Etude de quelques fonctions clés de la physiologie des symbioses ectomycorhiziennes

Mélanie Morel

▶ **To cite this version:**

Mélanie Morel. Etude de quelques fonctions clés de la physiologie des symbioses ectomycorhiziennes. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2005. Français. NNT : 2005NAN10120 . tel-01748084

HAL Id: tel-01748084
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748084

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

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

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 de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Biologie Forestière

par **Mélanie MOREL**

Etude de quelques fonctions clés de la physiologie des symbioses ectomycorhiziennes

Soutenance publique le 30 septembre 2005

Membres du jury:

Président du jury:	Mme Eliane Dumas-Gaudot	Directeur de Recherches, INRA Dijon
Rapporteurs:	M. Simone Ottonello	Professeur, Université de Parme, Italie
	M. Roland Marmeisse	Chargé de Recherches, CNRS Lyon 1
Examinateurs:	Mme Claude Plassard	Chargée de Recherches, INRA Montpellier
	Mme Annick Brun	Maître de Conférence, UHP Nancy I
	M. Michel Chalot	Professeur, UHP Nancy I

U.M.R Interactions Arbres/Micro-organismes- IFR 110 Génomique, Ecophysiologie et Ecologie fonctionnelle
Faculté des Sciences et Techniques-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AIA	acide indole acétique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ATCC	american type culture collection
CipC	concanamycin induced protein
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
dNTP	désoxynucléoside 5' triphosphate
DUR3	transporteur d'urée
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
EST	expressed sequence tag,
g	accélération de la pesanteur
GC-MS	gaz chromatography- mass spectrometry
GDH	glutamate déshydrogénase
GOGAT	glutamate synthase
GS	glutamine synthétase
ITS	internal transcribed spacer
kpb	kilopaires de bases
kda	kilodalton
MSX	méthionine sulfoximine
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PPT	phosphinothricin
PSD	phosphatidylserine decarboxylase
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	sodium dodécyl sulfate
SSH	soustractive suppressive hybridization
Tris	tris (hydroxymethyl) aminométhane
UV	ultraviolet

Objectifs

Contrairement à la plupart des organismes, les plantes sont contraintes à la sédentarité de par leur enracinement. Pour pallier à d'éventuels problèmes nutritifs, elles ont développé, il y a plusieurs millions d'années, une stratégie leur permettant, entre autre, d'accroître leur accès aux ressources du sol : la symbiose mycorhizienne. Dans les forêts tempérées, la symbiose ectomycorhizienne concerne la grande majorité des arbres forestiers. Cette association entre les racines fines des arbres et les hyphes d'un champignon permet l'établissement d'un organe symbiotique : l'ectomycorhize. Elle est caractérisée par 3 grandes composantes : i) un réseau de Hartig constitué d'hyphes qui s'allongent vers le centre de la racine, entre les cellules corticales, c'est le lieu d'échange entre les deux partenaires, ii) un manteau de cellules fongiques qui entourent la racine et iii) un réseau d'hyphes extramatricielles plus ou moins important selon les espèces fongiques, directement en contact avec le sol, et représentant la composante « absorbante » du système. Les principaux avantages de cette association pour les deux partenaires sont d'ordre trophique, le champignon transfère des composés azotés et phosphatés à la plante qui, en retour lui fournit des composés carbonés (Smith and Read, 1997).

Les premières études ont concerné l'aspect structural de cette association (Smith and Read, 1997). Plus tard, de nombreuses équipes se sont intéressées aux mécanismes régissant l'établissement de la symbiose, cherchant à identifier les processus par lesquels la plante et le champignon modifiaient leur métabolisme pour la formation et le fonctionnement de l'organe symbiotique. A présent, la recherche s'oriente davantage sur la compréhension des mécanismes d'adaptation aux contraintes environnementales.

C'est dans ce cadre que se situe mon travail de thèse. Je me suis plus précisément intéressée aux mécanismes de régulation mis en place par le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* et les mycorhizes leur permettant une adaptation aux conditions nutritives

variables des sols forestiers. En effet, ces sols présentent des profils azotés variables à la fois d'un point de vue qualitatif et quantitatif, et dans le temps et l'espace.

Au début de ce travail, les systèmes de culture utilisés pour les études comparant des profils d'expression de gènes étaient des systèmes axéniques qui permettaient de comparer l'organe symbiotique et les deux partenaires cultivés séparément. Aucune étude globale n'avait alors permis de comparer les profils d'expression au sein du système ectomycorhizien intact tel qu'il se présente en forêt, c'est-à-dire avec un réseau d'hyphes extramatricielles diffus, capable de coloniser son substrat. L'originalité de mon étude était de pouvoir utiliser en laboratoire, un système de culture se rapprochant le plus possible des conditions naturelles. Pour cela, un microcosme de tourbe humide, précédemment utilisé par Finlay et al., (1989) lors d'études à caractère physiologique, a été utilisé ici lors d'une étude moléculaire visant à comparer des profils d'expression de nombreux gènes au sein d'un système mycorhizien intact.

Le premier objectif de mon travail de thèse a donc été d'étudier la régulation spatiale de gènes de *Paxillus involutus* en symbiose avec *Betula pendula* grâce à un microcosme non stérile constitué de tourbe humide. Ce système de culture a permis la production d'un réseau d'hyphes extramatricielles diffus. Ce mycélium extramatriciel est d'une importance primordiale dans le fonctionnement symbiotique puisqu'il permet une prospection importante de sol à la recherche de nutriments et par ce fait, va conditionner les bénéfices trophiques que la plante peut retirer de cette association. L'étude a consisté à comparer les profils d'expression de nombreux gènes dans le compartiment fongique directement au contact de la racine (au niveau des apex mycorhiziens) et le mycélium extramatriciel

De plus, l'approche globale utilisée grâce à la technique des filtres à ADNc a permis d'aborder l'étude de l'expression de nombreux gènes sans à priori, dans le but de cribler de nouvelles fonctions potentiellement impliquées dans l'acquisition de l'azote d'une part, puisque la banque utilisée avait été enrichie en gènes différentiellement exprimés en fonction de deux sources azotées différentes, et dans le fonctionnement symbiotique à proprement parlé d'autre part.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont souligné, entre autre, l'importance de certaines fonctions, notamment de transport et de métabolisme lipidique, au sein des deux

tissus étudiés. Des gènes codant un transporteur d'urée, une phosphatidylserine decarboxylase et une protéine de fonction inconnue mais dont le profil d'expression laisse sous entendre un rôle important et spécifique de cette protéine dans la mycorhize par rapport au mycélium extramatriciel, ont été clonés et caractérisés plus en détail.

Le deuxième volet de mon travail s'est davantage axé sur la compréhension des mécanismes permettant l'ajustement du métabolisme azoté des champignons ectomycorhiziens à des conditions azotée variables du milieu. Les études ont portés à la fois sur le transport de l'ammonium et de peptides, et sur les voies d'assimilation de l'ammonium. En effet, peu de données au niveau moléculaire étaient disponibles au début de ce travail de thèse et le mycélium extramatriciel étant le siège de l'absorption des nutriments dans la symbiose ectomycorhizienne, l'intérêt d'une telle étude était de comprendre les régulations mises en place par le champignon ectomycorhizien lors des variations des conditions azotées. De plus, une certaine diversité d'utilisation des voies d'assimilation de l'ammonium en fonction des espèces fongiques avait été évoquée, il y a plusieurs années, sans réellement comprendre les raisons des différences observées dans l'utilisation préférentielle d'une voie d'assimilation plutôt que l'autre (Chalot et al., 1994 ; Dell et al., 1989 ; Kershaw et Stewart, 1992 ; Martin et al., 1986). En effet, l'ammonium peut être incorporé par la voie glutamine synthetase/glutamate synthase (GS/GOGAT) et/ ou glutamate deshydrogénase à NADP (NADP-GDH) pour la synthèse de glutamate. En élargissant le nombre d'espèces fongiques étudiées, nous avons tenter de déterminer les facteurs responsables de cette diversité interspécifique au sein des champignons ectomycorhiziens, en couplant des approches à la fois biochimiques et moléculaires.

Mon travail de thèse s'est alors organisé autour des objectifs suivants:

- **Etude de l'expression différentielle de gènes de *Paxillus involutus* dans le mycélium extramatriciel comparativement aux mycorhizes au sein de l'association *Paxillus involutus*/*Betula pendula* en microcosme.**

- **Caractérisation des gènes codant un transporteur d'urée, une phosphatidylserine decarboxylase et une protéine de fonction inconnue, nommée CipC.**

- **Etude de la régulation de l'absorption et de l'assimilation de l'ammonium par *Hebeloma cylindropsorum*.**

- **Diversité fonctionnelle de la NADP-GDH au sein de différentes souches de champignons ectomycorhiziens.**

Section 1- Synthèse bibliographique

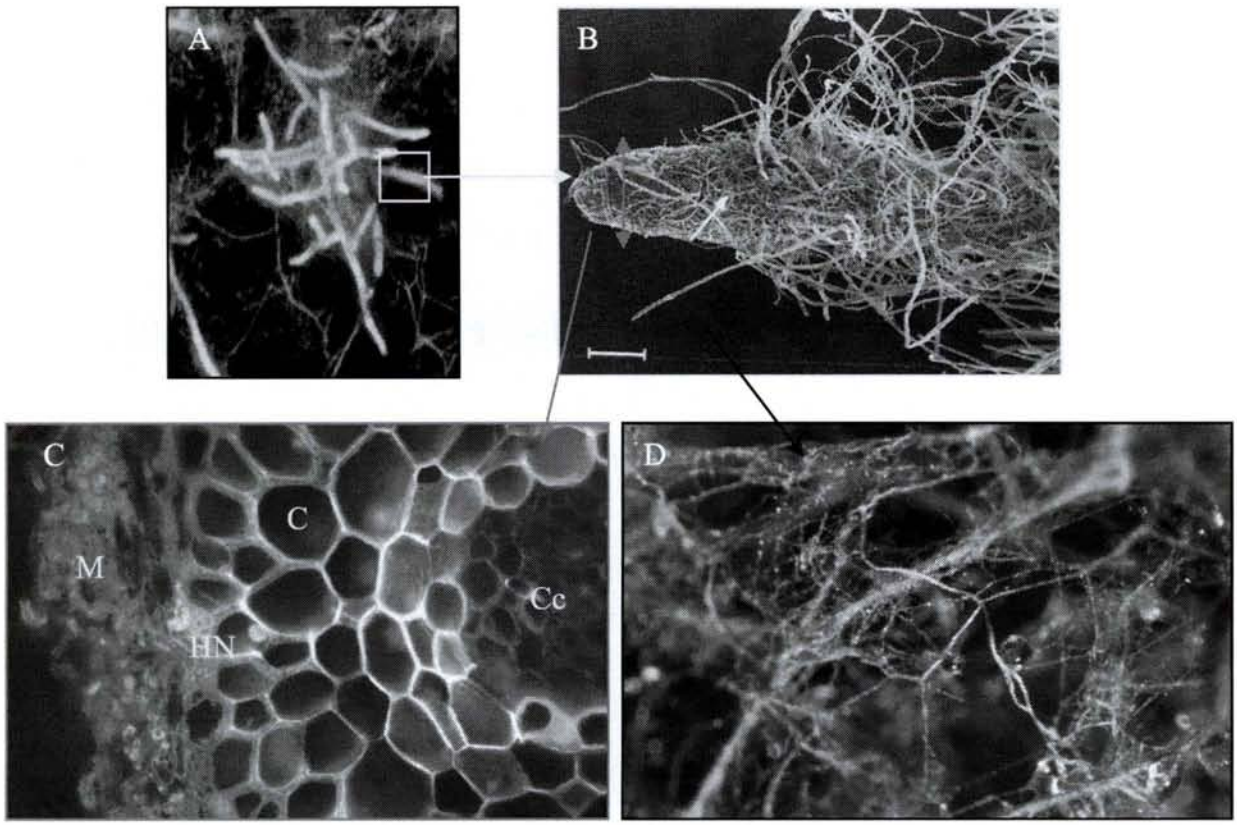


Figure 1 : Morphologie et anatomie des ectomycorhizes.

A: Ectomycorhizes de *Paxillus involutus/Betula pendula.*
B: Apex mycorhizien observé au microscope électronique à balayage
C: Coupe transversale d'un apex mycorhizien (M: manteau; HN:hartig net; C:cellules corticales; Cc:cylindre central)
D: Réseau d'hyphes extramatriciels

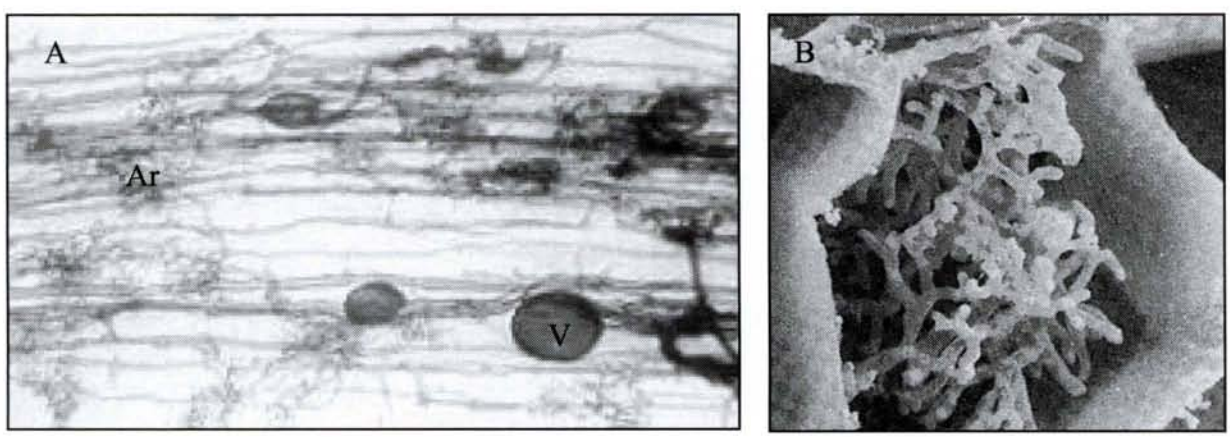


Figure 2 : Structure des endomycorhizes

A: Vésicules (V) et arbuscules (Ar) formées par un champignon endomycorhizien
B: Arbuscules à l'intérieur d'une cellule vu en microscopie électronique à balayage

1. Les mycorhizes

1.1. Généralités

Les mycorhizes 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:

- Les ectomycorhizes (Figure 1): les premières traces de ces structures datent d'approximativement 50 millions d'années (LePage et al., 1996). 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 Gymnospermes. L'organe symbiotique est constitué de 3 parties (Figure 1): un réseau d'hyphes (réseau de Hartig) qui s'insinuent entre les cellules corticales de la racine sans les pénétrer, un manteau qui forme une sorte de manchon autour de la racine et un réseau d'hyphes extramatriciels qui assurent le lien entre le sol et le manteau de l'ectomycorhiz et par conséquent, la racine.

- Les mycorhizes à vésicules et arbuscules (Figure 2): 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 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). A la différence des ectomycorhizes, le champignon pénètre à l'intérieur des cellules racinaires et forme des structures intracellulaires, les arbuscules et vésicules (Figure 2).

- Les ectendomycorhizes : cette symbiose 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.

- Les 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).

- Les mycorhizes éricoïdes : les champignons formant ce type de mycorhizes 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.

- Les mycorhizes orchidacées : 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.

1.2. Rôle des ectomycorhizes dans l'écosystème

1.2.1. Bénéfices pour la plante

1.2.1. 1. Bénéfices trophiques

Le mycélium extramatriciel peut recouvrir une importante surface de sol, permettant ainsi à la plante, d'augmenter sa surface de prospection pour le phosphore et l'azote, deux éléments limitants 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., 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). En comparant les capacités de prélèvement du champignon, des racines non mycorhizées et du système symbiotique, Plassard et al., (1997) ont montré que le champignon a de plus grandes capacités d'absorption que la plante pour l'ammonium et par conséquent que l'association fongique permettait d'augmenter les capacités de prélèvement de la plante. De plus, les capacités du système symbiotique seraient plus élevées que celles cumulées des deux partenaires. Les bénéfices de l'association concernant la nutrition nitrique sont plus controversés du fait que la mycorhization réduit le prélèvement de nitrate de plants de hêtre mycorhizés par *Laccaria laccata* (Kreuzwieser et al., 2000). Les auteurs ont attribué ce phénomène à un influx réduit d'ions nitrate auquel s'ajoute un efflux accru dans les plants mycorhizés comparés aux racines non mycorhizées. En revanche, les mesures de flux entrant de nitrate dans des racines de *Pinus pinaster* mycorhizées ou non par *Rhizopogon roseolus*, montrent que les ectomycorhizes ont une plus grande capacité d'utilisation du nitrate de la solution du sol que les racines courtes non mycorhizées, et ce quelle que soit la concentration en nitrate du sol (Gobert et Plassard, 2002).

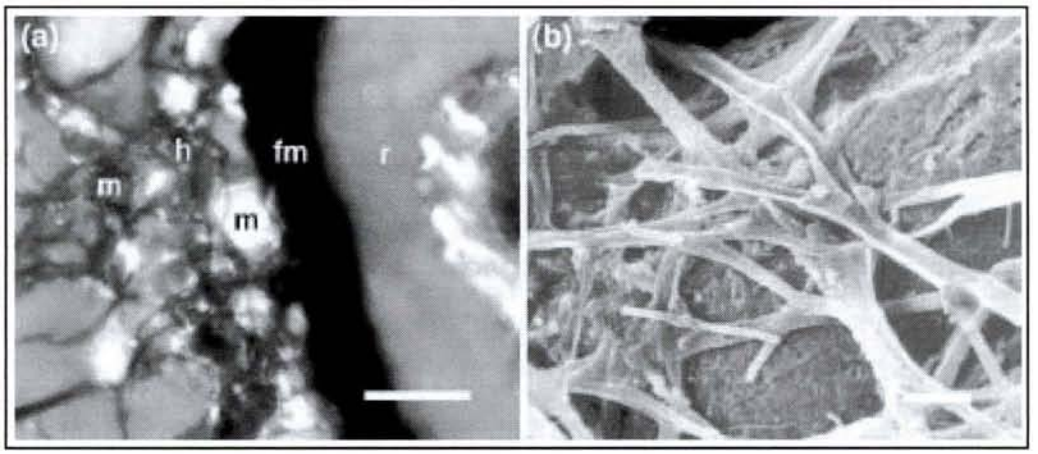


Figure 3: Colonisation des minéraux par les hyphes de champignons ectomycorhiziens d'après Landeweert et al, (2001).

r: racine; fm: manteau fongique; m: particule minérale, h: hyphes fongiques

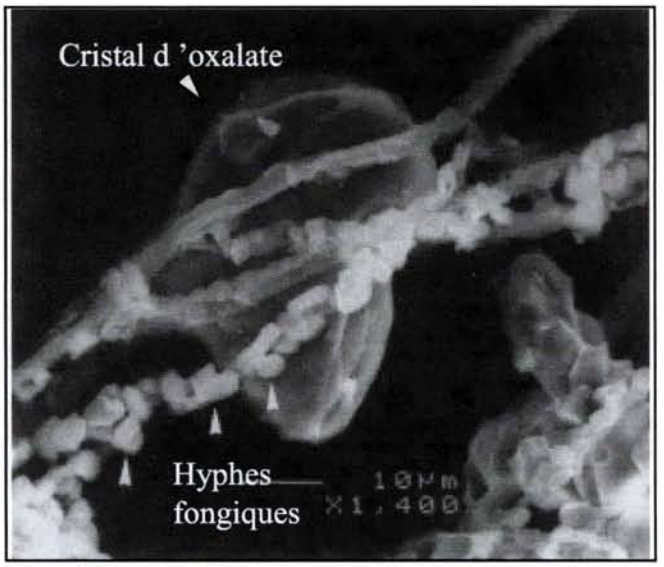


Figure 4: Hyphes fongiques couvertes par un cristal d'oxalate observées en microscopie électronique à balayage, d 'après Wallander et al., (2002)

Les champignons qui produisent un abondant réseau d'hyphes extramatriciels comme *Paxillus involutus* ou *Suillus bovinus* présentent des taux d'absorption du phosphore plus élevés (Coalpert et al., 1999 ; Van Tichelen and Coalpert, 2000). Cependant, les résultats de Aquino et Plassard (2004) montrent qu'une importante disponibilité en phosphore diminue le taux de colonisation du sol par *Hebeloma cylindrosporum*, alors que c'est dans cette condition qu'il transfère le plus de phosphore à la plante. En effet, le phosphore est transféré au sein des hyphes à raison de 0,36 µm et 0,66 µm par cm^2 de mycélium en conditions de faibles et fortes concentrations en phosphore respectivement. De plus, il existe une interdépendance entre la translocation de phosphore vers la plante et la translocation d'autres éléments nutritifs. En effet lorsque le flux de phosphore augmente, la translocation d'azote, de potassium et de magnésium est accrue, probablement pour neutraliser les charges du phosphore par un flux de cations (Hogberg et al. 1999 ; Jentschke et al., 2001).

L'un des effets bénéfiques les plus remarquables est lié à la capacité du champignon à accéder à des ressources généralement peu disponibles pour la plante seule.

- Lorsque les conditions sont limitantes en phosphore, les hyphes extramatriciels sont capables de s'insinuer entre les interstices des minéraux et d'en extraire du phosphore (Hagerberg, 2003) (Figure 3). Le champignon peut avoir accès à ce phosphore contenu dans l'apatite et au potassium présent dans la biotite, en excrétant des acides organiques, en particulier de l'acide oxalique (Wallander, 2000 ; Landerweert et al., 2001). Wallander et al. (2002) ont aussi montré que les rhizomorphes (cordons d'hyphes mycéliennes) contenaient plus de calcium lorsqu'ils étaient associés à l'apatite et que ce calcium se déposait sous forme de cristaux d'oxalate de calcium à la surface des rhizomorphes (Figure 4). Ces résultats sont cependant des données obtenues in vitro, la question qui se pose alors est de savoir si ces caractéristiques se retrouvent in situ. Wallander et Hagerberg (2004) ont répété leurs expériences en forêt. Leurs résultats montrent que l'interaction entre champignons et minéraux est stimulée dans des conditions de faibles concentrations en phosphore seulement. De plus, de façon contradictoire avec les résultats in vitro, aucune indication mettant en évidence une interaction entre le potassium de la biotite et les champignons ectomycorhiziens n'a été détectée, quel que soit le statut en potassium du sol.

Tableau 1 : Transferts de composés de plante à plante par l'intermédiaire d'un réseau d'hyphes mycélien pour différents systèmes symbiotiques (d'après He et al., 2003).

