L, Chen Z, Ru B. 1994. Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 24: 341–351.
- Pardo AG, Hanif M, Raudaskoski M, Gorfer M. 2002. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by a *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycological Research* 106: 132–137.
- Pardo AG, Kemppainen M, Valdemoros D, Duplessis S, Martin F, Tagu D. 2005. T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 69–72.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson SL, Gedamu L. 1998. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Progresses in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 59: 257–288.
- Yu W, Santhanagopalan V, Sewell AK, Jensen IT, Winge DR. 1994. Dominance of metallothionein in metal-ion buffering in yeast capable of synthesis of (γ -EC) (n) G isopeptides. *Journal of Biological Chemistry* 269: 21010–21015.
- Stommel M, Mann P, Franken P. 2001. EST-library construction using spore RNA of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* 10: 281–285.
- Stuart GW, Searle PF, Palmiter RD. 1985. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* 317: 828–831.
- Thiele DJ. 1988. ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Molecular and Cellular Biology* 8: 2745–2752.
- Thorvaldsen JL, Mehra RK, Yu W, Sewell AK, Winge DR. 1995. Analysis of copper-induced metallothionein expression using autonomously replicating plasmids in *Candida glabrata*. *Yeast* 11: 1501–1511.
- Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F. 2001. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal* 25: 181–191.
- Welch JW, Fogel S, Cathala G, Karin M. 1983. Industrial yeasts display tandem gene iteration at the CUP1 region. *Molecular and Cellular Biology* 3: 1353–1361.
- Wu F, Zhang G, Dominy P. 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: Lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany* 50: 67–78.
- Zeilinger S. 2004. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Current Genetics* 45: 54–60.

Quatrième partie

Conclusions générales et perspectives



L'ENSEMBLE des travaux présentés dans ce manuscrit poursuivent un double but : d'une part, il s'agit de mettre au point une méthode de transformation de champignons ectomycorhiziens dont la mise en œuvre serait assez facile. D'autre part, il s'agit de caractériser le rôle de certains gènes potentiellement impliqués dans la tolérance aux métaux lourds. Pour réaliser ces expériences un certain nombre de choix devaient être faits, qui sont discutés par la suite ainsi que les perspectives qu'ils ouvrent.

7.1 Choix de l'espèce et de la souche fongique

Le choix d'*Hebeloma cylindrosporum* h1 pour effectuer les transformations était bon. En effet, dans un premier temps, il est bien de disposer d'une souche monocaryotique car elle permet de s'affranchir d'éventuels biais ou interférences dus à la présence d'un deuxième noyau. Ceci est encore plus vrai quand il s'agira de produire des souches inactivées pour un ou plusieurs gènes. De plus, le caractère assez hydrophile du mycélium (au contraire de celui de nombreuses autres espèces cultivables en boîte de Pétri comme p. ex. *Paxillus involutus* ou *Suillus bovinus*) et la croissance rapide et en couche très fine sur milieu gélosé le rendent facilement manipulable et la coculture avec *Agrobacterium tumefaciens* aisée et efficace.

Une alternative à *H. cylindrosporum* est *Laccaria bicolor* S238N dont le génome vient d'être séquencé et se trouve en cours d'annotation. Il devrait être possible d'appliquer la méthode de transformation sans problème à cette nouvelle espèce modèle comme l'ont fait Kemppainen *et al.* (2005). Pour *L. bicolor* une souche monocaryotique est disponible et elle présente de caractéristiques morphologiques similaires à *H. cylindrosporum* lors de la croissance sur milieu gélosé.

7.2 Choix du système de vecteurs

Le fait de réaliser un double clonage (assembler d'abord la cassette promoteur – ORF – terminateur dans le vecteur pSK-GPD, puis cloner cette cassette dans le vecteur binaire pFAT3) pour chaque gène avec lequel on voudrait transformer le champignon est désavantageux en temps et présente une source possible d'erreurs supplémentaires dans les séquences codantes. Pourtant c'est le seul système qui a permis de cloner derrière un promoteur les gènes voulus, tous les vecteurs de clonage direct ne l'ayant pas permis. L'idéal pour faire de la surexpression de transgènes exo- ou endogènes serait de disposer d'un plasmide binaire comprenant un multisite de clonage étendu derrière un promoteur fort dans lequel les gènes pourraient être clonés facilement (*cf.* Fig. 3.4) comme c'est le cas pour l'expression de gènes dans la levure avec des vecteurs de type pYES2.

7.3 Choix du promoteur

Le vecteur pFAT3 permet de mettre le transgène sous le contrôle du promoteur la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase d'*Aspergillus nidulans*. Il s'agit d'un promoteur à expression constitutive peu régulé (Vellanki *et al.*, 2006). Le fait que le même promoteur (bien qu'issu d'une autre espèce) soit assez puissant pour conférer la résistance à l'hygromycine, qui est aussi un phénotype, laisse penser qu'il est assez fort pour apporter un phénotype pour d'autres transgènes dont il contrôle l'expression. Cette hypothèse doit, au vu des résultats être nuancée, en effet, il semble que ce promoteur dans *H. cylindrosporum* ne soit pas d'une grande force. Ceci est reflété par les difficultés rencontrées dans l'amplification des ARNm par RT-PCR, p. ex. on s'attendrait à une différence importante au niveau des taux de transcrits entre la souche sauvage et les transformants *HcZnT1*, ce qui n'est pas le cas et l'absence de phénotype pour des gènes utilisés dans l'étude, bien qu'un phénotype apparaisse dans les conditions d'expression hétérologue dans *S. cerevisiae*.

Pour la suite et toujours dans l'optique de continuer les études avec *L. bicolor*, il serait certainement avantageux de pouvoir mettre les transgènes sous le contrôle d'un promoteur fort et non régulé de cette même espèce afin d'éviter des problèmes de perte de force au cours du passage d'une espèce à l'autre. Il serait même imaginable d'utiliser des promoteurs inductibles qui permettraient ainsi la comparaison de la même souche en condition normale et de surexpression car, s'agissant d'une intégration aléatoire dans le génome du transgène, tous les transformants sont différents entre eux et différents des

gène	nb de colonies	nb de transformants	taux de transformation
<i>HcZnT1</i>	108	25	23%
<i>PiTrx</i>	91	28	31%
<i>PiMt1</i>	233	43	18%

TAB. 7.1 – Taux de transformation d'*H. cylindrosporum*.

souches contrôles non seulement par la présence du transgène mais aussi par l'endroit d'intégration de la cassette de transgénèse. En effet, les souches contrôles peuvent aussi présenter des perturbations à cause de la localisation du marqueur de sélection.

7.4 Choix de la méthode de transformation

La transformation par *A. tumefaciens* ou agrotransformation est lente à différentes étapes, surtout l'apparition des transformants, mais facile à mettre en œuvre : il n'y a pas d'étape vraiment critique, le traitement des boîtes de culture est rapide et c'est une méthode efficace qui permet d'obtenir des taux de transformation (nombre de clones résistants à l'hygromycine en dedans un mois par rapport au nombre de colonies fongiques mises en coculture avec *A. tumefaciens*) élevés et reproductibles (Tab. 7.1). Cette méthode pourra être appliquée sans modifications majeures à toute autre espèce fongique qui peut être cultivée dans des conditions similaires, c.-à-d. des explants très petit sur un milieu de culture solide.

7.5 Choix des transgènes

Les transgènes utilisés dans cette étude sont des gènes impliqués dans la tolérance au stress métallique et qui, dans un système d'expression hétérologue, donnent des phénotypes. Ceci laisse penser que leur surexpression homologue ou dans des organismes phylogénétiquement très proches (*P. involutus* et *H. cylindrosporum*), donne aussi un phénotype de croissance facilement visualisable, ce qui n'est pas le cas pour les gènes *HcZnT1* et *PiTrx*. Une différence majeure par rapport à la complémentation fonctionnelle de levures réside dans le fait que le champignon utilisé pour la transformation n'est pas un mutant mais la souche sauvage qui possède donc tout ses propres systèmes de tolérance aux stress métallique et qui peuvent annuler l'effet de la surexpression d'un gène de tolérance, surexpression éventuellement assez faible à cause du promoteur.