Espèce A	Espèce B	Direction du transfert	Elément transféré	Inocculum fongique	Références
Alnus glutinosa	*Pinus contorta*	A→B	$^{15}NH_4^+$	*Paxillus involutus*	Arnebrant et al.,1993
A. incana	*Pinus sylvestris*	A→B	$^{15}NH_4^+$	*P. involutus*	Ek et Huss-Danell, 1995
Betula papyrifera	*Pseudotsuga menziesii*	A→B et B→A	^{13}C	Plusieurs espèces	Simard et al., 1997 a, 1997b
Casuarina cunninghmiiana	*C. cunninghmiiana* *Eucalyptus maculata*	A→B et B→A	$^{15}NH_4^+$, $^{15}NO_3^-$	*Pisolithus tinctorius*	He, 2002
Eucalyptus maculata	*Eucalyptus maculata*	A→B et B→A	$^{15}NH_4^+$	*P. tinctorius*	He, 2002
Picea abies	*Betula pendula*	A→B et B→A	^{13}C	*Scleroderma citrinum*	Ek et al., 1996
	Betula pendula	A→B	$^{15}NH_4^+$	*S. citrinum*	Ek et al., 1996
	Monotropa hypopitys	A→B	^{14}C, ^{32}P	Non spécifié	Bjorkman et al., 1960
Pinus contorta	*Betula pubescens*	A→B et B→A	^{14}C	*Amanita muscaria*	Read et al., 1985
	Picea abies, Pinus sitchensis	A→B et B→A	^{14}C	*P. involutus, Suillus bovinus* *Rhizopogon luteolus,* *Rhizopogon roseolus* *Suillus granulatus, Suillus luteus* *A. muscaria*	Read et al., 1985
	Pinus contorta, Pinus sylvestris	A→B et B→A	^{32}P	*S. bovinus*	Finlay et Read, 1986b
Pinus densiflora	*Pinus densiflora*	A→B et B→A	^{14}C	*P. tinctorius*	Wu et al., 2001
Pinus sylvestris	*Betula pubescence* *Picea abies*	A→B	^{14}C	*A. muscaria, R. luteolus* *P. involutus*	Read et al., 1985
	Monotropa hypopitys	A→B	^{14}C, ^{32}P	Non spécifié	Bjorkman et al., 1960
	Pinus contorta	A→B	^{32}P	*S. bovinus*	Finlay et Read, 1986b
	Pinus contorta *Pinus sylvestris*	A→B et B→A	^{14}C	*A. muscaria, P. involutus* *R. luteolus, S. granulatus* *S. bovinus, S. luteus*	Read et al., 1985
	Pinus radiata	A→B	^{14}C	*S. bovinus*	Finlay et Read, 1986a
	Pinus sitchensis	A→B et B→A	^{14}C	*A. muscaria, P. involutus* *S. bovinus*	Read et al., 1985 Brownlee et al., 1983 Duddrige et al, 1988
Pinus taeda	*Pinus taeda*	A→B et B→A	Non spécifié	*P. tinctorius, Thelephora. terrestris*	Reid et Woods, 1969
Pseudotsuga menziesii	*Betula papyrifera*	A→B et B→A	^{14}C	Plusieurs espèces	Simard et al., 1997a, 1997b

- Les champignons ectomycorhiziens ont aussi la capacité de décomposer des substrats tels que la matière organique contenue dans la litière (Bending and Read, 1995, Perez-Moreno et al., 2000), le pollen (Perez-Moreno et Read, 2001b), les nématodes et collemboles (Perez-Moreno et Read, 2001a; Klironomos et Hart, 2001) et de transférer une partie importante de ces nutriments à la plante. En ce qui concerne la litière, *Paxillus involutus* en association avec *Betula pendula* mobilise 37% du phosphore et entre 0,1 et 14% d'azote selon le type de litière (hêtre, bouleau ou pin). Les plants mycorhizés présentent alors 3 fois plus de phophore et 4 fois plus d'azote que les plants non mycorhizés (Perez-Moreno and Read, 2000).

La colonisation de grains de pollen par cette même association symbiotique, induit une réduction de 75 et 97% des teneurs en azote et phosphore respectivement dans les grains de pollen, comparativement à 42 et 35% pour des plants non mycorhizés. Parmi les éléments prélevés par le champignon, 29% d'azote et 25% de phosphore ont été transférés à la plante (Perez-Moreno et Read, 2001b). Enfin, *P. involutus* est capable de réduire les contenus en azote et phosphore de la nécromasse de 68% et 65% respectivement, alors que les valeurs concernant les plantes non mycorhizées sont de 37 et 24%. En conséquence, les gains en azote et phosphore pour les plantes mycorhizées sont le double des témoins non mycorhizés (Perez-Moreno et al., 2001).

Le mycélium extramatriciel peut former un réseau d'hyphes reliant plusieurs plantes entre elles. Des expériences de marquage ont permis de montrer qu'il existait un transfert de carbone et autres nutriments de plante à plante par l'intermédiaire de ces hyphes (Read et al., 1988). Ce processus est un gain d'énergie important lors du développement de nouvelles plantules notamment dans des sites perturbés. Il permet aux plantes dites « de lumière » de se développer dans des sites sombres grâce aux apports de carbone d'une plante voisine (Griffiths et al., 1991). De plus, ces connexions réduisent la compétition entre plantes pour l'acquisition des ressources (Amaranthus et Perry, 1994). Récemment, He et al. (2003) ont fait le bilan des connaissances concernant le transfert de composés entre plantes connectées par un réseau d'hyphes extramatriciels. Les données présentées ont été obtenues grâce à des expériences de marquage isotopique ou radioactif (Tableau 1). Ce transfert a été démontré aussi bien pour des formes azotées comme l'ammonium ou le nitrate, que pour le carbone ou le phosphore. De plus, ce phénomène a été observé pour 16 espèces végétales et 10 espèces fongiques, ceci démontrant que ces phénomènes de transfert ne sont pas espèce spécifique. Bien que ces études aient été menées en laboratoire du fait de la fragilité du réseau mycélien

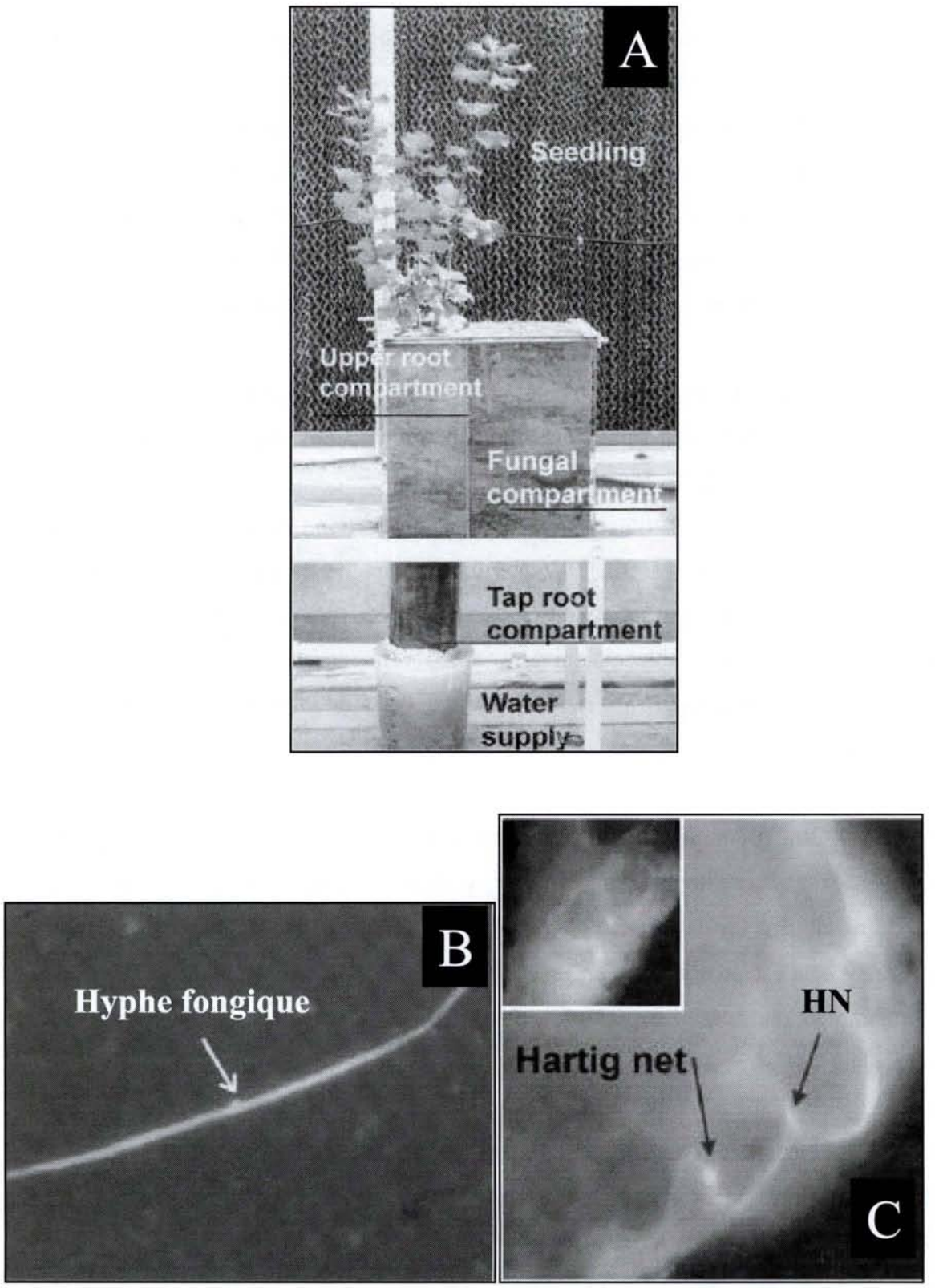


Figure 5: Mise en évidence d'un transfert d'eau dans le microcosme présenté en (A) par la localisation de LYCH (Lucifer Yellow carbohydrazide), un marqueur fluorescent dans les hyphes extramatricielles (B) et le Réseau de Hartig (C) d 'après Querejeta et al. (2003)

dans les sols forestiers, il a tout de même été prouvé que ces systèmes de connexion existaient dans la nature (Onguene et al., 2002). Les auteurs ont montré que la survie de plantules de *Parabelinia bifoliata* placées en contact avec des racines d'arbres adultes mycorhizées, étaient bien supérieures à celle des plantules isolées, et ce, grâce à la colonisation des nouvelles plantules par le réseau mycélien préexistant au sein du système racinaire des arbres adultes environnants.

Dans le cadre d'une sécheresse en eau, les plants non mycorhizés présentent une biomasse de phosphore et de potassium réduite, alors que cette biomasse reste stable pour les plants mycorhizés dans ces mêmes conditions (Wu et al., 1999). Il semble donc que l'ectomycorhize, en plus d'approvisionner la plante en eau grâce à la formation de rhizomorphes et l'augmentation de l'efficience de l'utilisation de l'eau de l'arbre (Gehl et Garbaye, 1990), permet d'atténuer l'effet de la sécheresse sur l'approvisionnement en nutriments. Ces effets sont plus ou moins importants selon les espèces fongiques. A titre d'exemple, *Cenococcum geophilum* est plus efficace que *Lactarius sp.* pour le maintien de l'intégrité physiologique des racines de hêtre face à la sécheresse (Jany et al., 2003). Cependant, en utilisant des marqueurs fluorescents, Querejeta et al., (2003) ont montré qu'il existait aussi un transfert d'eau de la plante vers le champignon. En effet, en fournissant de l'eau contenant le traceur Lucifer Yellow carbohydrazide seulement à la partie supérieure non mycorhizée d'un système racinaire en microcosme, la fluorescence du marqueur est détectée le lendemain matin dans la mycorhize et les hyphes extramatriciels du champignon associé (Figure 5). Ce transfert se produit seulement la nuit et est symbiose-spécifique, il ne se produit pas lorsque la plante est mise en présence d'organismes non mycorhiziens.

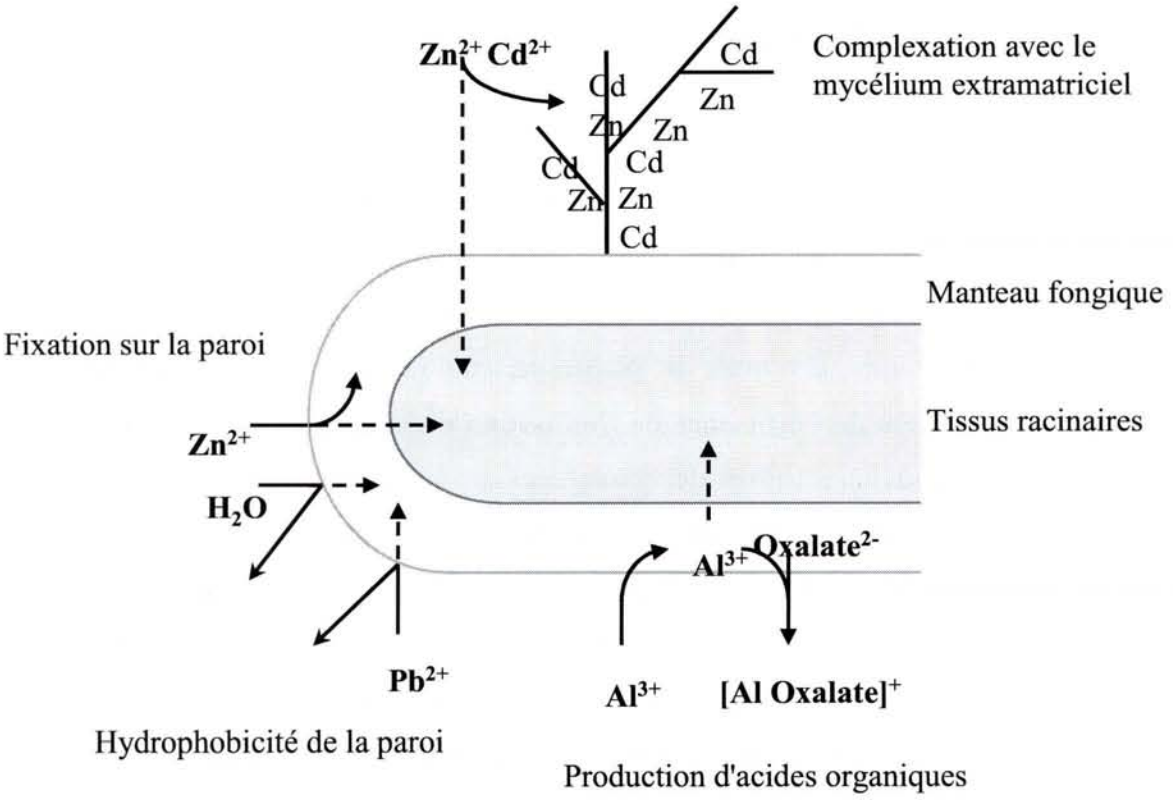


Figure 6: La stratégie d'évitement employée par les champignons ectomycorhiziens pour résister à la toxicité par les métaux lourds consiste en la complexation des métaux avec le mycélium extramatriciel, leur précipitation grâce à des acides organiques et la barrière physique que représente le manteau fongique.

U.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

1.2.1.2. 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 *Pisolithus tinctorius* a mis en évidence la production par le champignon de deux antibiotiques, qui ont été appelés, pisolithin A et B.

1.2.1.3. Protection contre les métaux lourds

Les principaux métaux lourds présents dans les sols sont l'aluminium, le fer, et dans une moindre mesure, le nickel, le plomb, le zinc et le cadmium. Les capacités des champignons à protéger la plante sont très variables selon les espèces et les métaux présents dans les sols (Hartley et al., 1997). Les effets du nickel et du cadmium ont été évalués sur des plants de *Pinus sylvestris* mycorhizés ou non par *Laccaria laccata* (Ahonen-Jonnarth and Finlay., 2001). Les résultats montrent que la biomasse des plants mycorhizés augmente de 34% par rapport aux plants non mycorhizés après un stress au nickel. Cette croissance accrue a été attribuée à une meilleure nutrition en phosphore, potassium, magnésium et soufre dans les plants mycorhizés et par conséquent une meilleure résistance des plantes aux métaux. De manière plus directe, les champignons ectomycorhiziens emploient deux stratégies pour faire face à cette pollution par les métaux : la première, appelée stratégie d'évitement ou de résistance, consiste à réduire la quantité de métaux entrant dans la cellule en les précipitant à l'extérieur de la cellule, en augmentation leur efflux, ou en diminuant leur absorption, notamment grâce à la densité du manteau fongique qui représente une véritable barrière physique (Colpaert et Van Assche, 1993) (Figure 6). Ce rôle filtre des hyphes mycéliens sous entend que le champignon est capable de se protéger contre ces métaux et de les immobiliser pour éviter leur transfert vers la plante (Mehrag, 2003). La seconde stratégie, dite de

séquestration ou de tolérance, consiste à transloquer les métaux dans des organes spécifiques de la plante ou du champignon qui présentent des activités métaboliques limitées ou dans des compartiments subcellulaires tels que les vacuoles. Blaudez et al., (2000) ont démontré, par l'utilisation de radiotraceurs, l'existence de deux mécanismes de détoxication chez *Paxillus involutus*. Le premier consiste en la fixation apoplasmique du cadmium et le second en son accumulation dans la vacuole par la mise en jeu d'un transport actif de cadmium au sein de la cellule. Les métaux peuvent ensuite être chélatés par des phytochélatines ou métallothionéines (Hamer, 1986). Chez *Paxillus involutus*, l'augmentation de la quantité de métallothionéine et l'absence de phytochélatines lorsque le champignon est exposé au cadmium suggèrent que le champignon peut adopter différentes stratégies de tolérance aux métaux (Courbot et al., 2004). Ces résultats concordent avec une étude transcriptomique qui a permis de comparer l'expression d'environ 2000 ADNc de *Paxillus involutus* soumis à un stress cadmium par rapport à une condition standard (Jacob et al., 2004). Les auteurs ont mis en évidence une surexpression de près de quatre fois de l'expression du gène codant une métallothionéine dans le cas du stress au cadmium.

1.2.2. Bénéfices pour le champignon

1.2.2.1. Acquisition de squelettes carbonés à partir de photosynthétats

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 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. De l'ordre de 16 % de la fixation nette de carbone par la plante sont alloués aux ectomycorhizes (Leake et al., 2001). En fournissant du $^{14}CO_2$ à des plants de Pin ou de bouleau 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, 1986a). En effet, ces hyphes en progression représentent un véritable puit de carbone comme cela a été

montré par Bending and Read, (1995) (Figure 7). Dans cette expérience, l'autoradiographie du système montre que le ^{14}C fourni sous forme de $^{14}CO_2$ à des plants de *Pinus sylvestris* mycorhizés par *Paxillus involutus* s'accumule dans les hyphes actifs du mycélium, c'est à dire ceux colonisant le substrat fourni sous forme de patches de litière. Environ 60% du carbone transféré de la plante au mycélium extramatriciel est aloué au mycélium colonisant les patches de litière qui ne représentent cependant que 12 % de la surface de sol exploitable par le champignon (Leake et al., 2001). Ce puit de carbone reflète l'activité des hyphes en croissance et par conséquent leur activité saprophyte d'utilisation des nutriments du sol. Grâce à la reconstitution en microcosme d'un profil de sol, Heinonsalo et al. (2004) ont montré qu'il n'existait pas de différences d'allocation de ^{14}C au sein des hyphes en fonction de leur localisation dans les trois principaux horizons du sol: organique, minéral et podzolique. Ceci confirme l'hypothèse que les champignons sont actifs à la fois dans la dégradation de la matière organique mais aussi dans les processus d'altération des minéraux et de podzolization. Cette expérience montre aussi que les différentes formes et quantités de carbone au sein des différents horizons, n'influent pas sur la force du puit de carbone que représentent les hyphes en croissance.

1.2.2.2. Acquisition de squelettes carbonés à partir de lipides

Une récente étude a démontré que les lipides pouvaient aussi être une forme de transfert de carbone de la plante au champignon associé. Lazco et al. (2003) 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 extramatricielles. En effet, le dosage de ces lipides montrent que le mycélium extramatriciel de *Pisolithus tinctorius* en association avec *Pinus 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. Dans le cas des associations ectomycorhiziennes, les informations sont basées uniquement sur des dosages de lipides. En revanche, pour les endomycorhizes, le transfert de lipides au sein des hyphes mycorhiziens a été étudié plus en détail (Bago et al., 2002 ; 2003). En utilisant des expériences de marquage isotopique, les auteurs ont montré que le champignon, dont la principale forme de stockage de carbone est sous forme de

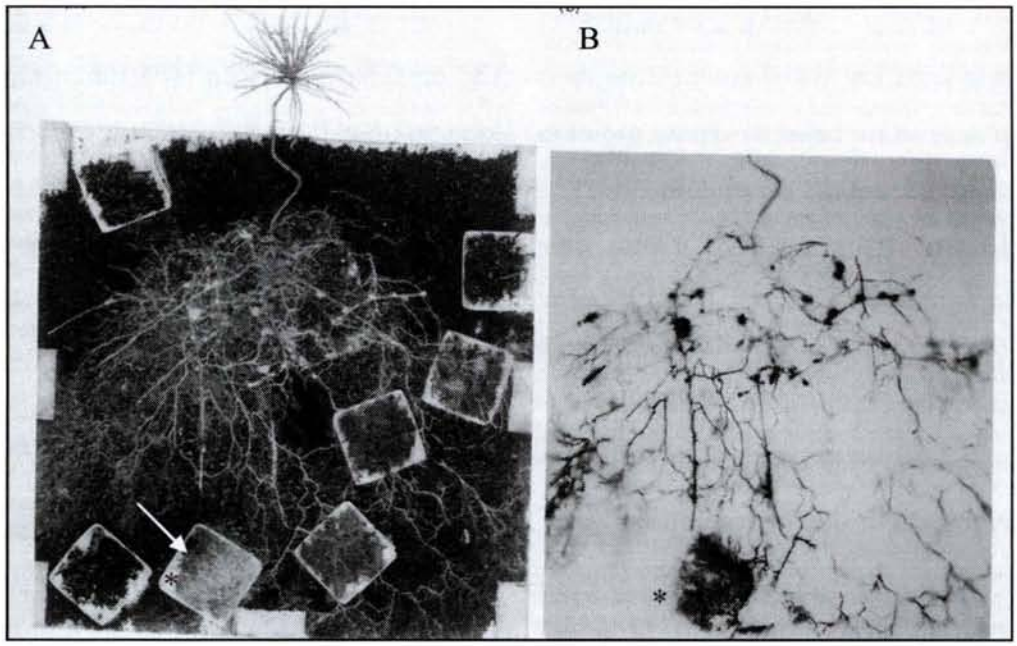


Figure 7: Système mycorhizien de l 'association *Suillus bovinus* et *Pinus sylvestris* en microcosme, d'après Bending et Read, 1995).

A: l'un des patchs de litière est colonisé abondamment par le mycélium extramatriciel (indiqué par une flèche)

B: l'autoradiographie de ce même système après alimentation des parties aériennes de la plante avec du $^{14}CO_2$ montre un marquage au niveau du mycélium sur le patch, ce qui montre le transfert de C de la plante vers les hyphes actifs du champignon.

triacylglycérol (Gaspar et al., 1994), transférait cette forme lipidique du mycélium intramatriciel vers le mycélium extramatriciel où il pourrait être stocké puis dégradé pour approvisionner en carbone les hyphes en croissance (Pfeffer et al., 1999). La visualisation des vésicules lipidiques au sein des hyphes montre qu'elles peuvent se déplacer de façon bidirectionnelle (Bago et al., 2002). Cependant, l'hypothèse émise par ces auteurs d'un transfert de lipides entre plantes connectées par un même réseau mycélien, a été remise en cause par les études de Pfeffer et al. (2004), qui montrent que le transfert de carbone et notamment de lipides, est généralement unidirectionnel de la plante vers le champignon. De plus, lorsque le carbone est véhiculé d'une plante à une autre par l'intermédiaire d'hyphes endomycorhiziennes, celui-ci resterait cantonné au sein du mycélium intramatriciel.