Par la suite, il semble peu sensé d'utiliser des gènes issus de familles multigéniques

pour faire de la surexpression, plutôt des gènes uniques avec un rôle clé dans une fonction physiologique, tant que des mutants inactivés ne sont pas disponibles. Cette inactivation sera elle aussi compliquée par les gènes appartenant à des familles multigéniques car souvent, il ne sera pas suffisant d'inactiver un seul membre pour obtenir une souche déficiente.

Une autre question qui se pose dans le contexte du choix des transgène est la suivante : peut-on utiliser des ADNc ou faut-il avoir les ADN génomiques complets avec les introns pour permettre aux cellules fongiques de traiter correctement les ARN résultants (Lorang *et al.*, 2001)? Jusqu'ici beaucoup de gènes était principalement disponibles sous forme d'EST, donc d'ADNc sans introns. Le séquençage des génomes permettra d'obtenir plus facilement les versions génomiques des gènes et il sera intéressant de comparer l'efficacité de la surexpression à partir d'ADN génomique et d'ADNc.

7.6 Conclusions

La méthode utilisée a permis de caractériser la fonction du gène *PiMt1* en tant que chélateur de cuivre lorsqu'il s'exprime de façon constitutive et hétérologue dans un champignon ectomycorhizien. Ceci corrobore les résultats de la complémentation fonctionnelle de *Saccharomyces cerevisiae* de façon originale comme il s'agit de la première caractérisation réalisée par cette méthode. Bien que d'autres expériences d'expression hétérologue aient déjà permis de montrer la capacité d'un métallothionéine à accroître la tolérance à un métal, p. ex. l'expression du gène CUP1 de la levure dans le chou-fleur augmente de 16 fois la tolérance et l'accumulation de Cd (Hasegawa *et al.*, 1997), ceci n'a pas encore été fait chez des basidiomycètes.

Les résultats montrent qu'il est indispensable de produire un nombre assez important de transformants (quelques dizaines) pour pouvoir espérer isoler un clone présentant un phénotype. On peut faire l'hypothèse que dans une proportion importante des transformants, l'insertion de l'ADN-T cause des perturbations dommageables qui réduiraient la capacité vitale des transformants en cas de stress, plus que ne pourrait l'augmenter l'expression du transgène.

Le travail amorcé ici devrait, au sein de l'étude de la génomique fonctionnelle des champignons ectomycorhiziens, être poursuivi en vue d'une meilleure compréhension du fonctionnement des processus physiologiques des partenaires fongiques ainsi que de leur spécificité dans les écosystème forestiers.

Références bibliographiques

- Aboul-Soud MAM, Yun B-W, Harrier LA, Loake GJ (2005): Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. *Mycopathologia* 158:475-482.
- Adriaensen K, Van Der Lelie D, Van Laere A, Vangronsveld J, Colpaert JV (2004): A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytologist* 161:549-555.
- Aggangan NS, Dell B, Malajczuk N (1998): Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Geoderma*:15-27.
- Andersson S, Jensén P, Söderström B (1996): Effects of mycorrhizal colonization by *Paxillus involutus* on uptake of Ca and P by *Picea abies* and *Betula pendula* grown in unlimed and limed peat. *New Phytologist* 133:695-704.
- Asch DK, Kinsey JA (1990): Relationship of vector insert size to homologous integration during transformation of *Neurospora crassa* with the cloned am (GDH) gene. *Molecular and General Genetics* 221:37-43.
- Austin MP, Smith TM (1989): A new model for the continuum concept. *Vegetatio* 83:35-47.
- Bähler J, Wu J-Q, Longtine MS, Shah NG, McKenzie III A, Steever AB, Pringle JR, Wach A, Philippsen P (1998): Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14:943-951.
- Bending GD, Read DJ (1995): The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytologist* 130:401-409.
- Bevan M (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12:8711-8721.
- Blaudez D, Botton B, Chalet M (2000): Effects of heavy metals on nitrogen uptake by *Paxillus involutus* and mycorrhizal birch seedlings. *FEMS Microbiology Ecology* 33:61-67.
- Brandes B, Godbold DL, Kuhn AJ, Jentschke G (1998): Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. *New Phytologist* 140:735-743.
- Braun-Lüllemann A, Hüttermann A, Majcherczyk A (1999): Screening of ectomycorrhizal fungi for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:127-132.
- Brown JS, Holden DW (1998): Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. *Current Opinion in Microbiology* 1:390-394.
- Bundock P, Dulk-Ras Ad, Beijersbergen A, Hooykaas PJ (1995): Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 14:3206-3214.
- Bundock P, Hooykaas PJ (1996): Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93:15272-15275.
- Calmels T, Parriche M, Durand H, Tiraby G (1991): High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Current Genetics* 20:309-314.
- Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW (1990): Sugars induce the *Agrobacterium* virulence

genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87:6708-6712.

Casas-Flores S, Rosales-Saavedra T, Herrera-Estrella A (2004): Three decades of fungal transformation: novel technologies. In Balbás P, Lorence A (eds): "Methods in molecular biology." Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp 315-325.

Chand P, Aruna A, Maqsood AM, Rao LV (2005): Novel mutation method for increased cellulase production. Journal of Applied Microbiology 98:318-323.

Chaveroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2000): A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Nucleic Acids Research 28:E97.

Chen X, Stone M, Schlagnhauser C, Romaine CP (2000): A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 66:4510-4513.

Christie PJ (1997): *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: A paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. Journal of Bacteriology 179:3085-3094.

Citovsky V, Wong ML, Zambryski P (1989): Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86:1193-1197.

Clayton RA, White O, Ketchum KA, Venter JC (1997): The first genome from the third domain of life. Nature 387:459-462.

Cocchi L, Vescovi L, Petrini LE, Petrini O (2006): Heavy metals in edible mushrooms in Italy. Food Chemistry 98:277-284.

Colpaert JV, Muller LAH, Lambaerts M, Adriaensen K, Vangronsveld J (2004): Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. New Phytologist 162:549-559.

Colpaert JV, Vanden Koornhuysse P, Adriaensen K, Van Gronsveld J (2000): Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. New Phytologist 147:367-379.

Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Gay G, Marmeisse R (2003): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. FEMS Microbiology Letters 220:141-148.

Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Pépin R, Marmeisse R, Gay G (2004): Nonmycorrhizal (*Myc*⁻) mutants of *Hebeloma cylindrosporium* obtained through insertional mutagenesis. Molecular Plant-Microbe Interactions 17:1029-1038.

Davis MRH, Zhao F-J, McGrath SP (2004): Pollution-induced community tolerance of soil microbes in response to a zinc gradient. Environmental Toxicology and Chemistry 23:2665-2672.

De Groot MJA, Beijersbergen AGM, Bundock P, Hooykaas PJJ, Chapman JW (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology 16:839-842.

Debaud JC, Gay G (1987): In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* associated with *Pinus pinaster*. New Phytologist 105:429-435.

Dietrich FS, Voegeli S, Brachat S, Lerch A, Steiner S, Mohr C, Pöhlmann R, Luedi P, Philippsen

- P, Gates K, Flavier A, Gaffney TD, Choi S, Wing RA (2004): The *Ashbya gossypii* Genome as a Tool for Mapping the Ancient *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Science* 304:304-307.
- Dittmann J, Heyser W, Bücking H (2002): Biodegradation of aromatic compounds by white rot and ectomycorrhizal fungal species and the accumulation of chlorinated benzoic acid in ectomycorrhizal pine seedlings. *Chemosphere* 49:297-306.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, de Montigny J, Marck C, Neugeglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich J-M, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, de Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud J-M, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard G-F, Straub M-L, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet J-L (2004): Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35-44.
- Ek H, Andersson S, Arnebrant K, Söderström B (1994): Growth and assimilation of NH_4^+ and NO_3^- by *Paxillus involutus* in association with *Betula pendula* and *Picea abies* as affected by substrate pH. *New Phytologist* 128:629-637.
- Fierro F, Laich F, García-Rico RO, Martín JF (2004): High efficiency transformation of *Penicillium nalgiovense* with integrative and autonomously replicating plasmids. *International Journal of Food Microbiology* 90:237-248.
- Finlay RD, Read DJ (1986): The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of ^{14}C -labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium. *New Phytologist* 103:143-156.
- Fitzgerald AM, Plummer KM, Mudge AM, Gleave AP (2003): *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycological Research* 107:803-810.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983): Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80:4803-4807.
- Frank AB (1894): Die Bedeutung der Mykorrhiza für die gemeine Kiefer. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 38:185-190.
- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma L-J, Smirnov S, Purcell S, Rehman B, Elkins T, Engels R, Wang S, Nielsen CB, Butler J, Endrizzi M, Qui D, Ianakiev P, Bell-Pedersen D, Nelson MA, Werner-Washburne M, Selitrennikoff CP, Kinsey JA, Braun EL, Zelter A, Schulte U, Kothe GO, Jedd G, Mewes W, Staben C, Marcotte E, Greenberg D, Roy A, Foley K, Naylor J, Stange-Thomann N, Barrett R, Gnerre S, Kamal M, Kamvysselis M, Mauceli E, Bielke C, Rudd S, Frishman D, Krystofova S, Rasmussen C, Metznerberg RL, Perkins DD, Kroken S, Cogoni C, Macino G, Catcheside D, Li W, Pratt RJ, Osmani SA, DeSouza CPC, Glass L, Orbach MJ, Berglund JA, Voelker R, Yarden O, Plamann M, Seiler S, Dunlap J, Radford A, Aramayo R, Natvig DO, Alex LA, Mannhaupt G, Ebbole DJ, Freitag M, Paulsen I, Sachs MS, Lander ES, Nusbaum C, Birren B (2003): The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422:859-868.