Selon Pfeffer et al., (1999), le champignon prélèverait du glucose et du fructose de la plante pour les transformer en lipides au site de prélèvement, puis les transloquer vers le mycélium extramatriciel où ils seraient catabolisés (Figure 8). Cependant, Bago et al., (2003) se sont plus particulièrement intéressés aux formes carbonées réellement exportée des racines vers le champignon et ce, pour la raison suivante : la conversion des sucres en lipides au sein du mycélium intramatriciel suivi par la reconversion de ces lipides en sucres dans le mycélium extramatriciel semble être un cycle futile et côuteux en énergie, sachant que cette opération engendre la perte de près de la moitié du carbone prélevé. L'hypothèse d'un transfert direct de lipides des racines au champignon est donc à envisager. En accord avec cette hypothèse, des protéines nsLTPs (plant nonspecific lipid transfer proteins) ont été caractérisées comme étant des petites protéines permettant le transfert de phospholipides à travers la membrane plasmique végétale (Cheng et al., 2004). De plus, l'analyse de la composition du mucilage de différentes plantes a montré que celui-ci était majoritairement composé de phospholipides tels que la phosphatidylcholine (Read et al., 2003). Ces résultats suggèrent l'existence d'un efflux de lipides de la racine vers le champignon, et notamment de phospholipides. Ces phospholipides, constituants majeurs des membranes, s'accumulent dans les hyphes intramatriciels de *Scutellospora calospora* et *Glomus intraradices* en association avec *Plantago lanceolata* (van Aarle and Olsson, 2003). Selon les auteurs, cette accumulation pourrait être due à un besoin en phospholipides lors de la réorganisation des hyphes pour permettre la colonisation racinaire. Concernant la symbiose ectomycorhizienne, les lipides seraient transportés très tôt entre la plante et le champignon, bien avant la formation du réseau de Hartig, suggérant que le champignon pourrait profiter de cette ressource pour la colonisation racinaire, comme suggéré ci-dessus pour la symbiose endomycorhizienne (Lazco

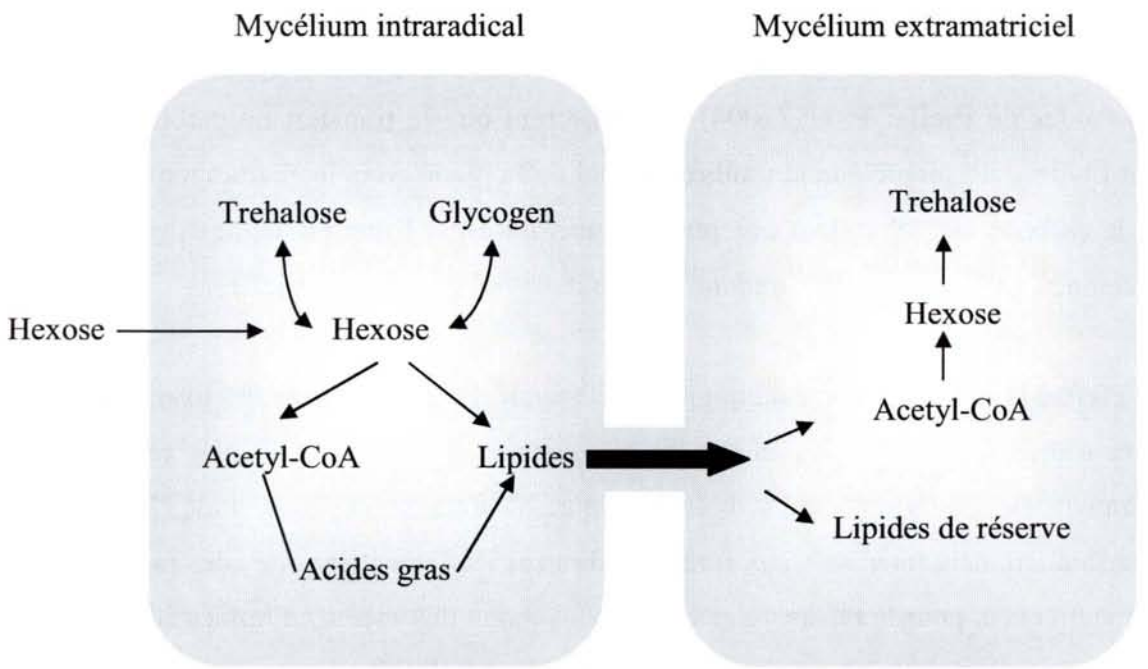


Figure 8: Principaux flux de carbone dans un champignon endomycorhizien à l'état symbiotique. Modèle proposé par Pfeffer et al. (1999).

Le champignon prélèverait des hexoses racinaires, les métaboliserait en lipides pour les transférer aux hyphes extramatricielles où ils seraient transformés en sucres.

et al., 2003) et ce, bien avant l'établissement des processus permettant le transfert de sucres de la plante vers le champignon.

1.2.3. Symbiose ou parasitisme ?

Le terme de symbiose sous-entend que l'association formée par le champignon et la plante est à bénéfices réciproques, c'est-à-dire que les gains pour les partenaires doivent être supérieurs aux dépenses. Or, dans certains cas, cet équilibre peut être modifié et la symbiose se transforme en parasitisme, l'association ne profitant plus qu'à un seul des deux partenaires. Les causes de ce « dérèglement » peuvent être de plusieurs ordres selon qu'ils dépendent de facteurs développementaux, environnementaux ou génotypiques (Johnson et al., 1997).

La mycorhization entraîne un changement morphologique des racines. Van der Heijden et Kuyper (2003) ont étudié cet aspect et ont défini deux types de stratégie de colonisation des racines par les champignons ectomycorhiziens qu'ils ont appelées : « root manipulation » et « root replacement ». Dans le premier cas, la racine continue de pousser lors de la mycorhization. Le taux de colonisation est assez faible et le manteau est fin. Cependant les auteurs ont mis en évidence que dans ce cas, le rapport de N/P transloqué du champignon vers la plante est très important. Les Cortinaires et Hebelomes en sont des exemples. Lors d'une stratégie de « root replacement », les racines sont courtes, cela sous-entend une capacité moindre à prélever les nutriments. Une symbiose efficace devrait permettre à ces racines courtes d'acquérir autant de nutriments que les plus longues grâce aux capacités d'absorption du champignon associé. Cependant, dans ce cas, le taux de colonisation de la racine par le champignon est important et le manteau fongique est épais. Le champignon se développe donc davantage comparativement au premier cas et mobilise une grande quantité d'azote pour sa propre croissance, transférant peu de nutriments à la racine. C'est le cas pour les Laccaires et Paxilles. Le taux de colonisation de la racine par le champignon n'est donc pas forcément un bon marqueur de l'efficacité de la symbiose. En plus d'être espèce dépendant, ce phénomène peut être renforcé par des conditions environnementales. Plus les conditions azotées sont limitantes au sein d'un sol, moins le champignon transférera de composés azotés à la plante et l'échange devient alors coûteux pour la plante. Cela a été démontré grâce à des déterminations du fractionnement isotopique ^{15}N dans les différentes composantes du système symbiotique (Hobbie et Colpaert, 2003) (Figure 9). Il en est de même si la lumière est limitante ; la photosynthèse est réduite et la plante se carence en carbone en transférant des

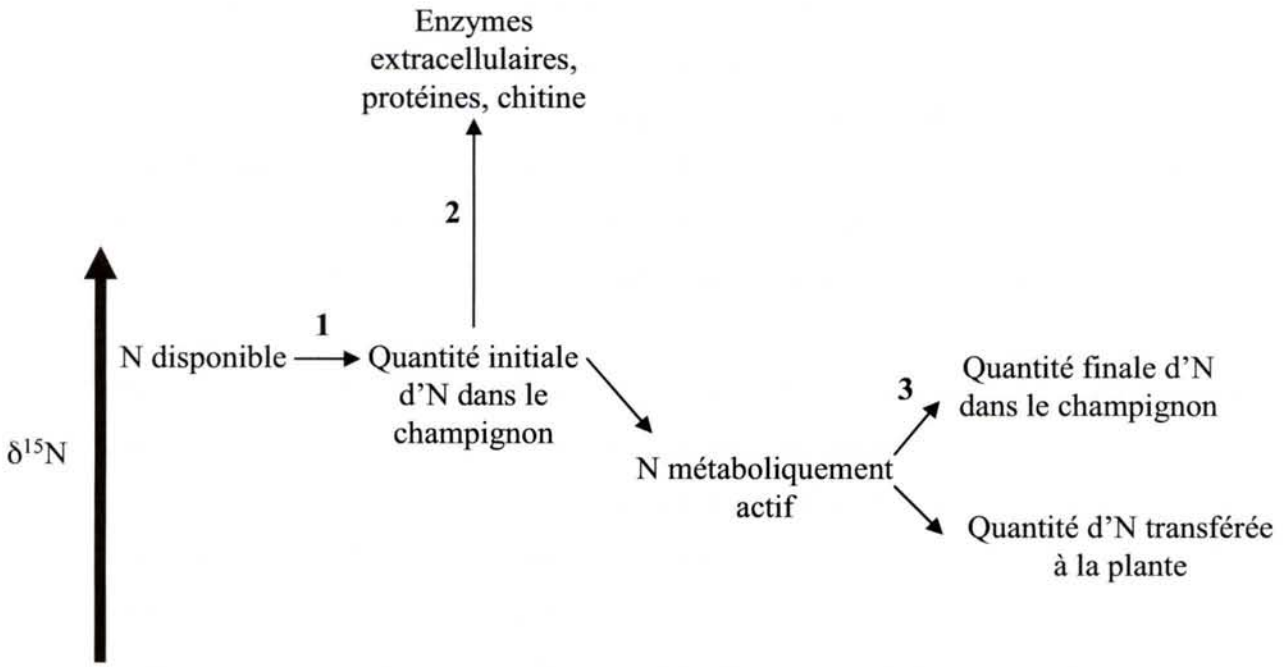


Figure 9: Hypothèse de fractionnement isotopique émise par Hobbie et Colpaert, (2003) au sein d'un système ectomycorhizien.

La quantité finale d'azote transférée à la plante est dépendante (1) des capacités du champignon à prélever l'N du sol, (2) de ses capacités à excréter des composés azotés et (3) de ses propres besoins en N.

composés carbonés au champignon. Par ailleurs, la fertilisation accrue peut affecter les plantes en diminuant la diversité des espèces fongiques et supprimant ainsi les atouts autres que ceux d'ordre trophique, apportés par ces champignons (Lilleskov et al., 2001).

D'un point de vue évolutif, les symbioses ectomycorhiziennes ont été qualifiées d'instables (Hibbett et al., 2000). Les symbiotes ont pu évoluer à partir de précurseurs saprotrophes et certaines lignées d'homobasidiomycètes ont pu « s'échapper » des symbioses ectomycorhiziennes. Cette hypothèse est confortée par le fait que la dépendance du champignon pour les photosynthétats de la plante peut parfois être remise en cause puisque certains champignons ectomycorhiziens ont la capacité de dégrader la cellulose, l'hémicellulose, la pectine et la lectine (Leake et Read, 1997).

L'équilibre symbiotique peut aussi être affecté par les plantes dites épiparasites. Ce sont des plantes non photosynthétiques qui acquièrent le carbone des plantes photosynthétiques par l'intermédiaire du champignon ectomycorhizien associé. Cette relation a été mise en évidence en étudiant la triple association entre des plants de bouleau mycorhizés par *Tulasnella* sp, champignon lui-même colonisé par *Cryptotallus mirabilis*, une plante épiparasite. Le $^{14}CO_2$ fourni aux plants de bouleau a été détecté dans *C. mirabilis* suggérant que les bénéfices carbonés du champignon apportés par la symbiose ectomycorhizienne, ont été détournés au profit du parasite (Bidartondo et al., 2003). Ce type d'interaction suggère que l'état symbiotique n'est pas un état stable mais un système qui peut être facilement perturbé par des conflits d'intérêt entre différents partenaires. Selon Hibbett (2002), cette modification aurait des implications évolutives notables qui pourraient conduire à la disparition de la symbiose au profit du parasitisme.

1.2.4. Impact des ectomycorhizes sur le sol

1.2.4.1. Modification du pH rhizosphérique

Outre les échanges avec leur plante hôte, les champignons ectomycorhiziens ont un véritable impact sur l'écosystème en modifiant les caractéristiques du sol. La moyenne des pH mesurés autour des racines est plus basse lorsque les racines sont associées au champignon, même en présence de NO_3^- qui induit normalement une alcalinisation du milieu (Rigou et al., 1995). Cette excrétion de protons permet d'augmenter le prélèvement de composés qui se présentent sous forme insoluble dans le sol. L'excrétion de protons s'accompagne d'une

excrétion d'acides organiques comme l'acide oxalique dans le cas de *Rhizopogon luteolus*. Ce champignon, en excrétant simultanément protons et oxalate, semble contribuer fortement à la mobilisation du phosphore du sol, contrairement à *Hebeloma cylindrosporum* qui a plutôt tendance à alcaliniser le sol rhizosphérique (Casarin et al., 2003). De plus, en formant des cristaux avec le calcium, l'oxalate permet un enrichissement du sol en calcium (Dutton et Evans, 1996).

1.2.4.2. Détoxication des sols

En se complexant avec des cations divalents, l'oxalate permet la détoxification du cuivre et la réduction du Fe_3^+ en Fe_2^+ (Dutton et Evans, 1996). De plus, les champignons ectomycorhiziens peuvent dégrader des polluants organiques persistants. Cet aspect est d'une importance primordiale dans le cadre de l'utilisation des champignons ectomycorhiziens dans la remédiation des sols pollués. Il a été montré, par exemple, que *Paxillus involutus*, en culture pure ou en association avec *Pinus sylvestris* était capable de minéraliser le 2,4-dichlorophenol (Meharg et Cairney, 2000). Les plantes ont la capacité d'extraire certains métaux du sol. Cette propriété appelée phytoextraction, pourrait être renforcée par l'association ectomycorhizienne, qui stimule l'acquisition par la plante des nutriments du sol, et simultanément les métaux en augmentant la surface d'exploration des racines (Lasat, 2002). Les associations mycorhiziennes pourraient aussi augmenter la solubilité des métaux dans le sol, favorisant ainsi leur prélèvement par les racines (Singh et al., 2003). Cependant, l'effet de cette association sur les capacités de la plante à prélever les métaux reste controversé et semble être métal et plante spécifique (Lasat, 2002).

1.2.4.3. Réserve de carbone

La symbiose participe de façon conséquente à l'approvisionnement en carbone des sols. Le champignon représente un puit fort de carbone notamment pour sa fructification et le développement de son réseau d'hyphes extramatriciels. Cet effet puit augmenterait les capacités photosynthétiques de la plante et ainsi le transfert de composés carbonés sous forme de sucres au champignon (Högberg et al., 2001). Les auteurs ont montré qu'en diminuant le flux de photosynthétats, la plante avait tendance à dégrader ses réserves d'amidon au niveau des racines, limitant ainsi le budget carboné des sols.

En forêt, la biomasse du mycélium extramatriciel des champignons ectomycorhiziens représente un tiers de la biomasse microbienne et peut fournir jusqu'à la moitié de la quantité de carbone organique dissous dans un sol forestier (Högberg and Högberg, 2002). Sachant que le mycélium extramatriciel a une durée de vie très courte (il a été estimé pour les champignons endomycorhiziens que le mycélium extramatriciel vivait en moyenne 5 à 6 jours (Staddon et al., 2003), le pool de carbone utilisable par la communauté microbienne du sol est sans cesse renouvelé. Les hyphes fongiques représentent aussi une source de carbone durable dans les sols, notamment dans des conditions de fort taux de dioxide de carbone, du fait de la présence de chitine qui constitue plus de 60% de la paroi cellulaire fongique qui est dégradée très lentement (Goday et al., 1994 ; Treseder et Allen, 2000). De plus, les racines mycorhizées présentent des concentrations en azote bien supérieures à celles des racines non mycorhizées. Cette propriété permet d'augmenter le taux de décomposition de ces racines dans le sol par les microorganismes qui y trouvent alors une source nutritive non négligeable (Langley et Hungate, 2003).

1.3. Diversité des ectomycorhizes

1.3.1. Diversité structurale

Il existe une variabilité structurale assez importante au sein du groupe des ectomycorhizes. Selon les espèces, les hyphes du manteau peuvent être des structures individuelles qui forment des constructions dites plectenchymateuses (Chilvers, 1968), ou des structures compactes de cellules irrégulières qui produisent une structure pseudoparenchymateuse (Ageger 1991, 1995) (Tableau 2). L'épaisseur du manteau varie en fonction des différents morphotypes pouvant mesurer de 16,5 à 29,0 µm, mais aucune corrélation n'a pu être établie entre l'épaisseur du manteau et la nature du sol abritant les ectomycorhizes (Ostonen et al., 2003). Par ailleurs, les ectomycorhizes de Gymnospermes présentent un manteau plus fin que celui des Angiospermes et le réseau de Hartig se développe entre plusieurs assises corticales, contrairement à celui des Angiospermes qui se limite à la première assise de cellules (Figure 10).

Ageger (1991) a proposé un modèle pour classer les systèmes ectomycorhiziens en fonction de leur profil de différentiation, en relation avec leur importance écologique. Les différences observées sont essentiellement basées sur la différentiation du mycélium extramatriciel. Certains champignons comme les lactaires et les russules forment des

Tableau 2: Caractéristiques morphologiques des ectomycorhizes formées par différents types de champignons d'après Smith et Read, (1997).

Espèces fongiques	Type de manteau	Type de rhizomorphes
Boletus edulis, Scleroderma citrinum, Paxillus involutus, Pisolithus tinctorius, Rhizopogon luteolus, Boletinus cavipes	plectenchymateux	Exploration de longue distance
Hebeloma crustiliniforme, Cenococcum geophilum	plectenchymateux	Exploration de courte distance
Lactarius glyciosmus, Lactarius pubescens, Amanita muscaria, Cortinarius armillarius, Laccaria laccata, Thelephora terrestris, Lactarius picinus	plectenchymateux	Exploration de moyenne distance
Tuber aestivum, Tuber melanosporum	pseudoparenchymateux	Exploration de courte distance
Lactarius rufus, Lactarius subdulcis, Lactarius pallidus	pseudoparenchymateux	Exploration de moyenne distance

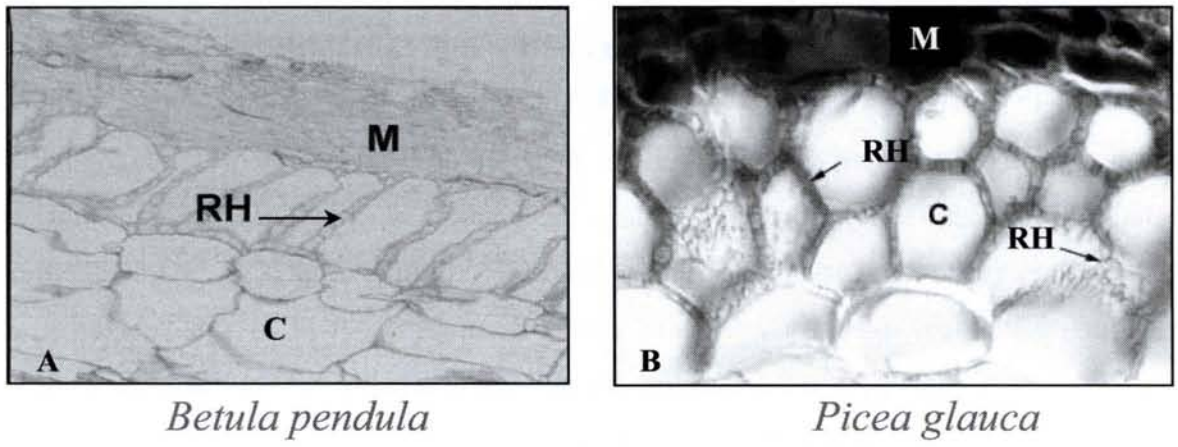


Figure 10: Anatomie comparée d'ectomycorhizes d'Angiosperme (A) et de Gymnosperme (B). Le réseau de Hartig ne colonise que la première assise de cellules corticales dans le cas de *B. pendula* (A) alors qu 'il s'insinue entre plusieurs assises cellulaires dans le cas de *Picea glauca* (B). E: manteau fongique; C: cellule corticale; RH: Réseau de Hartig.

mycorhizes lisses alors que d'autres comme *Pisolithus tinctorius* ou *Suillus bovinus* forment des mycorhizes présentant un réseau très important d'hyphes extramatriciels pouvant se développer sur des distances de plusieurs dizaines de cm (Ageger, 2001, Rousseau et al., 1994). Ces espèces sont qualifiées de « types d'exploration». Le tableau 2 liste de façon non exhaustive les espèces fongiques présentant des profils d'exploration de courte, moyenne ou longue distances. Le « type courte distance d'exploration » est caractérisé par une absence de rhizomorphes. Dans le cas du type « moyenne distance », les rhizomorphes sont soit peu ou pas differentiés, alors que les types de « longues distances » présentent peu de rhizomorphes mais ceux-ci sont très différentiés (Ageger, 2001). Les rhizomorphes vieillissants s'aggrègent pour former des cordes et le mycélium diffus tend à disparaître par autolyse. C'est un processus économique en énergie qui permet au champignon de se propager sur de grandes distances en recyclant ses ressources internes et ainsi de se maintenir dans des zones susceptibles de s'enrichir en nutriments (Donnelly et al., 2004). Ce mycélium extramatriciel représente donc un véritable atout dans le processus de colonisation du sol et des racines des plantes hôtes. Sa spécificité morphologique semble être dépendante des stratégies nutritives des champignons. Certains champignons qui utilisent une gamme de ressources restreintes, comme *Suillus bovinus*, ont tendance à s'aggréger pour former des cordes, ce qui permet un prélèvement des nutriments quantitativement plus efficace. Le mycélium extramatriciel de *Paxillus involutus* est beaucoup plus diffus, ce qui lui permet d'augmenter les contacts avec les ressources du sol (Donnelly et al., 2004) (Figure 11).

Plusieurs études ont montré que cette diversité structurale, en plus d'être espèce spécifique, était fortement liée aux conditions nutritives du sol. Lorsque les concentrations en phosphore du sol sont importantes, la biomasse du mycélium extramatriciel de *Paxillus involutus* diminue alors que celle du manteau reste stable (Ekblad et al., 1995). De la même manière, il a été montré que le mycélium extramatriciel d' *Hebeloma crustiliniforme*, *Laccaria bicolor* et *Suillus bovinus* présentait une croissance plus faible lorsque les concentrations en azote sont élevées (Wallander et Nylund, 1992). Cet effet négatif de l'apport d'azote sur le mycélium extramatriciel a été vérifié sur le terrain par Nilsson et Wallander (2003), qui ont observé une réduction de 50% de la croissance des hyphes extramatriciels après fertilisation azotée. Cette diminution semble être liée davantage au statut azoté de la plante associée plutôt qu'à celui du sol. En revanche, en appliquant des patches contenant de l'azote organique sous forme de litière, la densité du mycélium extramatriciel augmente considérablement (Bending and Read, 1995).