- Garrido EO, Grant CM (2002): Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Molecular Microbiology* 43:993-1003.
- Gay G (1990): Effects of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in derooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Canadian Journal of Botany* 68:1265-1270.
- Genney DR, Alexander IJ, Killham K, Meharg AA (2004): Degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) fluorene is retarded in a Scots pine ectomycorrhizosphere. *New Phytologist* 163:641-649.
- Giller KE, Witter E, McGrath SP (1998): Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1389-1414.
- Gouka RJ, Gerk C, Musters W, Verrips CT, De Groot MJA, Hooykaas PJJ, Bundock P (1999): Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nature Biotechnology* 17:598-601.
- Grant CM (2001): Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology* 39:533-541.
- Grimaldi B, de Raaf MA, Filetici P, Ottonello S, Ballario P (2005): *Agrobacterium*-mediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. *Current Genetics* 48:69-74.
- Hall JL (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53:1-11.
- Hamann A, Krause K, Werner A, Osiewacz HD (2005): A two-step protocol for efficient deletion of genes in the filamentous ascomycete *Podospira anserina*. *Current Genetics*:1-6.
- Hamer L, Adachi K, Montenegro-Chamorro MV, Tanzer MM, Mahanty SK, Lo C, Tarpey RW, Skalchunes AR, Heiniger RW, Frank SA, Darveaux BA, Lampe DJ, Slater TM, Ramamurthy L, DeZwaan TM, Nelson GH, Shuster JR, Woessner J, Hamer JE (2001): Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98:5110-5115.
- Hanif M, Raudaskoski M, Pardo AG, Gorfer M (2002): T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics* 41:183-188.
- Hasegawa I, Terada E, Sunairi M, Wakita H, Shinmachi F, Noguchi A, Nakajima M, Yazaki J (1997): Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). *Plant and Soil* 196:277-281.
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H (2000): A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5:446-451.
- Hinnen A, Hicks JB, Fink GR (1978): Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 75:1929-1933.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983): A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180.
- Idnurm A, Reedy JL, Nussbaum JC, Heitman J (2004): *Cryptococcus neoformans* Virulence

- Gene Discovery through Insertional Mutagenesis. *Eukaryotic Cell* 3:420-429.
- Isildak O, Turkecul I, Elmastas M, Tuzen M (2004): Analysis of heavy metals in some wild-grown edible mushrooms from the middle black sea region, Turkey. *Food Chemistry* 86:547-552.
- Jacob C, Courbot M, Brun A, Chalot M, Martin F (2004): Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *FEBS Letters* 576:423-427.
- Javelle A, Chalot M, Söderström B, Botton B (1999): Ammonium and methylamine transport by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Ecology* 30:355-366.
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Godbold DL (2001): Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 149:327-337.
- Kado CI (2000): The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. *Current Opinion in Microbiology* 3:643-648.
- Kahmann R, Basse C (1999): REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its Impact on the Isolation of Pathogenicity Genes in Fungi Attacking Plants. *European Journal of Plant Pathology* 105:221-229.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivares CP (2001): Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414:450-453.
- Kemppainen M, Circosta A, Tagu D, Martin F, Pardo AG (2005): *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 16:19-22.
- Kooistra R, Hooykaas PJJ, Steensma HY (2004): Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 21:781-792.
- Koukaki M, Giannoutsou E, Karagouni A, Diallinas G (2003): A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *Journal of Microbiological Methods* 55:687-695.
- Laczko E, Boller T, Wiemken V (2004): Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: Changes in fatty acid and sterol composition. *Plant, Cell and Environment* 27:27-40.
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, Van Breemen N (2001): Linking plants to rocks: Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology and Evolution* 16:248-254.
- Langfelder K, Gattung S, Brakhage A (2002): A novel method used to delete a new *Aspergillus fumigatus* ABC transporter-encoding gene. *Current Genetics* 41:268-274.
- Leake JR, Donnelly DP, Saunders EM, Boddy L, Read DJ (2001): Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following ¹⁴C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: Effects of litter patches and interaction a wood-decomposer fungus. *Tree Physiology* 21:71-82.
- Leita L, De Nobili M, Muhlbachova G, Mondini C, Marchiol L, Zerbi G (1995): Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biology Fertility of Soils* 19:103-108.
- LePage B, Currah R, Stockey R, Rothwell G (1997): Fossil ectomycorrhizae from the Middle

Eocene. *American Journal of Botany* 84:410-412.

Liu H, Kawabe A, Matsunaga S, Murakawa T, Mizukami A, Yanagisawa M, Nagamori E, Harashima S, Kobayashi A, Fukui K (2004): Obtaining transgenic plants using the bio-active beads method. *Journal of Plant Research* 117:95-99.

Loftus BJ, Amedeo P, Vamathevan J, Anderson IJ, Allen JE, Grinberg V, Haas BJ, Koo HL, Maiti R, Perteau M, Riggs FR, Salzberg SL, Shvartsbeyn A, Shumway M, Wortman JR, Fraser CM, Fung E, Rowley D, Bruno D, Miranda M, Fukushima M, Davis RW, Hyman RW, Roncaglia P, Fraser JA, Fox DS, Huang JC, Lengeler KB, Marra RE, Mitchell TG, Heitman J, Bosdet IE, Chiu R, Jones SJM, Krzywinski MI, Marra MA, Mathewson CA, Schein JE, Shin H, Wye NH, Brent MR, Tenney A, Doering TL, Donlin MJ, Lodge JK, D'Souza CA, Kronstad JW, Fu J, Wickes BL, Janbon G, Kwon-Chung JK, Specht CA, Suh BB, Utterback TR (2005): The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307:1321-1324.

Lorang JM, Turol RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, Rollins JA, Wolpert TJ, Johnson KB, Rodriguez RJ, Dickman MB, Ciuffetti LM (2001): Green Fluorescent Protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1987-1994.

Lu S, Lyngholm L, Yang G, Bronson C, Yoder OC, Turgeon BG (1994): Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12649-12653.

Martin F, Stewart GR, Genetet I, Le Tacon F (1986): Assimilation of $^{15}\text{NH}_4^+$ by Beech (*Fagus sylvaticus* L.) Ectomycorrhizas. *New Phytologist* 102:85-94.

Martino E, Turnau K, Girlanda M, Bonfante P, Perotto S (2000): Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: Their identification and growth in the presence of zinc ions. *Mycological Research* 104:338-344.

Marx DH (1973): Mycorrhizae and feeder root diseases. In Marks GC, Kozlowski TT (eds): "Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology." New York, USA: Academic Press, pp 351-382.

McGrath SP, Chaudri AM, Giller KE (1995): Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology* 14:94-104.

Meharg AA (1994): Integrated tolerance mechanisms: Constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant, Cell and Environment* 17:989-993.

Melin E (1925): "Untersuchung über die Bedeutung der Baummykorrhiza." Jena, Germany: Fischer, G.

Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ (2005): *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* 48:1-17.

Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S (2001): *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology* 91:173-180.