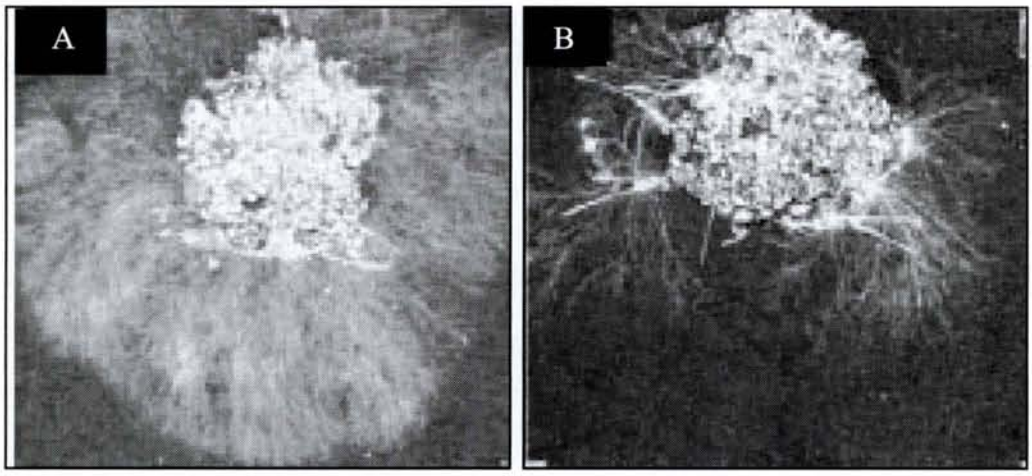


Figure 11: Systèmes mycéliens de deux espèces de champignons ectomycorhiziens d 'après Donnelly et al., 2004.

A: *Paxillus involutus* présente un réseau d'hyphes extramatricielles très dense et abondant.
B: *Suillus bovinus* présente un réseau d'hyphes extramatricielles plus réduit et forme des agrégats mycéliens.

La diversité structurale observée semble donc être fortement liée au fonctionnement des ectomycorhizes, et probablement à leur rôle dans l'écosystème forestier.

1.3.2. Diversité fonctionnelle

Le nombre des études concernant la diversité fonctionnelle des microorganismes ne cessent de s'accroître depuis les années 60 et notamment grâce, entre autre, à la création d'un programme de recherche en 1991 appelé « Diversitas » qui vise à promouvoir la recherche concernant les origines, la conservation de la biodiversité et son impact sur les fonctions écologiques (Morris et al., 2002).

Le terme de diversité fonctionnelle regroupe les caractéristiques spécifiques des espèces, inhérentes aux processus de l'écosystème. Selon Bengtsson (1998), il est important de connaître l'importance et la répartition des communautés fongiques pour pouvoir cibler les espèces clés et comprendre leur fonctionnement au sein d'un écosystème donné. Cependant, les processus écologiques sont davantage liés aux caractéristiques fonctionnelles que présentent les différentes souches fongiques plutôt qu'à l'abondance des espèces (Allen et al., 2003). Ainsi chaque espèce possède des caractéristiques qui lui permettent d'assurer un processus écophysiologique bien spécifique en réponse aux variations continuelles des conditions environnementales (Bond et Chase, 2002). Le tableau 3 présente les différentes caractéristiques des champignons, en relation avec leur rôle dans l'écosystème forestier. Les fonctions d'ordre trophique, telles que le puit de carbone végétal que représente le champignon, ou les capacités de prélèvement des nutriments du sol, sont très influencés, à la fois par les caractéristiques morphologiques et métaboliques des ectomycorhizes. La spécificité d'association avec la plante joue aussi un rôle primordial sur l'efficacité du fonctionnement symbiotique. Il faut cependant prendre en considération les phénomènes d'interactions entre les champignons, voire de compétitions avec les autres microorganismes ou encore leur état symbiotique, qui peuvent modifier ces caractéristiques individuelles au sein d'un écosystème.

Il a été montré lors d'une étude concernant les populations d'endomycorhizes, qu'il existait une corrélation positive entre la diversité des champignons et la diversité et la productivité des plantes. En effet, une diversité importante des espèces fongiques résulte en

Synthèse bibliographique

Tableau 3: Principaux caractères influençant les différentes fonctions des ectomycorhizes dans les écosystèmes forestiers et considérés comme étant pertinents pour une classification fonctionnelle des ectomycorhizes, d'après Allen et al., 2003.

	Fonctions des ectomycorhizes								
	Puits de C végétal	Prélèvement de nutriments du sol et transfert à la plante	Prélèvement d'eau du sol et transfert à la plante	Effets sur les propriétés physico-chimiques des sols et sequestration du C	Production de phytohormones	Protection de la plante contre les herbivores	Protection de la plante contre les pathogènes	Source de nourriture pour les autres organismes	Protection de loa plante contre des composés toxiques
Spécificité d 'association avec la plante hôte	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Biomasse et caractères morphologiques:									
Taille et distribution des genets fongiques, biomasse par volume de sol	√	√	√	√				√	
Pourcentage de colonisation	√	√	√		√	√	√		
Structure et épaisseur du manteau	√				√				√
Architecture de hyphes extramatricielles	√	√	√	√				√	
Abondance des carpophores	√							√	
Longévité et taux de renouvellement des mycorhizes et du mycélium extramatriciel	√	√		√				√	
Strategie de colonisation: spores ou inoculum	√	√							
Caractéristiques physiologiques et biochimiques:									
Activités enzymatiques	√	√							
Excretion d'acides organiques	√	√		√					
Efficacité d'absorption de diverses sources de nutriments	√	√		√				√	
Capacités saprotrophiques	√								
Poduction d'antibiotiques, de metabolites secondaires, de phytohormones	√					√	√	√	
Degradation de composés toxiques et chélation de métaux	√								√

une prospection accrue du sol par les divers réseaux mycéliens et par conséquent en une meilleure utilisation des ressources du sol qui se traduit par une meilleure nutrition de la plante, notamment en ce qui concerne le phosphore (Van der Heijden et al., 1998). Burleigh et al. (2002) ont montré que la diversité fonctionnelle des endomycorhizes se traduisait à la fois par des degrés variés de colonisation des racines par le champignon, des taux de prélèvement du phosphore plus ou moins importants par les racines mais aussi des profils d'expression variables concernant des transporteurs de phosphore et des gènes dont l'expression est induite par une carence en phosphore. Sachant qu'il existe des spécificités d'association entre plante et champignon, la diversité fongique peut donc conditionner la diversité et la productivité végétale. Van der Heijden et al, (1998) ont aussi établi une corrélation positive entre la biodiversité des plantes et la productivité de l'écosystème. Le maintien de cette diversité est alors primordiale pour maintenir la stabilité des écosystèmes forestiers.

1 .4. Modifications morphologiques et fonctionnelles lors de l'établissement et du fonctionnement de la symbiose ectomycorhizienne.

1.4.1. Phase de reconnaissance

Les mécanismes de reconnaissance permettant l'établissement de la symbiose sont encore très peu connus. Les molécules qui contrôlent ces systèmes peuvent être classées selon plusieurs catégories (Martin et al., 2001) :

- Les signaux rhizosphériques qui contrôlent le tropisme du champignon vers la racine. Les molécules impliquées regroupent les flavonoïdes, les diterpènes, des hormones (rutin, cytokinine, zéatine) et des nutriments variés. Le champignon *Pisolithus tinctorius* excrète de l'hypaphorine en réponse à la présence de la plante (Béguiristain et Lapeyrie, 1997). Ce chimiotropisme joue un rôle primordial dans les mécanismes de reconnaissance entre les deux partenaires. Horan et Chilvers (1990) ont observé qu'un champignon compatible était capable de coloniser les racines d'eucalyptus lorsque ceux-ci sont séparés physiquement par une membrane, alors que lors d'une réaction incompatible, le champignon n'est pas capable de se développer à travers la membrane pour coloniser la racine de l'autre compartiment. Il existe donc des stimulations hôte spécifique de la croissance du champignon, qui ne sont pas dépendantes de la différentiation racinaire. En effet, Sirrenberg et al., (1995)

Synthèse bibliographique

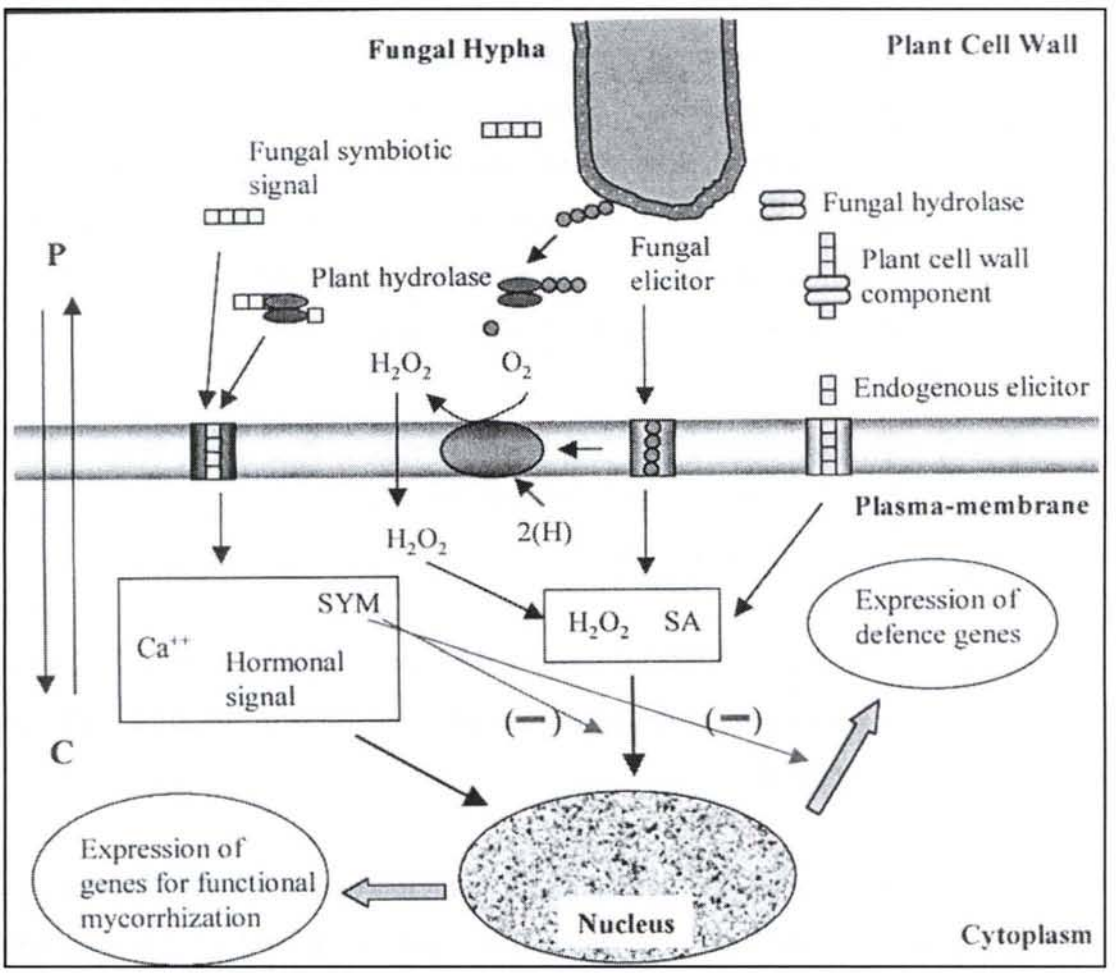


Figure 12: Hypothèse du mécanisme de régulation impliqué dans les réactions de défense de la plante lors de l 'établissement de la symbiose endomycorhizienne, d 'après Garcia-Garrico et Oscampo, (2002).

ont montré que des cals de *Picea abies* étaient capable de stimuler la croissance fongique et d'induire la formation de structures mycorhiziennes. De plus, les exudats racinaires peuvent stimuler la germination des spores fongiques (Fries et al., 1987).

- Les molécules qui permettent au champignon de résister à la réaction de défense mise en place par la plante. Cette réaction de défense se traduit par le relarguage d'oligosaccharides et d'éliciteurs dans le milieu par les cellules racinaires (Salzer et al., 1996), par la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) et ainsi la mise en place de la réponse hypersensible (HR) entraînant généralement la mort cellulaire à l'endroit de l'infection (Yang et al., 1997). Cependant, il a été montré que le champignon était capable d'atténuer la réaction de défense de la plante et éviter la mort des cellules végétales (Maleck et Dietrich, 1999). Lors de la formation de l'ectomycorhize, seulement une petite quantité d'éliciteurs composés de chitine atteignent les récepteurs à la surface des membranes plasmiques des cellules végétales, et ce, grâce à la production par la racine de chitinases, qui en dégradant ces éliciteurs fongiques, vont atténuer les réactions de défense de la plante, et de peroxidases (Albrecht 1994 ; Salzer et al., 1997). Un modèle représentant les mécanismes de régulation impliqués dans la réaction de défense de la plante lors de l'établissement de la symbiose endomycorhizienne a été proposé par Garcia-Garrido et Ocampo, (2002) (Figure 12). On peut aisément supposer que les réactions sont similaires dans le cas d'une symbiose ectomycorhizienne.

- Les adhésines et hydrolases qui permettent l'attachement et l'invasion des tissus végétaux. Lors du contact entre les deux partenaires, le champignon secréterait des glycoprotéines ayant la propriété de reconnaître des résidus osidiques, tout comme les lectines (Lei et al., 1990). Ces molécules, isolées chez *Lactarius deliciosus*, *L. deterrimus* et *L. salmonicolor*, possèdent une complémentarité avec des oligosaccharides situés sur la paroi des cellules racinaires de leur hôte respectif permettant ainsi l'adhésion des hyphes sur la racine (Giollant, 1993 ; Guillot et al., 1994).

Scathèque bibliocentrique

- Les hormones et signaux secondaires qui contrôlent les programmes organogénétiques dans les cellules des deux partenaires. La synthèse d'hormones comme les gibbérellines, cytokinines ou les auxines a été observée chez les champignons ectomycorhiziens (Arshad et Frankenberg, 1998). Les balances cytokinines/auxines et éthylène/auxine joueraient un rôle primordial dans la régulation du développement cellulaire chez les plantes et donc dans l'élaboration structurale des ectomycorhizes.

1.4.2. Modifications morphologiques

Une des premières réponses à cette étape de reconnaissance entre les deux partenaires est l'arrêt de croissance des poils absorbants de la plante, la stimulation de la formation des racines latérales et la dichotomie du méristème apical dans le cas des conifères (Lagrange et al., 2001, Horan et al., 1988). Pour *Pisolithus tinctorius*, l'hypaphorine, composé indolique majoritaire du champignon, serait impliqué dans ces phénomènes. Il a été identifié comme étant un des composés qui pouvaient être relargué par le champignon lors du développement de l'ectomycorhize pour bloquer l'élongation des poils absorbants (Ditengou et al., 2000). La racine, suite à l'arrêt de croissance du méristème racinaire, change de morphologie et prend un aspect plus charnu. Ces modifications ont été attribuées à l'action d'hormones telle que l'auxine (Gay et Gea, 1994). Jambois et al (2004) ont mis en évidence que l'hypaphorine restaurait l'inhibition de la croissance racinaire causée par l'auxine et ce, grâce à une similarité structurale des protéines impliquées dans la fixation de ces deux composés.

Les premiers contacts physiques entre les deux partenaires commencent par la dissociation des parois (Bonfante-Fasolo et al., 1998). Le champignon dissocie la paroi des cellules racinaires. Parallèlement, l'apex des hyphes se gonfle et forme une structure très proche des structures d'infection des pathogènes : les appressoria. Puis ces structures s'élargissent permettant un bon ancrage du champignon sur la racine (Jacobs et al., 1989) et la formation du manteau. La pénétration des hyphes entre les cellules corticales pour former le réseau de Hartig, passe par la dissociation de la lamelle moyenne entre les cellules végétales grâce à la synthèse de cellulases et pectinases fongiques (Massicote et al., 1986). Les produits de dégradation de ces enzymes constituent alors une matrice à l'interface symbiotique, constituée de composés polysaccharidiques et protéiques pariétaux (Bonfante et al., 1998). La

Synthèse bibliographique

formation du réseau de Hartig s'ensuit d'un allongement de la première assise de cellules racinaires dans le cas des Angiospermes, contribuant à la formation d'un réseau de Hartig périépidermal (Massicotte et al., 1986). Ces différentiations morphologiques sont accompagnées par des modifications métaboliques à la fois des cellules de la plante et du champignon, permettant d'établir un organe symbiotique fonctionnel.

1.4.3. Modifications fonctionnelles

Une fois l'organe symbiotique formé, l'efficacité de l'association est basée sur les échanges qui vont s'établir entre les deux partenaires. Pour cela, le champignon et la plante modifient leur activité métabolique en régulant les activités de certaines enzymes et en ajustant leur synthèse protéique par des régulations transcriptionnelles et traductionnelles montrant que l'organe symbiotique n'est pas la simple juxtaposition des métabolismes des deux partenaires mais bien un système intégré soumis à une régulation spécifique.

1.4.3.1. Au niveau protéique

Les principales études réalisées jusqu'à présent et ciblant une fonction précise, ont montré que certaines activités enzymatiques variaient dans la mycorhize comparativement à la racine ou au champignon en culture pure. Ces enzymes interviennent essentiellement dans le métabolisme de l'azote, la mobilisation des nutriments du sol ou les réactions de défense. Le tableau 4 compare l'impact de la mycorhization sur l'activité de ces enzymes par rapport aux activités des deux partenaires isolés. Les protéines impliquées dans le métabolisme azoté telles que la glutamate deshydrogénase, la glutamine synthétase, la glutamate synthase ou l'aspartate aminotransférase présentent des profils d'activité variables dans la mycorhize en fonction du type d'association considéré, suggérant que les régulations enzymatiques au sein de la symbiose, sont espèces spécifiques. Les profils variables de ces enzymes représentent un exemple caractéristique de la diversité fonctionnelle précédemment décrite (§ 1.3.2). Pour une même espèce végétale, les activités de certaines enzymes sont différentes selon l'espèce fongique associée. C'est le cas par exemple, des activités glutamate deshydrogénase à NAD, glutamine synthétase et glutamate synthase pour les associations *Jack Pine/Pisolithus tinctorius* et *Jack Pine/ Laccaria bicolor*. Un autre point mérite d'être souligné concernant l'activité peroxidase. Deux équipes différentes ont travaillé sur l'association *Pinus sylvestris/ Paxillus involutus* mais leurs résultats divergent. Ceci traduit l'influence des différents

Synthèse bibliographique

Tableau 4 : Régulation de l'activité de différentes enzymes en fonction de la mycorhization par rapport à la plante ou au champignon isolé.

Enzyme	*Type d'association*	**Activité Mycorhize/ Racine non mycorhizée**	**Activité Mycorhize/ Champignon en culture pure**	**Références**
Nitrate réductase	*Jack pine/Pisolithus tinctorius*	↘	↗	Vézina et al., 1989
	Jack pine/ laccaria bicolor	↘	↗	Vézina et al., 1989
NAD-Glutamate deshydrogénase	*Jack pine/Pisolithus tinctorius*	↘	↗	Vézina et al., 1989
	Jack pine/ laccaria bicolor	↘	↘	Vézina et al., 1989
	Eucalyptus sp/Scleroderma verrucosum	↗	↘	Botton et Dell, 1994
	Eucalyptus sp/Pisolithus tinctorius	↗	↘	Botton et Dell, 1994
NADP-Glutamate deshydrogénase	*Eucalyptus sp/Hebeloma westraliensis*	↗	↘	Botton et Dell, 1994
	Eucalyptus sp/Laccaria laccata	→	↘	Botton et Dell, 1994
Glutamine synthétase	*Jack pine/Pisolithus tinctorius*	↘	↗	Vézina et al., 1989
	Jack pine/ laccaria bicolor	↘	↘	Vézina et al., 1989
	Betula pendula/Paxillus involutus	↗	↗	Blaudez et al., 1998
Glutamate decarboxylase	*Jack pine/Pisolithus tinctorius*	↘	↗	Vézina et al., 1989
	Jack pine/ Laccaria bicolor	↘	↗	Vézina et al., 1989
Glutamate synthase	*Jack pine/Pisolithus tinctorius*	→	↗	Vézina et al., 1989
	Jack pine/ Laccaria bicolor	→	↘	Vézina et al., 1989
Aspartate aminotransférase	*Eucalyptus sp/Hebeloma westraliensis*	↗	→	Botton et Dell, 1994
	Eucalyptus sp/Laccaria laccata	↗	↘	Botton et Dell, 1994
	Eucalyptus sp/Scleroderma verrucosum	↗	→	Botton et Dell, 1994
	Eucalyptus sp/Pisolithus tinctorius	↗	→	Botton et Dell, 1994
	Betula pendula/Paxillus involutus	↗	↗	Blaudez et al., 1998
Malate deshydrogenase	*Betula pendula/Paxillus involutus*	↗	↗	Blaudez et al., 1998
G6PDH	*Betula pendula/Paxillus involutus*	↗	→	Blaudez et al., 1998
Isocitrate deshydrogenase	*Betula pendula/Paxillus involutus*	↘	↗	Blaudez et al., 1998
Esterase	*Pinus sylvestris/Suillus bovinus*	↗	→	Timonen et Sen, 1998
	Pinus sylvestris/Paxillus involutus	↗	↗	Timonen et Sen, 1998
Phosphatase acide	*Pinus sylvestris/Suillus bovinus*	↗	→	Timonen et Sen, 1998
	Pinus sylvestris/Paxillus involutus	↗	↗	Timonen et Sen, 1998
Peroxidase	*Pinus sylvestris/Suillus bovinus*	↘	↘	Timonen et Sen, 1998
	Pinus sylvestris/Paxillus involutus	↘	↘	Timonen et Sen, 1998
	Pinus sylvestris/Paxillus involutus	↗	ND	Gunther et al, 1998
	Pinus sylvestris/Suillus granulatus	↗	ND	Gunther et al, 1998
Polyphenoloxidase	*Pinus sylvestris/Suillus bovinus*	↘	↘	Timonen et Sen, 1998
	Pinus sylvestris/Paxillus involutus	↘	↘	Timonen et Sen, 1998
	Pinus sylvestris/Paxillus involutus	→	ND	Gunther et al, 1998
	Pinus sylvestris/Suillus granulatus	↗	ND	Gunther et al, 1998

Synthèse bibliographique

systèmes de culture utilisés sur les activités enzymatiques mesurées et souligne l'importance du choix d'un système le plus respectueux possible des conditions naturelles, pour avoir accès aux processus physiologiques tels qu'ils se déroulent en forêt. Dans certains cas (par exemple l'activité glutamate deshydrogenase ou glutamine synthetase pour l'association *Jack Pine/Laccaria bicolor*), l'activité mesurée dans les mycorhizes est inférieure à celle mesurée séparément dans les deux partenaires isolés, confortant l'idée précédemment évoquée que l'organe symbiotique met en place un système de régulation qui lui est propre.

Des études plus exhaustives concernant la régulation du protéome par électrophorèse en gel de polyacrylamide deux dimensions (2D PAGE) (Hilbert et al., 1991), ont permis d'introduire la notion de « protéines régulées par la symbiose » ou protéines SR. Les auteurs ont observé des taux d'accumulation des protéines différents dans la mycorhize par rapport aux partenaires isolés et qui de plus, ne correspondaient pas quantitativement à un mélange de protéines racinaires et fongiques.

Les différences observées sont de trois types : (i) une diminution de la quantité d'un grand nombre de polypeptides majoritairement racinaires, (ii) une forte accumulation de certaines protéines fongiques et racinaires et (iii) l'apparition d'une dizaine de polypeptides spécifiques des tissus ectomycorhiziens, ces protéines ont été nommées ectomycorhizines (Hilbert et Martin, 1988). Approximativement 50% des polypeptides fongiques et plus de 80% des polypeptides végétaux ne sont plus mis en évidence par électrophorèse en gels de polyacrylamide lors du développement de la mycorhize. De plus, ces changements s'opèrent dans les premières heures après contact entre les deux partenaires, suggérant que cette régulation très rapide du profil protéique est médiée très tôt par des signaux rhizosphériques, bien avant que les processus de différentiation de l'organe symbiotique aient lieu (Hilbert et al., 1991, Simoneau et al., 1993). Un groupe de polypeptides acides fongiques nommés SRAPs (Symbiosis-Regulated Acidic Polypeptides) a particulièrement retenu l'attention des chercheurs puisqu'ils sont synthétisés seulement en présence de la racine, et leur biosynthèse augmente en fonction du développement de la mycorhize (Burgess et al., 1995). Cette régulation est spécifique de l'état symbiotique puisqu'elle n'a pas été observée chez un isolat de *Pisolithus tinctorius* non mycorhizien dans les mêmes conditions. Inversement, une mannoproteine acide présente une concentration 10 fois moins importante dans les tissus fongiques de l'ectomycorhize, alors qu'elle représente une des protéines les plus abondantes du champignon *Pisolithus tinctorius* en culture pure (Laurent et al., 1999). Une grande

Synthèse bibliographique

proportion de protéines racinaires voient leur synthèse réduite. Ce phénomène peut probablement s'expliquer par les modifications importantes que subit la racine lors de l'association symbiotique, comme l'arrêt de l'activité méristématique ou la disparition des poils absorbants.

1.4.3.2. Au niveau transcriptionnel

Les modifications de l'expression des gènes lors du développement de l'ectomycorhize ont été abordées par plusieurs approches.

1.4.3.2.1. Approches « ciblées »

Connaissant les modifications du profil de certaines protéines lors de la symbiose, certaines équipes ont ciblé les gènes codant ces protéines et ont vérifié, par des techniques telles que la RT-PCR (reverse transcription-PCR) ou la technique du Northern blotting, que l'expression de ces gènes était elle aussi modifiée. Ainsi, l'expression de deux transporteurs d'hexoses et un transporteur de saccharose a été mesurée dans des racines de *Betula pendula* mycorhizées ou non par *Paxillus involutus* (Wright et al., 2000). L'expression de ces transporteurs est réduite d'un tiers dans les racines mycorhizées comparativement aux racines non mycorhizées. Ces résultats paraissent surprenants sachant que les racines mycorhizées contiennent un pool plus important de sucres qui de plus, est corrélé avec une activité invertase importante. Les auteurs ont alors attribué la diminution d'expression de ces transporteurs au changement du statut carboné des racines mycorhizées et en ont déduit que ces transporteurs n'étaient pas directement liés au transfert de carbone à l'interface symbiotique. Un gène codant une sucrose phosphate synthase est quant à lui surexprimé lorsque la plante est à l'état mycorhizé, ce qui est corrélé positivement à une augmentation de l'activité photosynthétique (Hampp et al., 1999). Par ailleurs, des études transcriptionnelles ont mis en évidence la surexpression de gènes de Pin, tels qu'une peroxidase cationique ou un facteur de transcription (Charvet-Candela et al., 2002a et b), et d'un gène d'Eucalyptus, en réponse à l'AIA produite par le champignon lors de l'interaction (Nehls et al., 1998). Une autre étude a détecté un gène codant une protéine inconnue qui ne présente aucune homologie avec les bases de données disponibles, et qui est surexprimé dans les racines de Pin après colonisation par des champignons ectomycorhiziens (Reddy et al., 2003). La surexpression est plus marquée après colonisation par une souche mutante d'*Hebeloma cylindrosporum* qui

Synthèse bibliographique

surproduit de l'AIA par rapport à la souche sauvage. Le même effet a été montré pour une souche mutante non mycorhizienne d'*H. cylindrosporum,* suggérant que ce gène serait impliqué dans les réactions de défense de la plante. En ce qui concerne les gènes fongiques, il a été montré par exemple, qu'un gène codant une malate synthase était surexprimée pendant les premières heures de l'interaction entre *Laccaria bicolor* et *Pinus resinosa* (Balasubramanian et al., 2002).

Tous ces exemples sont la preuve que les deux partenaires de l'organe symbiotique, au contact l'un de l'autre, modifient les mécanismes de régulation transcriptionnelle mis en jeu.

1.4.3.2.2. Approches « globales»

Une première approche a consisté, dans le cadre de l'association *Pisolithus tinctorius/ Eucalyptus globulus,* à générer des ESTs de tissus mycorhiziens (Tagu et al., 1993). Certaines de ces ESTs ont été amplifiées et séquencées. Cette technique a permis de détecter des ESTs codant pour des protéines de structure, pour des hydrophobines, ou des protéines relatives aux mécanismes de défense entre autres, confirmant ainsi les résultats précédemment cités concernant les profils protéiques de l'ectomycorhize (Tagu et Martin, 1995). Cette étude a permis la caractérisation d'une glutathione-S-transférase des racines d'Eucalyptus dont l'expression est régulée à la fois par la symbiose et l'auxine (Tagu et al., 2003). Des études plus poussées ont concerné les hydrophobines fongiques. Des ADNc codant pour des hydrophobines ont été clonés et caractérisés pour *Pisolithus tinctorius* (Tagu et al., 1996, Duplessis et al., 2001). La protéine HYDPt-1 ne montre pas de spécificité de localisation au sein des différents tissus de la mycorhize (Tagu et al., 2001). En revanche, par immunofluorescence et RT-PCR, Mankel et al. (2002) ont pu visualiser une accumulation de la protéine et des transcrits codant pour une hydrophobine dans le manteau et le réseau de Hartig de mycorhizes formées par *Tricholoma terreum* et *Pinus sylvestris*, alors que cette accumulation n'a pas lieu lors d'une interaction avec un hôte moins spécifique, *Picea abies*. Ceci suggère que cette protéine fongique est exprimée en symbiose pour participer aux mécanismes de reconnaissances et de spécificité de l'hôte. Une approche similaire de criblage différentiel, mais à plus petite échelle, a été menée pour l'association entre *Amanita muscaria* et *Picea abies* (Nehls et al., 1999). Les auteurs ont ainsi identifié un gène de fonction inconnue qui est sous-exprimé en symbiose et un autre homologue à une extensine qui lui est surexprimé 30 fois dans les mycorhizes.

Synthèse bibliographique

Tableau 5 : Principaux gènes fongiques dont l'expression est stimulée lors de la symbiose ectomycorhizienne pour 4 modèles d'études différents.

Laccaria bicolor/Pinus resinosa (Podila et al., 2000)	*Pisolithus tinctorius/Eucalyptus globulus* (Voiblet et al., 2001)	*Tuber borchii/Tilia platyphyllos* (Polidori et al., 2002)	*Paxillus involutus/Betula pendula* (Johansson et al., 2004)
Métabolisme			
Glyceraldehyde-3-P deshydrogenase PEP carboxykinase, Malate synthase AcetylCoA oxidase, Lactonohydrolase AcetylCoA acetyltransférase	Ubiquinol cytochrome c reductase	α-ketoglutarate sulfonate dioxygenase enolase	O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase
Organisation cellulaire			
E-MAP 115 Tubulin α septin **Chitin synthase**	Hydrophobines Tubulin α, Tubulin β Arp 2/3, Chitinase like protein Sphingomyelinase		Hydrophobin-3 precursor Tubulin α
Défense cellulaire			
SUG1 26S proteasome	Thioedoxine reductase		Metallothionein, Rehydrin-like protein
Synthèse protéique et règulation			
BIP protein, TEF (EF1a) Protéine ribosomique 40S *Deoxyhypusine synthase* Homeo box Hox-2.6, *Disulfide isomérase*	Protéines ribosomiques Facteur d'élongation EF4a TEF (EF1a)	Protéine ribosomique 60S	Protéine ribosomale L41 Protéine ribosomique acide P2
Mécanismes de transport			
Canal calcique voltage dependant β importin, LB Aut7 Ca^{2+} transporting ATPase	Phosphate transporter FUN 34		Sous unité coatomer zeta synthaxin
Signal transduction, énérgie			
PF6.2 Protéine ras	CPC2 Protein kinase receptor, Transducin ATP synthase, GTP binding protein Sensory transduction histidine kinase	Nucleoside diphosphate kinase	

Au début de mon travail de thèse, seuls les résultats issus d'études ciblées ou de l'analyse des banques d'ESTs présentées ci-dessus étaient disponibles. Depuis, et grâce notamment aux techniques de filtres à haute densité, les niveaux d'expression de milliers de gènes ont pu être comparés entre mycorhize et champignon en culture pure ou mycorhize et racines non mycorhizées. Ces techniques ont l'avantage de concerner un grand nombre de gènes présents dans les banques d'ADNc et de travailler sans à priori. Voiblet et al. (2001) ont dans un premier temps réalisé une banque suppressive et soustractive (SSH) qui a permis d'enrichir en gènes SR (Symbiosis Regulated), la population d'ADNc spécifique de la mycorhize formée par *Pisolithus tinctorius/Eucalyptus globulus*. Puis une analyse de l'expression de ces gènes a été menée par la technique des filtres à ADNc. D'autres équipes ont depuis utilisé cette approche globale d'étude d'expression de gènes (Podila et al., 2002, Polidori et al., 2002, Johansson et al., 2004 ; Duplessis et al., 2005). Bien que les études menées par ces différentes équipes aient été effectuées sur des modèles ectomycorhiziens différents et dans des conditions de cultures différentes, les gènes ou du moins les fonctions qui sont stimulées dans la mycorhize par rapport au champignon en culture pure sont les mêmes (Tableau 5). Une partie de ces gènes codent des protéines impliquées dans les fonctions métaboliques comme la glycolyse ou la gluconéogénèse. D'autres sont impliqués dans l'organisation cellulaire comme les gènes codant les hydrophobines et tubulines qui se retrouvent, quel que soit le modèle mycorhizien considéré. Comme décrit précédemment, l'établissement de la symbiose entraîne des réactions de défense chez la plante mais aussi chez le champignon. Ceci se traduit par une stimulation de l'expression de gènes codant des métallothionéines ou des thioredoxines fongiques. De nombreuses protéines ribosomiques sont surexprimées dans la mycorhize attestant des modifications métaboliques importantes que subit le champignon pour la formation de l'organe symbiotique. D'autres gènes ont aussi été identifiés comme étant impliqués dans des mécanismes de transport et de transductions de signaux qui pourraient refléter un dialogue moléculaire et un échange entre les deux partenaires (Tableau 5). Concernant le partenaire végétal, les gènes surexprimés dans la mycorhize par rapport aux racines non mycorhizées codent essentiellement pour des protéines ribosomiques et des metallothionéines soulignant les fonctions de défense que la racine met en place au contact du champignon (Johansson et al., 2004).

Des gènes fongiques voient leur expression diminuée en contact avec la racine. Johansson et al., (2004) ont identifié plusieurs gènes intervenant dans le métabolisme des

Scuthèque bibliouniversitaire

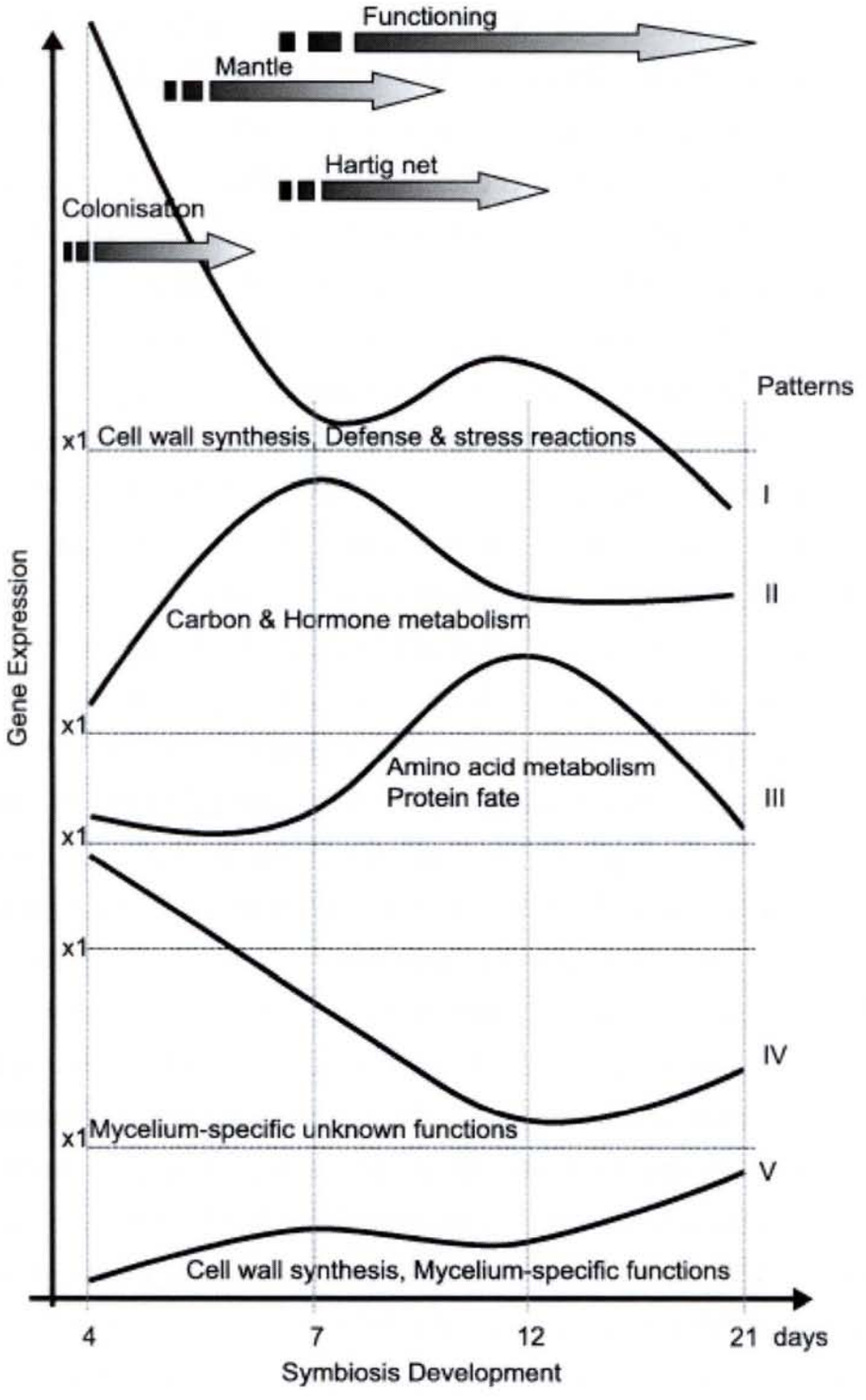


Figure 13: Représentation des différentes fonctions métaboliques impliquées dans l'ontogénèse de l'ectomycorhize formée par Pisolithus et Eucalyptus. Ce schéma est basé sur l 'identification de profils communs d'expression de gènes fongiques et végétaux au cours du temps, grâce à une approche transcriptomique globale. D 'après Duplessis et al., (2005).

lipides, comme les gènes codant une chorismate synthase, phosphorylcholine transférase ou steroyl desaturase dont l'expression en symbiose était inférieure à celle de *P. involutus* en culture pure. Cependant, l'étude de l'association Pisolithus/Eucalyptus montrent que d'autres gènes codant des protéines du métabolisme des lipides ne sont pas régulés par l'état symbiotique, et que l'expression du gène codant une choline-P cytidylyltransferase végétale est surexprimée (Duplessis et al., 2005). Cet exemple est une manifestation de la complexité des systèmes de régulation transcriptionnels mis en jeu pour le fonctionnement de la structure symbiotique et il est par conséquent difficile d'affirmer qu'une fonction métabolique est sur- ou sous- exprimée dans l'organe symbiotique sans prendre en comptela majorité des gènes codant les protéines impliquées dans cette fonction.

Concernant l'association *Pisolithus tinctorius/Eucalyptus globulus*, les gènes les plus réprimés dans la mycorhize sont des gènes de la plante codant essentiellement des protéines ribosomiques. La répression des gènes fongiques décrite précédemment et l'activation des gènes codant ces protéines dans la plante, est la preuve d'une importante réorganisation métabolique au sein de la racine lors de l'établissement de la symbiose. Dans l'association *Paxillus involutus/Betula pendula*, les gènes de la plante les plus réprimés codent des protéines qui se lient à la chlorophylle, des protéines du métabolisme (ribulose 1,5bisphophate kinase, tropinine reductase, beta-glucosidase), une glutathione-S-transférase, une protéine ribosomique S29, une aquaporine TIP3 et un facteur de ADP-ribosylation.

Très récemment, une étude plus approfondie a permis la comparaison de l'expression de gènes de *Pisolithus microcarpus* et *Eucalyptus globulus* lors des différents stades de développement de l'ectomycorhize (Duplessis et al., 2005). Les résultats montrent que les fonctions cellulaires impliquées varient en fonction de l'ontogénèse de l'organe symbiotique (Figure 13). Les premières étapes de la colonisation mettent en oeuvre des gènes codant des protéines impliquées dans les réactions de défense de la plante, et de l'élaboration de la paroi comme les hydrophobines et mannoprotéines, nécessaires à la formation du manteau. Aux stades plus avancés, les gènes majoritairement surexprimés sont ceux impliqués dans les grandes fonctions métaboliques comme la glycolyse, le cycle de Krebs ou les voies de synthèse des acides aminés, marqueurs d'une ectomycorhize fonctionnelle.

Il est à noter que la majorité des études réalisées jusqu'à présent concernent l'expression des gènes fongiques au cours de la symbiose. En revanche, peu de données concernant les gènes des plantes associées sont disponibles. Cette différence semble être

Synthèse bibliographique

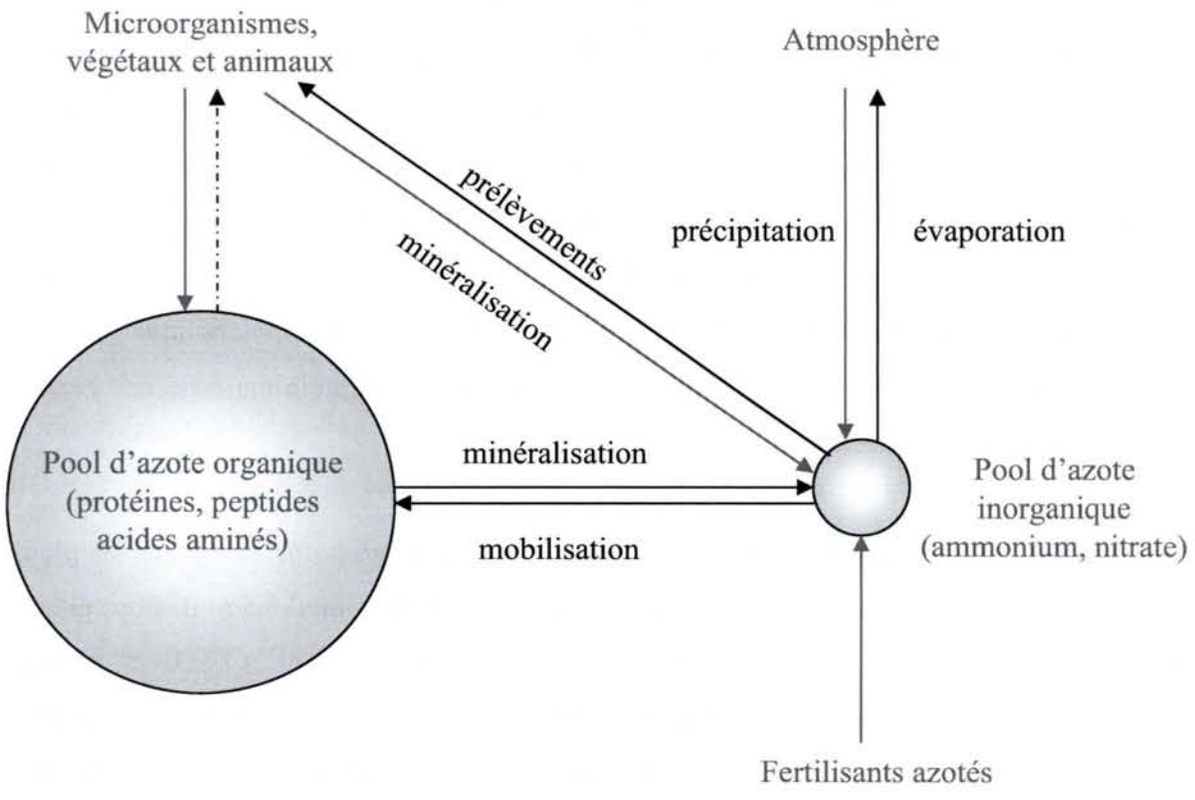


Figure 14: Principales sources et processus de transfert des deux formes azotées majoritaires dans les sols (d'après Brady, 1990).

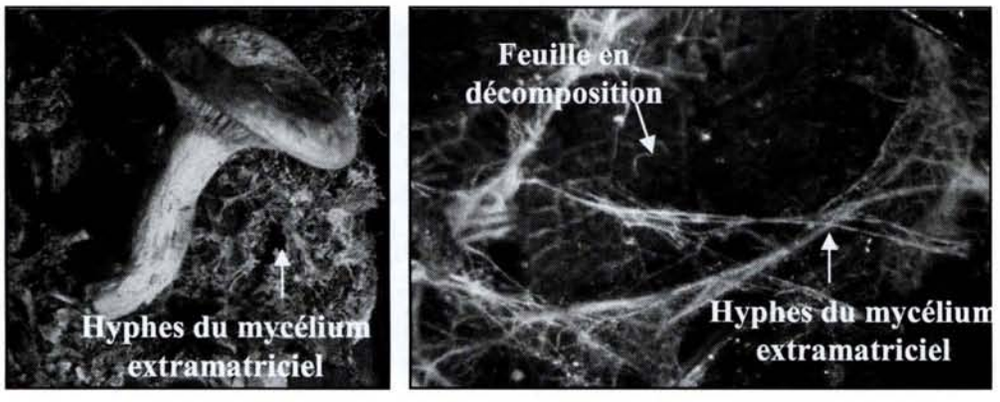


Figure 15: *Paxillus involutus* se développant directement sur des feuilles de la litière.

davantage liée à un manque de données plutôt qu'à une faible modification de leur expression en symbiose. En effet Johansson et al. (2004) ont mis en évidence une régulation différentielle de 93 ADNc fongiques et 102 ADNc végétaux dans la mycorhize par rapport à *P. involutus* et *B. pendula* considérés séparément.

Ce type d'approche a permis de cribler de nombreux gènes impliqués dans le fonctionnement symbiotique. Ceci ouvre d'importantes perspectives concernant la compréhension des fonctions métaboliques et physiologiques impliquées dans l'établissement et le fonctionnement d'une symbiose ectomycorhizienne efficace.