Nicolás FE, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM (2003): Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO Journal* 22:3983-3991.

Nieboer E, Richardson DHS (1980): The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B: Chemical and Physical* 1:3-26.

- Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H (2004): Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 101:12248-12253.
- Ochiai EI (1987): "General principals of biochemistry of the elements." New York, N.Y.: Plenum Press.
- Pardo AG, Hanif M, Raudaskoski M, Gorfer M (2002): Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by a *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycological Research* 106:132-137.
- Polle A (1997): Defense against photo-oxidative damage in plants. In Scandalios JG (ed): "Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses." Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 623-666.
- Rodríguez-Tovar AV, Ruiz-Medrano R, Herrera-Martínez A, Barrera-Figueroa BE, Hidalgo-Lara ME, Reyes-Márquez BE, Cabrera-Ponce JL, Valdés M, Xoconostle-Cázares B (2005): Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Journal of Microbiological Methods* 63:45-54.
- Rousseau JVD, Sylvia DM, Fox AJ (1994): Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytologist* 128:639-644.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): "Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edition." New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sell J, Kayser A, Schulin R, Brunner I (2005): Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant and Soil* 277:245-253.
- Selosse M-A, Le Tacon F (1998): The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Tree* 13:15-20.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M (1993): Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. 363:67-69.
- Smith SE, Read DJ (1997): "Mycorrhizal Symbiosis." London: Academic Press.
- Söderström B, Finlay RD, Read DJ (1988): The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants IV. Qualitative analysis of carbohydrate contents of mycelium interconnecting host plants. *New Phytologist* 109:163-166.
- Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ (2005): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1798-1802.
- Sunagawa M, Magae Y (2002): Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. *FEMS Microbiology Letters* 211:143-146.
- Svoboda L, Havlíčková B, Kalač P (2006): Contents of cadmium, mercury and lead in edible mushrooms growing in a historical silver-mining area. *Food Chemistry* 96:580-585.

- Sweigard JA, Carroll AM, Farrall L, Chumley FG, Valent B (1998): *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:404-412.
- Sylvia DM, Sinclair WA (1983): Phenolic compounds and resistance to fungi pathogens induced in primary roots of Douglas fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology* 73:390-397.
- Teeri TT (2004): Genome sequence of an omnipotent fungus. *Nature Biotechnology* 22:679-680.
- Thon MR, Nuckles EM, Vaillancourt LJ (2000): Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13:1356-1365.
- Tuszynska S, Davies D, Turnau K, Ashford AE (2006): Changes in vacuolar and mitochondrial motility and tubularity in response to zinc in a *Paxillus involutus* isolate from a zinc-rich soil. *Fungal Genetics and Biology* 43:155-163.
- Van Assche F, Clijsters H (1990): A biological test system for the evaluation of the phytotoxicity of metal-contaminated soils. *Environmental Pollution* 66:157-172.
- Van Engelen FA, Molthoff JW, Conner AJ, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ (1995): pBINPLUS: An improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research* 4:288-290.
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252:169-170.
- Vellanki RN, Komaravelli N, Gupta P, Choudhary ML, Lakshmi Narasu M, Khatri GS (2006): Constitutive intracellular expression and characterization of recombinant streptokinase in *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expression and Purification in press*.
- Vergunst AC, Schrammeijer B, Den Dulk-Ras A, De Vlaam CMT, Regensburg-Tuink TJG, Hooykaas PJJ (2000): VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* 290:979-982.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994): New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1793-1808.
- Wisniewski L, Dickinson NM (2003): Toxicity of copper to *Quercus robur* (English Oak) seedlings from a copper-rich soil. *Environmental and Experimental Botany* 50:99-107.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schafer M, Muller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Dusterhoft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, et al. (2003): corrigendum: The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 421:94.

Xiong ZT, Liu C, Geng B (2006): Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* RuprY. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:273-280.

Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE (1984): Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:1470-1474.

Yogeetha MS, Prakash SM, Ramakrishna Parama VR, Ramegowda (2004): Effect of Cr in irrigation water on germination and growth of French beans (*Dolichos lablab* L.). *Journal of environmental science engineering* 46:194-202.

Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ, Farrand SK, Winans SC (2000): The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* 182:3885-3895.

Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant Journal* 23:11-28.