2. Rôle des champignons ectomycorhiziens dans la nutrition azotée des plantes.

L'azote est un élément indispensable à la vie des organismes puisqu'il intervient dans la composition des enzymes, de la chlorophylle, des acides aminés et donc des protéines. Il est indispensable à l'utilisation des squelettes carbonés sucrés par les plantes pour la production de biomasse. La majorité de l'azote des sols forestiers se trouve sous forme d'azote organique en particulier des protéines ou d'autres composés qui sont généralement associés à de l'humus ou de l'argile. De ce fait, la quantité d'azote minéral sous forme d'ammonium et de nitrate est restreinte. Elle représente 1 à 2 % de l'azote total d'un sol étant donné que le taux de minéralisation de l'azote organique est de 2 à 3% par an en condition de sol standard et que les processus de lessivage et de volatilisation sont importants (Brady, 1990) (Figure 14). Bien que l'une des particularités des champignons ectomycorhiziens soit d'avoir accès aux formes organiques de l'azote des sols forestiers, ceux-ci prélèvent préférentiellement les formes d'azote inorganiques telles que l'ammonium ou le nitrate même lorsqu'elles sont présentes dans les sols forestiers à de très faibles concentrations (Finlay et al., 1992).

2.1. Mobilisation de la matière organique du sol

Bien que des études aient montré que les champignons ectomycorhiziens étaient plus efficaces dans la mobilisation du phosphore de la litière que dans celle de l'azote (Chuyong et al., 2002), il est clairement établi qu'ils sont également capables d'utiliser cette source d'azote complexe (Figure 15). L'addition de patches de litière à des plants mycorhizés ou non, a montré que le champignon était capable de mobiliser très rapidement cette source d'azote, ce qui se traduit par un changement de coloration des feuilles de la plante hôte dès les premiers

Surbèze bibliouvrbizou

jours après traitement, suggérant une amélioration de la nutrition. Après un mois en présence de litière, les concentrations en azote et phosphore des plants mycorhizés sont nettement supérieures à celles des plants non mycorhizés (Tibbett et al., 2002). L'exploitation de différents types de litière (hêtre, bouleau et Pin) par *P. involutus* associé au bouleau a résulté en une diminution du contenu en azote majoritairement de la litière de hêtre et à une augmentation du contenu en azote à la fois du champignon et de la plante associée (Perez-Moreno et Read, 2000). Les auteurs concluent cependant que l'acquisition d'azote est très faible par rapport à celle du phosphore pour cette association symbiotique. En revanche, d'autres études menées sur *Suillus bovinus* et *Thelephora terrestris* associés à *P. sylvestris,* ont montré que le premier réduisait de 23% le contenu en azote et phosphore de la litière et le second réduisait de 13% le contenu en azote mais ne réduisait pas celui en phosphore (Bending et Read, 1995). Les capacités de mobilisation de la matière organique semblent donc être dépendantes à la fois des espèces fongiques et du type de substrat. Wallander (2002) a utilisé du mycélium marqué à l'azote ^{15}N mélangé à de la tourbe et du sable comme source d'azote organique en microcosme. Dans ce cas, il a clairement montré que *Pinus sylvestris* prélève plus de ^{15}N lorsqu'il est mycorhizé par des souches de *Paxillus involutus* ou *Suillus variegatus* et que, pour certains champignons, ce prélèvement est pH dépendant. La mobilisation azotée des champignons ectomycorhiziens est donc un marqueur à prendre en compte pour les études de diversité fonctionnelle fongique au sein des écosystèmes forestiers.

La dégradation de la matière organique par les champignons ectomycorhiziens leur permet d'en libérer des protéines, peptides et acides aminés. L'importance des protéines dans la nutrition azotée de plants ectomycorhizés a été largement étudiée par Abuzinadah et Read (1986a,b,c). Ils se sont d'abord intéressés aux capacités du champignon à utiliser des peptides et des protéines. Les tests de croissance in vitro, utilisant la BSA comme source d'azote protéique ont permis d'identifier 3 catégories de champignons que les auteurs ont qualifiées de « non protein fungi », « protein fungi » et une catégorie intermédiaire selon la capacité des champignons à pousser sur la BSA (Abuzinadah and Read,1986a). Lorsque ces champignons sont en association symbiotique, la biomasse des plants est bien supérieure à celle des plants non mycorhizés qui sont incapables, du moins pour certaines espèces, d'utiliser la BSA comme seule source d'azote (Abuzinadah and Read,1986b, c). Ces résultats ont suggéré que les champignons ectomycorhiziens excrétaient des exoprotéases, et d'autant plus lorsque la BSA est remplacée dans le milieu de culture par une protéine issue de la litière (El-Badaoui et Botton, 1989). En effet, une protéinase acide a été purifiée et caractérisée chez *Hebeloma*

Synthèse bibliographique

crustiliniforme (Zhu et al., 1990). Deux autres protéases ont été isolées chez *Amanita muscaria* et l'expression du gène codant l'une d'entre elles est stimulée dans les hyphes du réseau de Hartig par rapport au manteau des ectomycorhizes formées avec le peuplier (Nehls et al., 2001).

2.2. Mécanisme de transport des différentes formes azotées

L'efficacité de la symbiose ectomycorhizienne repose essentiellement sur les capacités du champignon à prélever des éléments du sol et à les acheminer jusqu'aux cellules racinaires. La connaissance de ces mécanismes de transport et surtout leur régulation est donc primordiale pour la compréhension de la nutrition des plantes.

2.2.1. Mécanismes de transport du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire.

2.2.1.1. Transport de l'azote organique

Les capacités protéolytiques du champignon sont de toute évidence associées au transport des produits de digestion c'est-à-dire les acides aminés et peptides. Les acides aminés ne diffusent pas à travers la membrane plasmique, mais sont véhiculés par des transporteurs. Des cinétiques d'absorption d'acides aminés marqués au ^{14}C ont été déterminées sur des apex ectomycorhiziens de différentes associations symbiotiques (Wallenda et Read, 1999). Pour chaque association, les auteurs ont mis en évidence des systèmes de transport de haute affinité avec des Km de 19 à 233 mmol. m^3. Ces paramètres cinétiques sont du même ordre de grandeur que ceux déterminés lors de l'absorption de méthylammonium, un analogue de l'ammonium. Ceci indique que le champignon présente les mêmes capacités d'absorption de ces formes d'azote organique que de l'ammonium, ce qui suggère qu'elles peuvent représenter une part importante de l'azote prélevé par les champignons ectomycorhiziens. Ces systèmes de transport sont des systèmes de co-transport couplés à des gradients de protons, ce qui les rend sensibles à des modifications de pH. A un pH supérieur à 6, les acides aminés tels que le glutamate et la glutamine sont chargés négativement et ne sont donc plus transportés à travers la membrane plasmique (Chalot et Brun, 1998). Les caractéristiques cinétiques du transport d'acides aminés ont été déterminées pour *P. involutus* (Chalot et al., 1994a, 1994b ;1996). Il a été montré que ces systèmes de transport étaient des systèmes actifs de symport protons dépendant, qui pouvaient transporter

Cathèque bibliuniversitaire

du glutamate, de la glutamine, de l'alanine et de l'aspartate. Des gènes codant des transporteurs généraux d'acides aminés ont été identifiés et caractérisés pour *Amanita muscaria* (Nehls et al., 1999) et *Hebeloma cylindrosporum* (Wipf et al., 2002). Le gène isolé chez *A. muscaria* est surexprimé en état de carence azotée ou en présence de nitrate, une source azotée non privilégiée par le champignon. Il s'agit d'un transporteur de forte affinité avec un spectre très large d'absorption. HcGAP, le transporteur général d'acides aminés isolé chez *Hebeloma cylindrosporum* par complémentation de levure déficiente en transport d'histidine présente néanmoins un large spectre d'absorption. Les auteurs ont montré que l'expression du gène codant ce transporteur était plus importante dans les hyphes extramatriciels que dans les mycorhizes. Ceci suggère un rôle de ce transporteur dans l'acquisition d'acides aminés du sol par le champignon.

Les données concernant le transport de peptides sont très partielles du fait probablement de la difficulté à éviter la dégradation des peptides du milieu par les activités peptidases du champignon. Il a cependant été montré que des champignons comme *Laccaria laccata*, *Suillus bovinus* ou *Rhizopogon luteolus* étaient capables d'utiliser différents peptides d'alanine comme seule source d'azote (Abuzinadah et Read, 1986a). Ces capacités d'utilisation sont tout de même fonction de la taille des peptides ; les longs peptides tels que l'hexa-alanine sont très peu utilisés comparativement aux plus petits peptides. Ces résultats ont été confirmés à l'état symbiotique, où *Paxillus involutus* est capable d'utiliser des peptides et de transférer l'azote au plant de bouleau associé (Abuzinadah et Read, 1989). Au niveau moléculaire, la plupart des données disponibles sont issues de travaux menés sur *S. cerevisiae*. En particulier, trois membres de la famille PTR (Peptide Transporter) ont été identifiés et caractérisés (Perry et al., 1994). Seulement un des trois semble avoir des propriétés de transport (*Sc*PTR2), les deux autres ayant plutôt des propriétés de régulation du transport (*Sc*PTR1 et *Sc*PTR3) (Barnes et al., 1998). Concernant les transporteurs de peptides de champignons ectomycorhiziens, aucune donnée n'est actuellement disponible au niveau moléculaire.

2.2.1.2. Transport de l'azote inorganique

L'azote sous forme inorganique est représenté par l'ammonium et le nitrate. Les cinétiques de transport de l'ammonium et de son analogue, le méthylammonium ont été caractérisées pour *Paxillus involutus* (Javelle et al., 1999). Il a été montré que *Paxillus*

Synthèse bibliographique

involutus avait de plus grandes capacités de prélèvement de l'ammonium que les racines non mycorhizées permettant de ce fait, d'augmenter significativement la nutrition azotée de la plante hôte associée lors de la symbiose. Les premiers gènes de basidiomycètes codant des transporteurs d'ammonium ont été clonés et caractérisés chez *Hebeloma cylindrosporum*. Ces gènes, nommés HcAmt 2 et 3, appartiennent à la famille des Mep/Amt. Ils sont régulés négativement par l'ammonium et leur expression est stimulée en condition de carence azotée (Javelle et al., 2001). De plus, HcAmt3 a une capacité d'absorption plus importante mais une affinité plus faible que HcAmt2 pour le méthylammonium. Ces différences pourraient être primordiales dans l'adaptation du champignon aux conditions ammoniacales du sol, suggérant la mise en jeu de différents processus de prélèvement de l'azote en fonction des conditions environnementales. Un autre membre de cette famille de transporteur d'ammonium a été isolé pour *Tuber borchii* (TbAmt1). Il s'agit d'un transporteur de forte affinité qui lui aussi est régulé positivement au niveau transcriptionnel par une carence azotée (Montanini et al., 2002). Soupene et al. (2002) ont conclu lors d'une étude menée sur *Salmonelle thyphimurium*, que les transporteurs de la famille Amt permettaient d'augmenter le taux de diffusion des espèces non chargées NH_3 à travers la membrane plasmique. Ils ont montré que ces transporteurs fonctionnaient à des pH basiques où la forme NH_3 prédomine, ce qui les a amenés à penser que ces protéines assuraient un transport facilité de gaz.

L'efficacité de la symbiose ectomycorhizienne concernant le prélèvement de nitrate a été démontrée pour les mycorhizes de *Rhizopogon roseolus* associé à *Pinus pinaster*. En effet, les ectomycorhizes présentaient des capacités d'absorption du nitrate supérieures à celles des racines non mycorhizées et ce, quel que soient les concentrations en nitrate extracellulaire (Gobert et Plassard, 2002). Un transporteur de nitrate a été caractérisé chez *Hebeloma cylindrosporum* (Jargeat et al, 2003). C'est un transporteur de forte affinité dont l'expression du gène est réprimée en présence d'ammonium mais activée en état de carence azotée ou en présence de nitrate ou d'azote organique. Les auteurs ont montré que ce gène faisait partie d'un cluster associant les gènes de la nitrite réductase et la nitrate réductase, cette dernière devant être fonctionnelle pour un prélèvement efficace du nitrate chez les champignons, contrairement aux plantes (Unkles et al., 2004).

Synthèse bibliographique

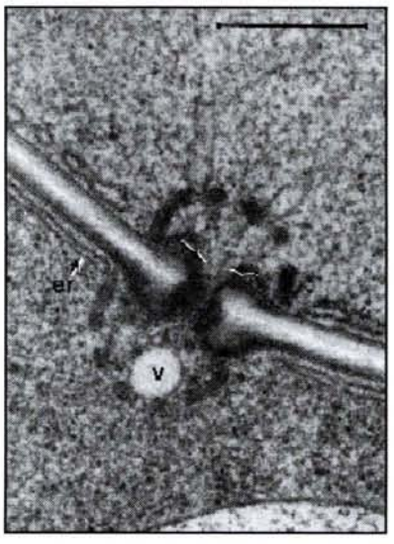


Figure 16: Dolipore vu en microscopie électronique à transmission; V: vacuole; Er: réticulum endoplasmique.D'après Shepherd et al. (1993)

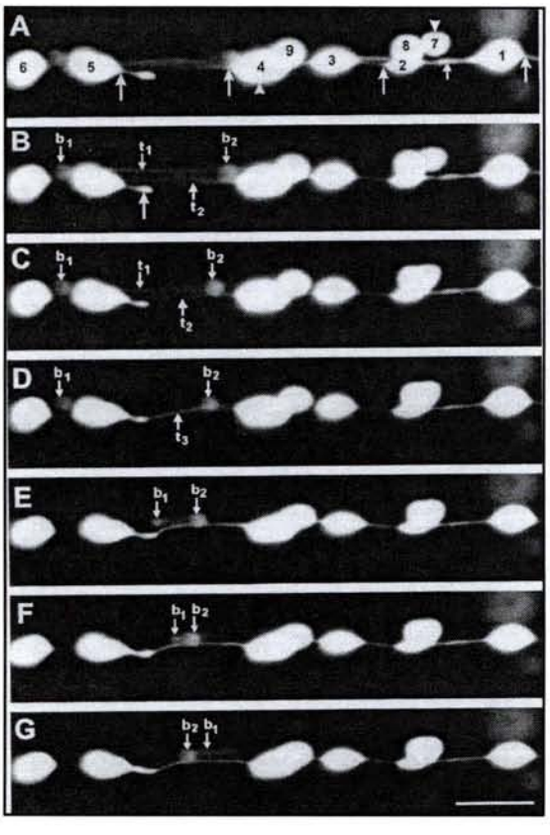


Figure 17: Séquences d'une vidéo montrant la mobilité des vacuoles par microscopie à épifluorescence.

La vacuole 7 se déplace lentement le long de la membrane plasmique jusqu'à fusionner avec la vacuole 8. Des tubules permettent la connexion entre vacuoles. Deux corps fluorescents (b1 et b2) se déplacent le long de ces tubules en même temps que la vacuole 5 fusionne avec la vacuole 4. D 'après Cole et al. (1998).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

2.2.2. Mécanismes de translocation au sein des hyphes

L'utilisation de marqueurs isotopiques et notamment de l'azote ^{15}N a permis de démontrer qu'il existait véritablement un transfert de composés azotés du sol vers la plante par l'intermédiaire des hyphes mycéliens (Finlay et al., 1988). Ce transfert de composés au sein du mycélium extramatriciel a lieu probablement grâce à des transporteurs spécifiques mais aucune étude n'en a réellement fait la démonstration. En revanche, il a été montré que la motilité des vacuoles au sein des hyphes des champignons ectomycorhiziens pouvaient permettre la translocation de certains composés. L'extension de microtubules à travers les dolipores (pores des basidiomycètes) permet aux vacuoles de deux cellules adjacentes de fusionner pour permettre les échanges de composés de cellule à cellule (Figure 16). Ces résultats ont été obtenus grâce à des fluorochromes dont la migration d'hyphe en hyphe a été visualisée chez *Pisolithus tinctorius* au cours du temps et capturée en vidéo (Shepherd et al., 1993 ; Hyde et al., 1997 ; Cole et al., 1998) (Figure 17). Il a été postulé que ces mouvements pouvaient être bidirectionnels et s'opérer sur de relativement grandes distances (Ashford, 1998). Les vacuoles contiennent des composés phosphatés sous forme d'orthophosphate ou de polyphosphate généralement associés à du Ca^{2+} ou de l'arginine, et azotés sous forme de molécules de haut poids moléculaire et d'acides aminés (Ashford, 1998). Ce système de transport pourrait donc jouer un rôle important dans la translocation de nutriments soit vers l'apex des hyphes en croissance soit vers le mycélium en contact avec les cellules racinaires de la plante associée.

2.3. Assimilation de l'azote par les champignons ectomycorhiziens

2.3.1. Les voies enzymatiques impliquées

Les ions NO_3^- prélevés à partir de la solution du sol, sont métabolisés en ammonium par la nitrate réductase et la nitrite réductase. Ainsi l'ammonium, soit directement prélevé dans la solution du sol, soit issu de la nitrification, est à l'origine de la biosynthèse des acides aminés. Pour se faire, deux voies enzymatiques différentes peuvent être impliquées dans l'assimilation primaire de l'ammonium (Figure 18):

- La voie GS/GOGAT : l'ammonium est incorporé par la glutamine synthétase (GS) pour la formation de glutamine à partir de glutamate. Cette étape est énergie dépendante. La

Synthèse bibliographique

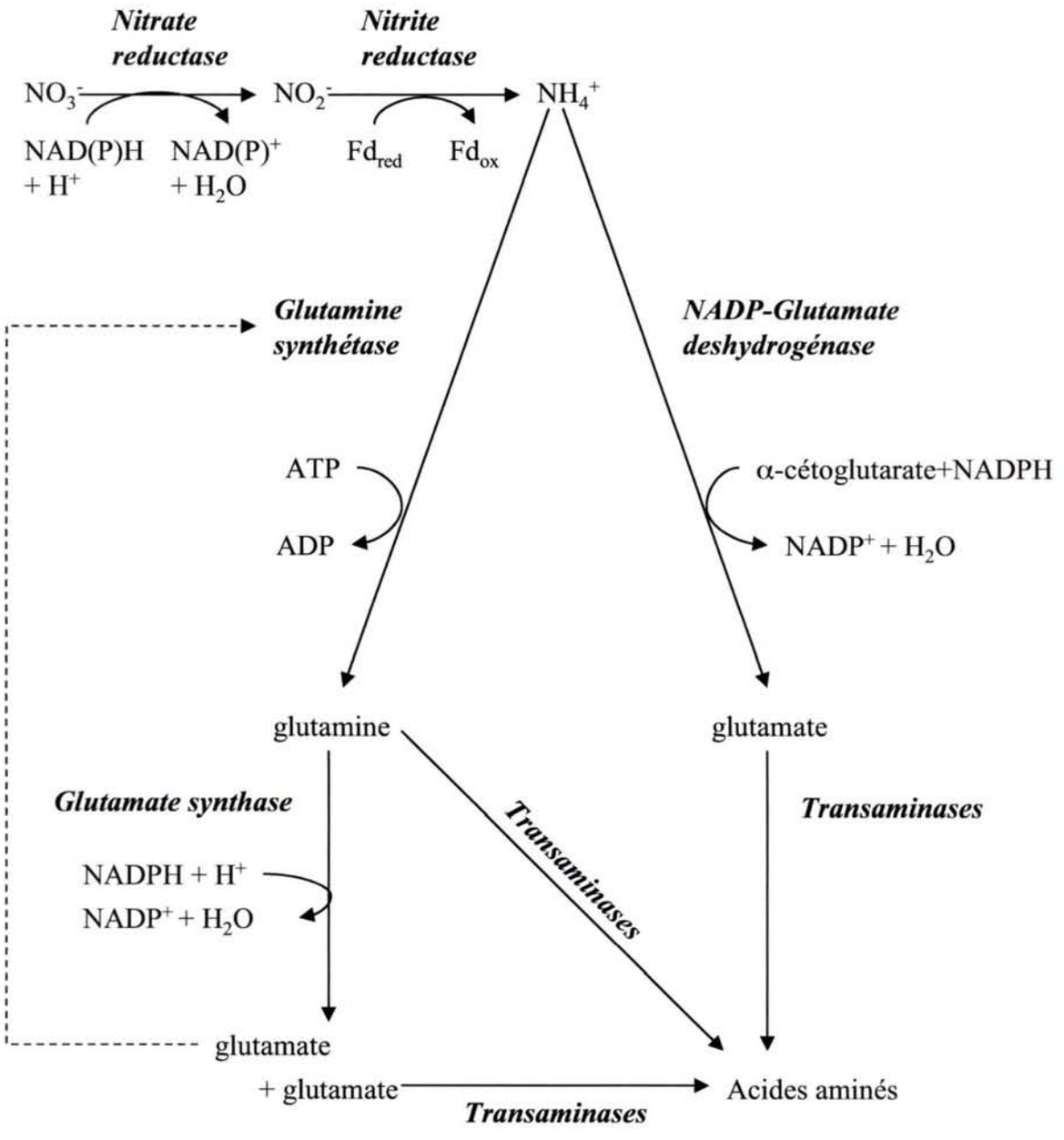


Figure 18: Voies d'assimilation de l'azote inorganique chez les champignons ectomycorhiziens.

glutamate synthase (GOGAT) est ensuite responsable de la formation de 2 molécules de glutamate à partir de glutamine et d'α-cétoglutarate.

- La voie GDH à NADP : la glutamate deshydrogénase (GDH) catalyse l'amination de l'α-cétoglutarate en glutamate.

Le glutamate ainsi formé peut ensuite être à l'origine de la formation d'autres acides aminés et particulièrement l'alanine et l'aspartate grâce à l'activité des enzymes alanine aminotransférase et aspartate aminotransférase respectivement.

La voie GS/GOGAT est dite de haute affinité puisque la GS présente un faible Km pour l'ammonium, de l'ordre du μM, alors que celui de la GDH à NADP est de l'ordre du mM. On peut alors supposer que les deux voies fonctionnent de concert pour permettre au champignon d'assimiler l'ammonium en conditions de faibles ou fortes concentrations en ammonium dans le sol. Cependant, alors que la fonctionnalité de la GDH à NADP pour les champignons ectomycorhiziens, a été prouvée pour *Laccaria laccata* (Lorillou et al., 1996 ; Brun et al., 1992), *Tuber borchii* (Vallorani et al., 2002), *Hebeloma cylindrosporum* (Chalot et al.,1991) et *Cenococcum geophilum* (Martin et al., 1988), aucune activité n'a pu être détectée pour *Paxillus involutus* et *Pisolithus tinctorius* (Kershaw et stewart, 1992 ; Chalot et al., 1994b, Botton et Dell 1994). En employant des techniques complémentaires comme des mesures d'activités et l'utilisation de marqueurs isotopiques associés à un inhibiteur métabolique spécifique de la GS, la participation de la voie GDH à NADP a été mise en évidence pour quelques champignons ectomycorhiziens seulement alors qu'aucune étude n'a fait état d'une absence d'activité GS (Tableau 6). La NADP-GDH pourrait alors être un bon marqueur de diversité fonctionnelle concernant la nutrition azotée des champignons ectomycorhiziens.

Les différences d'affinité pour l'ammonium des deux voies enzymatiques engendrent des différences de discrimination isotopique de l'azote. En utilisant les profils d'abondance isotopique naturelle et ces différences de discrimination au sein des deux voies enzymatiques, Henn et al. (2004) ont émis l'hypothèse d'un shift des mécanismes d'assimilation de l'ammonium au cours du temps et de la production de biomasse. Cette observation rejoint celle de Martin et al., (1988) qui avaient suggéré que la NADP-GDH interviendrait en phase

Scuthèse bibliographique

Tableau 6 : Présence ou absence de la NADP-GDH chez différentes espèces de champignons ectomycorhiziens.
(+)présence de la NADP-GDH et (ND) présence non détectée.

Espèce fongique	NADP-GDH	Niveaux de détection	Références
Laccaria bicolor	+	Activité	Botton and Dell, 1994
		Tests immunologiques	Brun et al., 1992, 1993, 1994
			Lorillou et al., 1996
Cenococcum geophilum	+	Activité	Dell et al., 1989
		Tests immunologiques	Martin et al., 1988
		Incorporation ^{15}N	
Cenococcum graniforme	+	Activité	Martin et al, 1983
		Tests immunologiques	Martin, 1985
		Incorporation ^{15}N	
Hebeloma crustiliniforme	+	Activité	Dell et al., 1989
		Tests immunologiques	
Hebeloma cylindrosporum	+	Activité	Chalot et al., 1991
		Expression génique	Javelle et al., 2003
Tuber borchii	+	Activité	Vallorani et al., 2002
		Expression génique	
Suillus bovinus	ND	Activité	Grotjohann et al., 2000
Scleroderma verrucosom	ND	Activité	Botton and Dell, 1994
Lactarius subdulcis	ND	Activité	Martin et al., 1986
Paxillus involutus	ND	Activité	Dell et al., 1989
		Tests immunologiques	Chalot et al., 1994b
Pisolithus tinctorius	ND	Activité	Botton and Dell, 1994
		Incorporation ^{15}N	Kershaw and Stewart, 1992

stationnaire de croissance chez *Cenococcum geophilum*. D'autres auteurs ont suggéré que la NADP-GDH était impliquée dans le développement des carpophores (Stewart et Moore, 1974), lors de conditions hypersosmotiques (Alba-Lois et al., 2004) ou de limitation en énergie puisque cette voie d'assimilation de l'ammonium est ATP indépendante (Helling, 1994).

Chez les plantes supérieures, le rôle de la NADP-GDH est encore mal connu. Des équipes ont émis plusieurs hypothèses : la NADP-GDH jouerait un rôle dans la réassimilation de l'ammonium issu de la photorespiration et fonctionnerait dans un but de détoxification (Melo-Oliveira et al., 1996). L'enzyme pourrait aussi compenser la diminution de l'activité de la Fd-GOGAT en période de sénescence (Masclaux-Daubresse et al., 2002). Récemment, Glevarec et al., (2004) ont montré en inhibant spécifiquement la GS, que la NADP-GDH n'était pas impliquée dans l'assimilation de l'ammonium chez *Medicago truncaluta*. L'expression hétérologue de la NADP-GDH d' *Aspergillus nidulans* dans *Lycopersicon esculentum* (Kisaka et Kida, 2003), et celle de *Chlorella sorokiniana* dans des plants de tabac (Huang et al., 2002) montre que son activité serait un atout en terme de nutrition ammoniacale de la plante. Les raisons pour lesquelles les plantes n'exploitent pas cette voie d'assimilation de l'ammonium restent alors obscures.

Dans les ectomycorhizes, trois modèles d'incorporation de l'ammonium ont été proposés (Martin et Botton, 1993) (Figure 19) :

- Dans les mycorhizes de Conifères ou de l'association *Eucalyptus sp/ Hebeloma westraliensis*, l'assimilation d'ammonium s'effectue dans les cellules fongiques par l'action séquentielle de la NADP-GDH et la GS. Dans ce cas, la glutamine serait transférée aux cellules racinaires et la GOGAT serait active dans les cellules de la plante.

- Dans les mycorhizes de Hêtre ou de l'association *Eucalyptus* sp/*Laccaria laccata*, la GS serait seule responsable de l'assimilation de l'ammonium dans les cellules fongiques. Aucune activité NADP-GDH n'a été détectée dans le compartiment fongique, ni le compartiment racinaire. Comme décrit précédemment, la glutamine serait transférée aux cellules racinaires où elle serait métabolisée en glutamate par la GOGAT.

Synthèse bibliographique

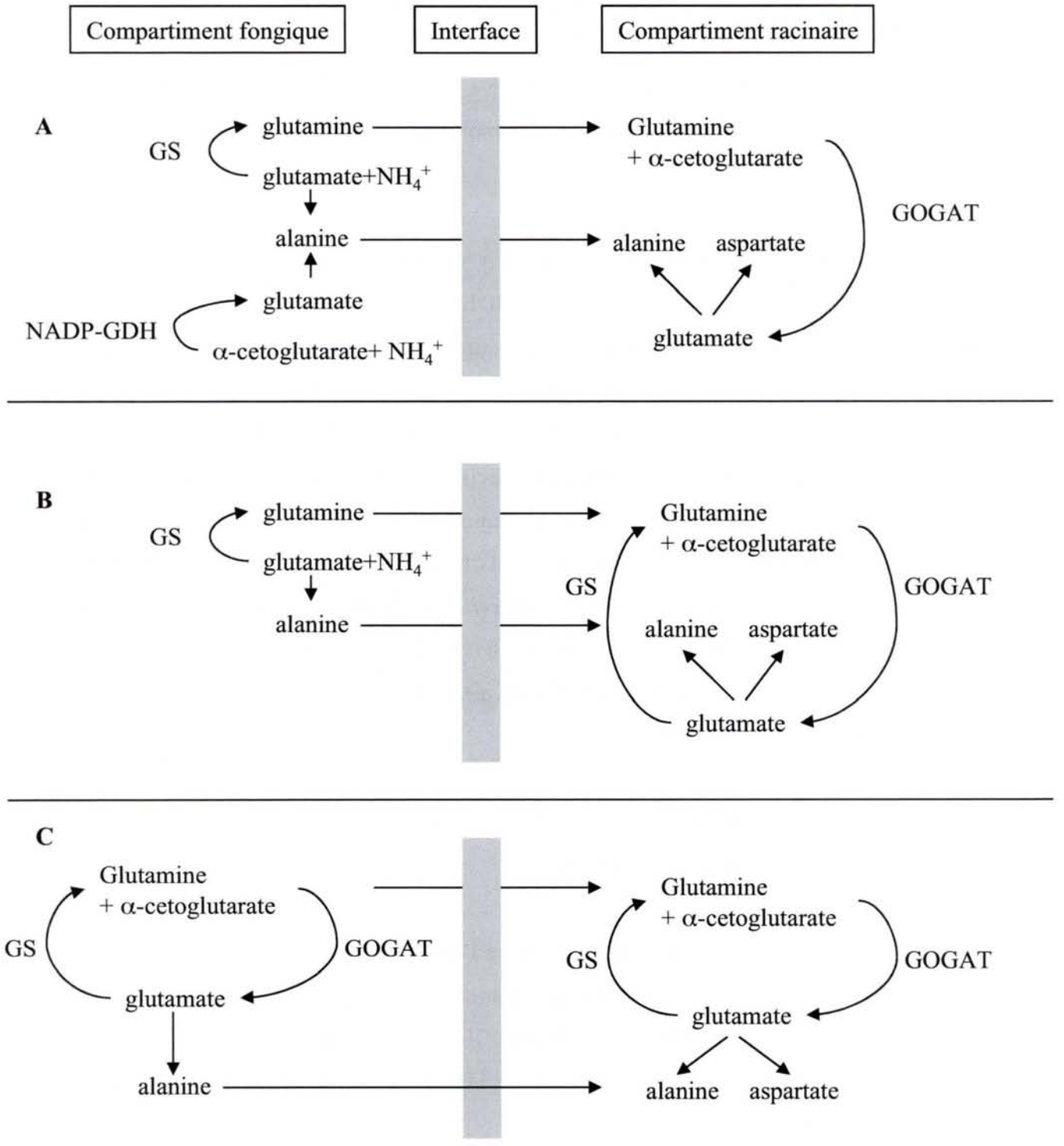


Figure 19: Modèles de l 'incorporation de l 'ammonium dans les ectomycorhizes, d 'après Martin et Botton, (1993).

A: modèle proposé pour l 'association *Eucalyptus* sp/*Hebeloma westraliensis*
B: modèle proposé pour l 'association *Eucalyptus* sp/*Laccaria laccata*
C:modèle proposé pour les associations présentant *Paxillus involutus* ou *Pisolithus tinctorius* comme partenaire fongique.

- Dans les mycorhizes faisant intervenir *Paxillus involutus* ou *Pisolithus tinctorius,* l'assimilation de l'ammonium serait assurée par le cycle GS/GOGAT dans le compartiment fongique. Aucune participation de la NADP-GDH n'a été mise en évidence.

La diversité d'incorporation de l'ammonium, illustrée par ces trois modèles est la preuve de l'existence d'une coordination métabolique entre les deux partenaires qui impliquent des systèmes de régulation spécifiques au sein des types d'associations considérées. La GS semble être une enzyme ubiquiste, en revanche la participation de la NADP-GDH semble être dépendante non seulement de l'équipement enzymatique du champignon mais aussi de régulations internes, notamment par la glutamine comme cela a été suggéré par Lorillou (1995). Cependant, depuis l'établissement de ces modèles, aucune étude n'a réellement permis de déterminer la cause de la diversité observée concernant la participation de la NADP-GDH dans l'assimilation de l'ammonium chez les champignons ectomycorhiziens et les ectomycorhizes. L'activité de l'aspartate aminotransférase (AAT) fongique est réprimée dans les ectomycorhizes formées par Eucalyptus et *Laccaria laccata*, *Scleroderma verrucosum* et *Pisolithus tinctorius* alors que l'AAT végétale est surexprimée, suggérant que cette enzyme est elle aussi soumise à des processus de régulation complexes au sein de l'organe symbiotique (Botton et Dell, 1994).

2.3.2. Régulation de l'expression des gènes codant les enzymes de l'assimilation de l'ammonium.

La régulation de ces enzymes de l'assimilation de l'ammonium et de l'expression de leurs gènes a été montrée comme étant liée aux concentrations d'azote extracellulaire et par conséquent intracellulaire. Le transfert du mycélium de *Laccaria bicolor* d'un milieu riche en ammonium sur un milieu nitrate ou dépourvu en azote induit une augmentation des taux de transcrits gdh-1 codant la NADP-GDH (Lorillou, 1995). Pour *Tuber borchii*, les gènes codant la GS et la NADP-GDH sont surexprimés en condition de carence azotée par rapport à une condition ammoniacale (Vallorani et al., 2002 ; Montanini et al., 2002). Ikeda et al. (1996) ont suggéré que la diminution du pool de glutamine intracellulaire était le signal d'une condition de carence en azote pour *Salmonella typhimurium*. En conséquence, ces variations du contenu en glutamine seraient aussi à l'origine de la régulation transcriptionnelle des autres enzymes

Synthèse bibliographique

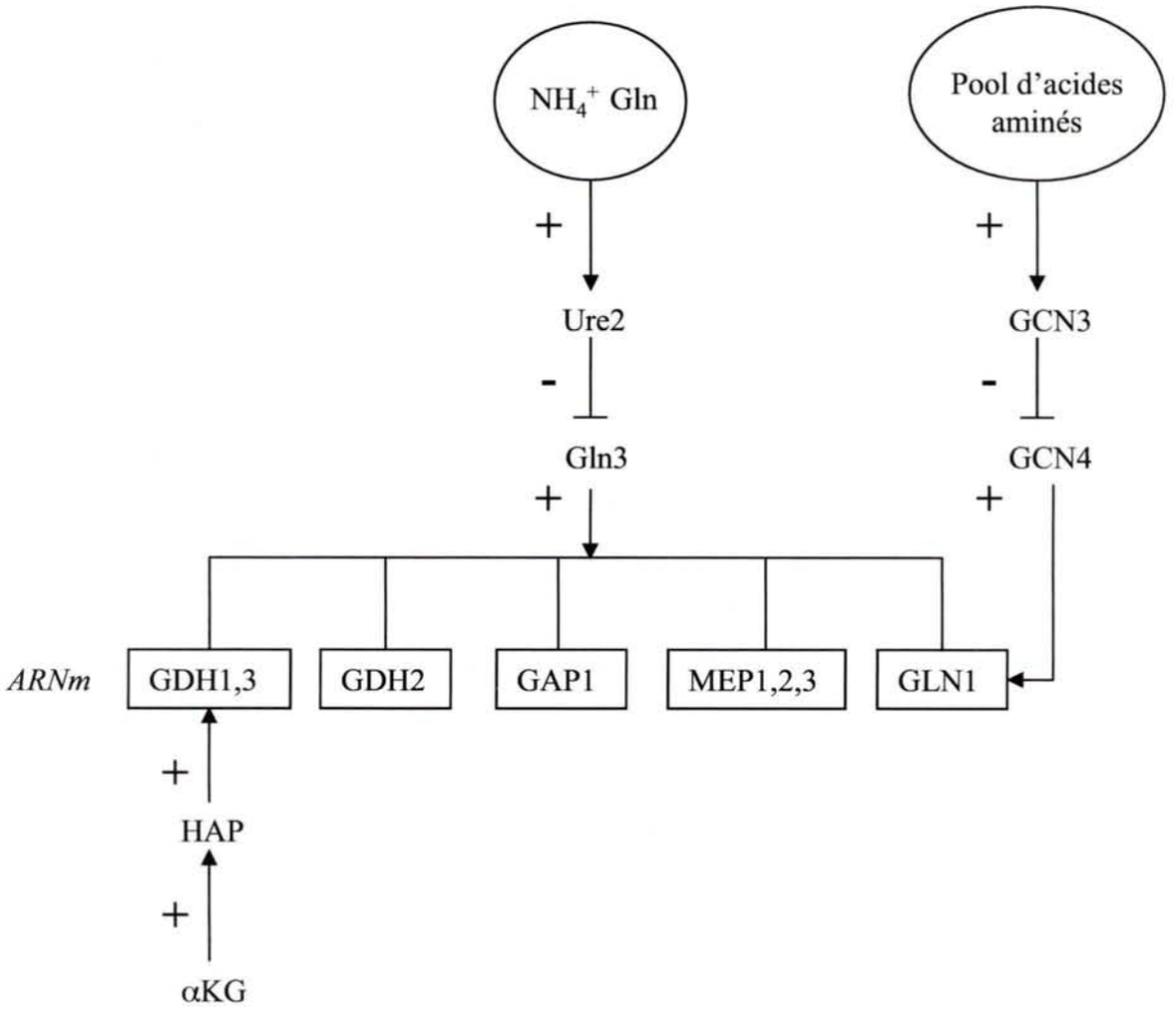


Figure 20: Schéma simplifié des cascades de régulation régissant l'expression de certains gènes du métabolisme azoté. (GDH1,3 codent pour la NADP-GDH, GDH2 pour la NAD-GDH, GAP1 pour la perméase générale d 'acides aminés et GLN1 pour la GS) et MEP 1,2,3 pour des transporteurs d 'ammonium) d 'après Ter Shure et al., 2000). (+) activation et (-) répression de l 'expression génique.

L 'ammonium et la glutamine activent l'expression de Ure2, un répresseur transcriptionnel de Gln3. Cette protéine est un activateur de transcription lorsqu'elle se fixe sur le promoteur du gène d'intérêt. En conséquence, en présence d 'ammonium ou de glutamine, le gène d 'intérêt ne sera pas transcrit.

Le pool d 'acides aminés induit l'inactivation de GCN3 qui ne va plus permettre la synthèse de GCN4, un activateur transcriptionnel des gènes d 'intérêt.

L 'α-cétoglutarate est un effecteur positif de l'activation d 'un complexe régulateur HAP qui va permettre la transcription de GDH1 et 3.

du métabolisme azoté. Ces mécanismes de répression des gènes par la glutamine ont été appelés « Répression catabolique azotée » et ont été largement étudiés pour *Saccharomyces cerevisiae* (Ter Schure, 2000) et *Aspergillus nidulans* (Marzluf, 1997). Ces processus complexes de régulation transcriptionnelle sont présentés de façon simplifiée en figure 20. Ces systèmes de régulation suggèrent l'hypothèse que le champignon détecterait les concentrations ammoniacales extracellulaires dans le but d'adapter ses fonctions de transport et d'assimilation de l'ammonium.

2.3.3. Rôle de la GS dans des processus de régulation transcriptionnelle.

Chez *S. cerevisiae* et *A. nidulans*, la glutamine seule est l'effecteur de la répression transcriptionnelle (Margelis et al., 2001), alors que pour *Gibberella fugikuroi*, la glutamine synthetase est également directement impliquée dans les processus de régulation de certains gènes comme des gènes codant des protéines du métabolisme secondaire tel que la synthèse de pigments ou la CipC, une protéine de fonction inconnue (Teichert et al., 2004). Ce phénomène a aussi été observé pour *Bacillus subtillus* (Wray et al., 2001). En effet, les auteurs ont montré que la GS contrôlait l'expression de certains gènes par un mécanisme d'interaction protéine-protéine avec le facteur de transcription TnrA en bloquant son site d'interaction avec l'ADN, empêchant ainsi la transcription des gènes cibles. Aucune cascade de régulation n'a été mise en évidence pour les champignons ectomycorhiziens, mais on peut aisément supposer que les mécanismes impliqués sont similaires à ceux décrit ci-dessus.

2.4. Mécanismes de transfert à la plante

Comme décrit précédemment, l'efficacité de la symbiose repose sur les capacités du champignon à transférer les éléments nutritifs à la plante (Hobbie et Colpaert, 2003). L'abondance isotopique naturelle ^{15}N semblait être un bon outil à la fois pour déterminer la forme d'azote prélevée dans le sol par le champignon et le transfert à la plante, puisqu'il est aisé de différencier les formes d'azote inorganique et organique en fonction de leur abondance isotopique naturelle. Cependant, Emmerton et al. (2001a, 2001b) ont remis en cause ces techniques en soulignant la complexité des processus de fractionnement isotopique au sein du système symbiotique. En effet, les champignons semblent prélever préférentiellement les formes d'azote riches en ^{15}N et les différentes voies d'assimilation de l'azote présentent des profils de fractionnement différents. Par exemple l'ammonium peut être incorporé par deux

Synthèse bibliographique

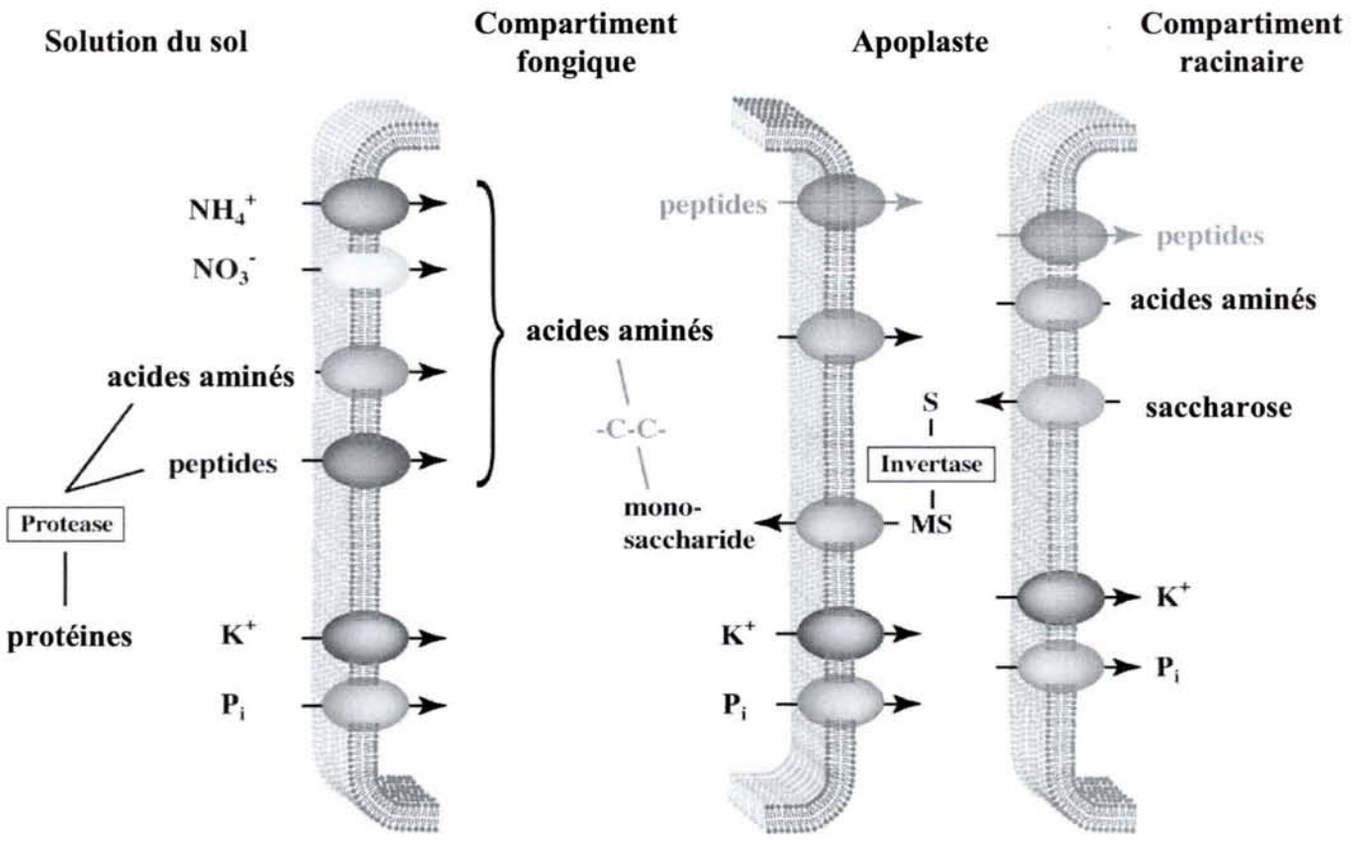


Figure 21: Schéma récapitulant les différents transporteurs identifiés dans les tissus ectomycorhiziens.

voies enzymatiques différentes, la voie glutamine synthetase/glutamate synthase et/ou la voie glutamate deshydrogenase. Ces enzymes présentent une affinité différente pour l'ammonium (Marschner, 1986) suggérant que leur intervention va dépendre des concentrations ammoniacales prélevées. De plus, certains champignons utilisent l'une des deux voies préférentiellement à l'autre (Martin et al., 1986). Enfin le champignon a tendance à transférer des sources pauvres en ^{15}N à la plante. Tous ces paramètres, qui de plus sont espèce dépendants, vont engendrer des profils isotopiques variables difficilement exploitables pour définir quelles formes d'azote sont préférentiellement prélevées et transférées au sein de l'organe symbiotique.

D'un point de vue mécanistique, l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne aboutit à la formation d'une interface entre les deux partenaires qui sera le siège des échanges entre les deux partenaires (Figure 21). Cette matrice est une structure spécifique de l'association et pas seulement un réarrangement de la paroi végétale (Smith et Read, 1997). La première étape de la translocation de composés entre la plante et le champignon sera l'efflux de composés du partenaire donneur vers l'apoplaste. La seconde étape sera le prélèvement de ces composés dans l'apoplaste par le partenaire receveur. Peu de données sont actuellement disponibles concernant les composés transférés. Certaines hypothèses attribuent cette particularité à certains acides aminés et notamment la glutamine. Des expériences de marquage isotopique à l'azote ^{15}N ont permis de détecter de la ^{15}N-glutamine, du ^{15}N-glutamate, de la ^{15}N-asparagine et de la ^{15}N- dans le bouleau après alimentation du champignon associé (*Paxillus involutus)* avec de l'ammonium marqué ^{15}N (Finlay et al., 1988, Chalot et Brun, 1998). Suite à l'approvisionnement du champignon en ^{15}N-alanine, de la ^{15}N-glutamine, du ^{15}N-glutamate et de la ^{15}N-alanine ont été détectés. Lorsqu'un inhibiteur de l'alanine aminotransférase est ajouté, l'alanine ne peut plus être métabolisée et la ^{15}N-alanine détectée alors dans les plantes prouve que cet acide aminé a pu être transféré sous sa forme initiale (Chalot et Brun, 1998).

Les quelques données disponibles concernant le transfert à la plante ont été obtenues à partir d'études menées sur l'association endomycorhizienne et notamment sur le transfert de phosphate à l'interface symbiotique. Ainsi, un gène codant un transporteur de phosphate de la pomme de terre est surexprimé dans les cellules contenant des arbuscules (Rausch et al., 2001). Sachant que le potentiel électrique des plantes colonisées ou non par un champignon

Cnrs/bss bibliocampus

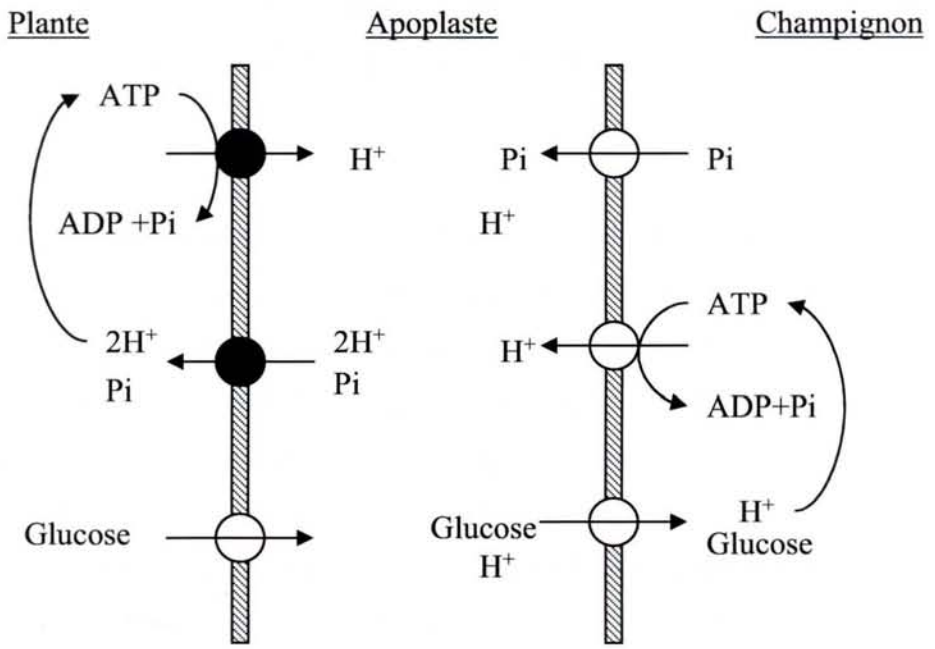


Figure 22: Modèle proposé pour le transfert de phosphate et de carbone à l'interface symbiotique des arbuscules. Les cercles pleins représentent les transporteurs qui ont déjà été localisés au niveau de cet interface (d 'après Ferrol et al., 2002).

endomycorhizien ne varie pas, une hypothèse serait que le gradient de protons est maintenu par une forte activité ATPase (Ayling et al., 1997). Ce gradient de protons pourrait être à la base des processus de transfert de Pi, comme cela a été suggéré par Ferrol et al. (2002), et Harrisson (1999) (Figure 22), mais aussi d'acides aminés par un mécanisme de co-transport de protons.

Cependant, le transfert d'azote sous forme d'acides aminés a été remis en cause par Bago et al. (2001). D'après leurs observations, l'arginine, élément clé des systèmes de translocation vacuolaires, pourrait être transportée des hyphes extracellulaires vers les hyphes intracellulaires du champignon endomycorhizien et être catabolisée via le cycle de l'urée en ammonium. Dans ce cas, ce serait sous forme d'ammonium que l'azote serait transféré à la plante. Malgré ces études, il est encore difficile de conclure sur les réelles formes d'azote transportées du champignon vers la plante à l'interface symbiotique.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Surbèse bibliouvmbiaue

Section 2- Matériels et Méthodes

	Classe	Souches	Origine
Paxillus involutus	Basidiomycète	01	Midlothian (Ecosse)
Hebeloma cylindrosporum	Basidiomycète	H1	Arcachon (France)
Laccaria laccata	*Basidiomycète*	***S238***	*USA*
Pisolithus tinctorius	Basidiomycète	441	Brésil
Amanita muscaria	Basidiomycète	MAN	MantjArnsvAgen (Suède)
Boletus edulis	Basidiomycète	Hub0	Raon l'Etape (France)
Lactarius subdulcis	Basidiomycète	BRI 2	Bride II (France)
Rhizopogon lutoelus	Basidiomycète	SERRE	Serre INRA (France)
Scleroderma citrinum	Basidiomycète	Foug A	Fougère (France)
Suillus bovinus	Basidiomycète	LED 1	Ledvattnet 1 (Suède)
Thelephora terrestris	Basidiomycète	CHA	Serre INRA (France)
Tricholoma populinum	Basidiomycète	BLAE	Blaesheim (France)
Cenococcum geophilum	Ascomycète	H 5-3	Hennezel (France)
Tuber borchii	Ascomycète	Vittad.	

Tableau 7 : Souches de champignons ectomycorhiziens utilisées lors des études de diversité fonctionnelle.

3. Matériel biologique

3.1. Isolat fongique

3.1.1. Souches utilisées

La souche Pi01 de *Paxillus involutus* (n' 87.017 dans la mycothèque du Département d'Ecologie Microbienne de l'Université de Lund en Suède, n' 200175 dans l'ATCC) a été originellement isolée en Ecosse (Midlothian) à partir de carpophores associés à des bouleaux (*Betula pendula* Roth.) âgés de 15 à 30 ans. C'est un Basidiomycète qui appartient à l'ordre des Bolétales, famille des Paxillacées.
Les autres souches de champignons ectomycorhiziens utilisées sont répertoriées dans le tableau 7.

3.1.2. Conditions de culture

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 milieux de Melin-Norkrans modifié gélosé (MMN) (Marx, 1969) ou N_2P_2 gélosé. Les compositions de ces milieux sont données dans le tableau 8. Pour les expériences nécessitant de transférer les colonies fongiques sur d'autres milieux nutritifs, des disques de cellophane préalablement traités à l'EDTA (10 mM) à 100°C pendant 20 minutes, rincés et autoclavés, sont ajoutés dans les boîtes de Pétri.

Pour les études de réponse cellulaire aux variations de conditions de nutrition azotée, les colonies ont été transférées sur milieu MMN ou N_2P_2 liquide dépourvu d'azote pendant 6 jours. Les colonies sont ensuite transférées sur un milieu supplémenté en composés azotés marqués ou non.

	Milieu MMN (Concentrations finales)	Milieu N_2P_2 (Concentrations finales)
KH_2PO_4	500 mg/l	500 mg/l
$(NH_4)_2HPO_4$	250 mg/l	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	250 mg/l
$MgSO_4,7H_2O$	150 mg/l	150 mg/l
$CaCl_2,2H_2O$	50 mg/l	50 mg/l
NaCl	25 mg/l	-
Na_2HPO_4	-	160 mg/l
NaH_2PO_4	-	4,5 mg/l
Thiamine	100 mg/l	0,04 mg/l
$FeCl_3$	1 mg/l	-
Citratede Fe	-	12 mg/l
Solution de Kanieltra	-	0,1 ml
Glucose	10 g/l	2,5 g/l

Tableau 8: Composition des milieux de culture de Melin-Norkrans MMN (modifié d'après Marx, 1969) et N_2P_2.

Le pH de la solution de MMN est ajusté à 5,5 et le pH de la solution de N_2P_2 est ajusté par addition de tampon MES (0,5g/100ml) filtré, après autoclavage. Les milieux solides sont réalisés par addition de 15g/l de gélose (Agar, Difco).

Les colonies fongiques sont ensuite prélevées à différents temps avant et après transfert. Le mycélium est pesé et fixé dans de l'azote liquide. Le mycélium congelé est ensuite stocké à -70°C jusqu'à son utilisation.

3.2. Matériel végétal

3.2.1. Souche utilisée

Une des plantes hôte utilisées au laboratoire est le bouleau verruqueux (*B. pendula* Roth.) qui appartient à la famille des Bétulacées. Les graines (lot n' S23X8730166) ont été prélevées sur des arbres adultes à Docksta (Suède).

3.2.2. Conditions de culture

Les graines sont désinfectées par incubations successives dans une solution d'éthanol à 95% (v/v) pendant 1 minute, puis dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3,5% (p/v) sous agitation douce pendant 30 minutes. Elles sont ensuite abondamment rincées dans plusieurs bains d'eau distillée stérile (4 fois 10 min, puis 1 fois12 h) et mises à germer sur eau gélosée (agar 1% (p/v)) en boîtes de Pétri durant 3 jours à l'obscurité et à 25°C. Le taux de germination est en moyenne de 90%.

Les graines germées sont alors placées pendant 4 jours en chambre de culture climatisée [température : 24°C le jour et 18°C la nuit, hygrométrie : 80% de saturation le jour et 60% la nuit, photopériode : 16 heures, avec une intensité lumineuse de 80 mmol m-2 sec-1 dans la bande des radiations visibles (400-700 nm)]. Cette méthode permet l'obtention, en 7 jours, de jeunes plantules axéniques dont la racine est apte à être mycorhizée.

3.3. Production de plants de bouleau mycorhizés par *P. involutus*.

3.3.1. Production de plantules mycorhizées en conditions axéniques

Les mycorhizes de l'association *B. pendula/P. involutus* sont produites en conditions axéniques d'après la technique décrite par Malajczuk et al. (1990), modifiée par Brun et al. (1995) (Figure 23).

Le partenaire fongique est cultivé en boîtes de Pétri (140 mm de diamètre) sur milieu de Melin-Norkrans gélosé avec cellophane et dont les concentrations en glucose, ammonium et phosphore sont réduites de 10 fois par rapport au milieu standard, afin d'augmenter la

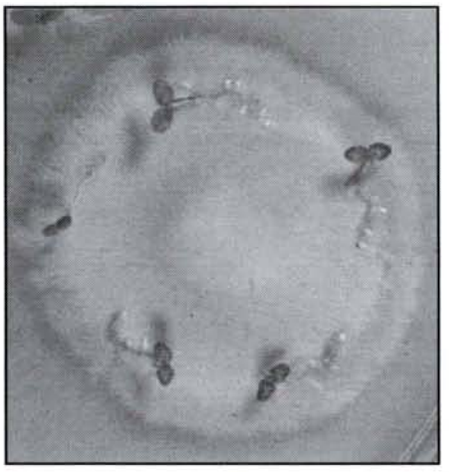


Figure 23: Système axénique de synthèse de mycorhizes entre *Paxillus involutus* et *Betula pendula*.

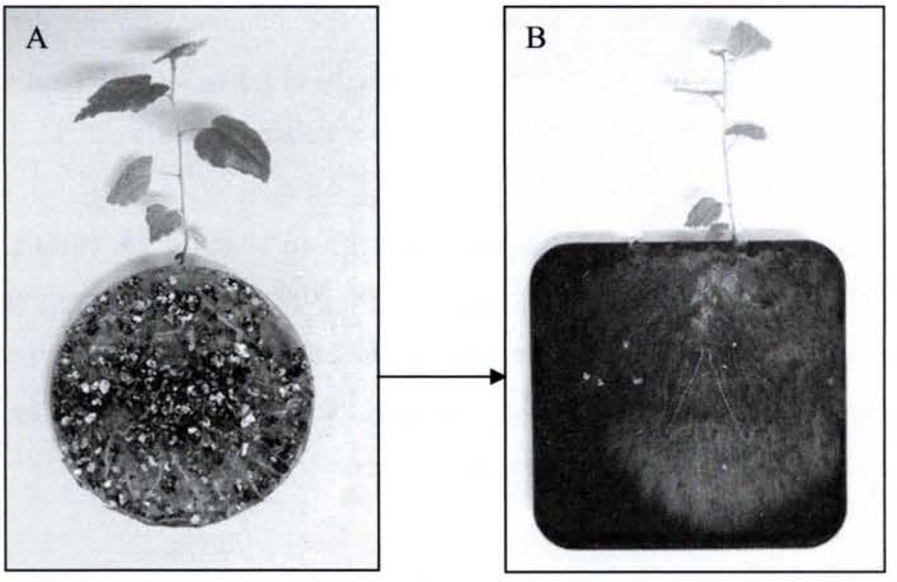


Figure 24: Système semi-axénique de production de mycorhizes entre *Paxillus involutus* et *Betula pendula*.

A: première étape de mycorhization sur un mélange de tourbe-vermiculite-MMN doublé en éléments minéraux

B: transfert de la plantule mycorhizée sur de la tourbe humide qui permet la propagation du mycélium extramatriciel

production de mycorhizes par plantule (Brun et al., 1995). Dans chaque boîte sont déposés trois implants fongiques qui, après une semaine de croissance à l'obscurité et à 25°C, atteignent un diamètre d'environ 3 à 4 cm. Cinq à six germinations de bouleau, cultivées dans les conditions décrites au § 3.2.2., sont déposées en bordure d'une colonie fongique. Les boîtes, scellées par du Parafilm, sont de nouveau placées en chambre de culture et des mycorhizes matures sont obtenues après 15 jours de contact.

3.3.2. Production de plantules mycorhizées en conditions semi-axéniques

Les mycorhizes sont synthétisées en conditions semi-axéniques selon la méthode modifiée de Duddridge (Duddridge, 1986), décrite par Finlay (1989). Des plantules de bouleau sont mises à germer pendant deux semaines dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose (§ 3.2.2.). Les racines sont transférées dans des boîtes de Pétri (Δ 90 mm) dans lesquelles le champignon s'est développé depuis deux semaines sur un substrat composé d'un mélange de tourbe/vermiculite (1/4, v/v), additionné de milieu MMN liquide concentré deux fois en éléments minéraux et contenant 10 g/l d'extrait de malt et seulement 1,25 g/l de glucose. Les boîtes sont fermées avec du Parafilm afin de limiter les contaminations. Les parties aériennes sont par contre directement en contact avec l'atmosphère. Ces plantes sont placées dans des mini-serres sous une atmosphère saturée en humidité pendant un mois et demi.

Ces plantules mycorhizées sont ensuite transférées sur de la tourbe non stérile imbibée d'eau, dans des boîtes de Pétri carrées (120x120 mm). Aucun milieu nutritif n'est ajouté et le système, placé quinze jours dans des mini-serres, permet la diffusion du mycélium sur la tourbe à partir des mycorhizes (Figure 24).

3.4. Souches bactériennes d'*Escherichia coli*

3.4.1. Souches utilisées

DH5aF' : F', hsdR17(rK-mK+), supE44, '(lacIZYA-argF)U169, deoR, (f80 dlac '(lacZ)M15), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.

Cette souche est utilisée pour les transformations de routine. Elle permet la propagation des plasmides, leur taux de transformation est élevé. Elle permet également la sélection blanc-bleu.

Composés	LB	TB
Bactotryptone	10g	12g
Extrait de levure	5g	24g
NaCl	10g	-
Glycérol	-	4ml
KH_2PO_4	-	17mM
K_2HPO_4	-	72mM
pH	7.0-7.5	

Tableau 9 : Composition des milieux Luria broth (LB) et Terrific broth (TB) pour la culture de bactéries.

Gène étudié	Souche sauvage	Souche de levure déficiente utilisée	Phénotype de la souche mutante
Transporteur d'urée	23344cura3 Mat a	yhl016c ura3, dur3 (Euroscarf)	Absence de croissance sur urée
Phosphatidylserine decarboxylase	sey6210 (wt) ura3, his3, trp1, leu2, lys2	ryy51 ura3, his3, trp1, leu2, lys2, psdΔ1, psdΔ2	Auxotrophie pour l'éthanolamine

Tableau 10 : Souches de levures sauvages et déficientes utilisées pour la caractérisation des gènes présentés.

	YPD	Milieu synthétique	YPLAUE
Extrait de levure	10 g	-	10 g
Bactopeptone	20 g	-	20 g
Glucose	20 g	-	-
YNB	-	6,7 g	-
Yeast Synthetic Drop Out	-	1,92 g	-
Galactose	-	20 g	-
Acide lactique pH 6,5	-	-	2 %
Adénine	-	-	20 mg
Ethanolamine	-	-	2 mM
Uracile	-	20 mg	20 mg
(Agarose	20 g	20 g	8 g)
H_2O	qsp 1l	qsp 1l	qsp 1l
pH	5,5	5,5	6,5

Tableau 11: Composition des milieux de culture pour levure. Le milieu est autoclavé 20 min à 120°C.

BL21 (DE3) : F-, hsdSB (rB-mB-), ompT, gal, dcm, l(DE3)
Cette souche a été utilisée pour la surexpression de protéines recombinantes.

3.4.2. Conditions de culture

Les différentes souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C. La composition des différents milieux de culture utilisés est détaillée dans le tableau 9.

3.5. Souches de *Saccharomyces cerevisiae*

3.5.1. Souches utilisées

Les souches sauvages et mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées sont présentées dans le tableau 10.

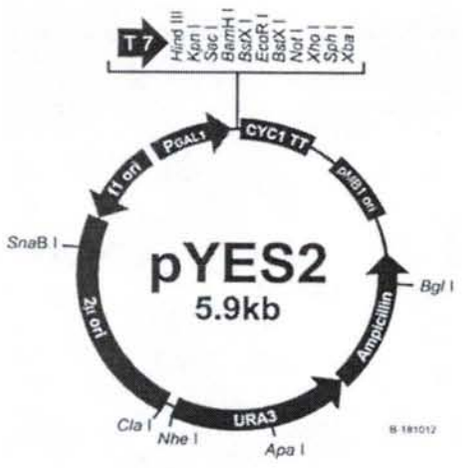
3.5.2. Conditions de culture

Les cultures sont réalisées en aérobiose, à 29°C. Toutes les expériences nécessitant une culture liquide ont été effectuées sur des cellules en phase exponentielle de croissance (Wiame et al., 1985). Les milieux de culture sont donnés tableau 11.
Une source d'azote (0,1 % en général ou à la concentration indiquée dans le texte), si nécessaire de l'uracile (25 μg/ml) sont ajoutés pour combler l'auxotrophie des cellules ura3.
Le milieu YPLAUE contenant de l'acide lactique est utilisé pour cultiver les souches sauvage et mutée pour le gène codant la phosphatidylserine decarboxylase pour éviter d'avoir un phénotype dit de cellules « petites ».

3.6. Les plasmides (Figure 25)

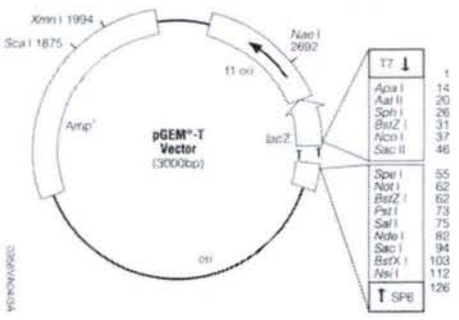
3.6.1. Plasmides pour *E. coli*

pGEM-T (3 kpb): Ce plasmide (Promega) possède le gène de résistance à l'ampicilline et un multisite de clonage localisé dans le gène lacZa. Il a été utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Ce plasmide linéaire possède une base thymidine à chacune de ses extrémités 3'OH, permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits PCR obtenus avec l'ADN polymérase Advantage 2 (Clontech). Celle-ci rajoute en effet une molécule de dATP aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN qu'elle génère.



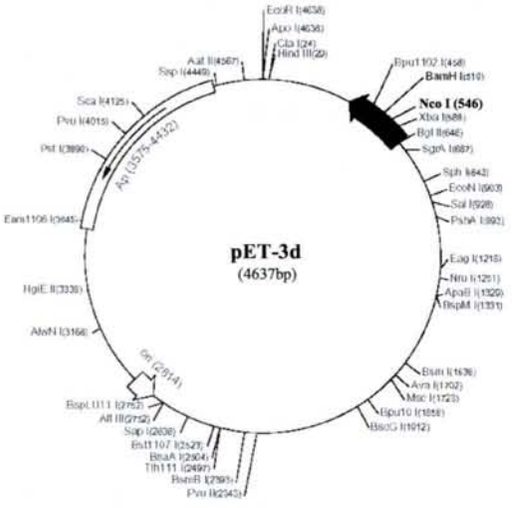
Comments for pYES2:
5857 nucleotides

GAL1 promoter: bases 1-452
T7 promoter/priming site: bases 476-495
Multiple cloning site: bases 502-601
CYC1 transcription terminator: bases 609-857
pMB1 (pUC-derived) origin: bases 1039-1712
Ampicillin resistance gene: bases 1857-2717
URA3 gene: bases 2735-3842
2 micron origin: bases 3846-5317
f1 origin: bases 5385-5840



pGEM®-T Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	126
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
multiple cloning region	10–113
lacZ start codon	165
lac operon sequences	2821–2981, 151–380
lac operator	185–201
β-lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941–2957
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161–177



pET-3d sequence landmarks

T7 promoter	615-631
T7 transcription start	614
T7 terminator	404-450
pBR322 origin	2814
bla coding sequence	3575-4432

Figure 25: Cartes de restriction de quelques plasmides utilisés

pET 3-d (4,637 kpb): Ce plasmide (Novagen) possède le gène de résistance à l'ampicilline. Il a été utilisé pour le clonage des gènes pleine longueur pour la production de protéines recombinantes.

pSBET : Chez E. coli il existe un système de biais de codon c'est-à-dire une utilisation préferentielle de certains codons du fait de la faible représentation de certains ARNt. Ainsi, les ARNt correspondant aux codons AGG et AGA codant pour une arginine sont très peu présents chez *E. coli* et les codons sont donc très peu traduits. Ce phénomène peut engendrer une traduction ralentie de la séquence codante et ce d'autant plus que la séquence possède de ces codons. Le plasmide pSBET possède le gène codant l'ARNt spécifique aux codons AGG et AGA. Ainsi, ces codons seront traduits convenablement et la protéine pourra être produite en grande quantité

3.6.2. Plasmides navette *S. cerevisiea-E. coli*

Les plasmides utilisés sont de la famille YEp, dit épisomiques. Ils contiennent l'origine de réplication du plasmide 2 µm. Ces plasmides sont présents à raison de 20 à 30 copies par levure.

pFL61 (6,3 kpb) : il possède le gène de résistance à l'ampicilline et un site de clonage unique, non orienté NotI placé sous influence du promoteur de la phosphoglycerokinase de *S. cerevisiae*. Il est pourvu du gène marqueur URA3.

pYes2 (5,9 kb): Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline et un promoteur dont l'induction est galactose dépendante. Il a été utilisé pour les tests de complémentation de levures déficientes.

pYes2-GFP (7,5 kb) : Ce plasmide correspond au plasmide pYES2 dans lequel a été inséré l'ADNc codant pour la GFP (S65T) grâce aux sites de restriction XbaI (Blaudez et al., 2003).

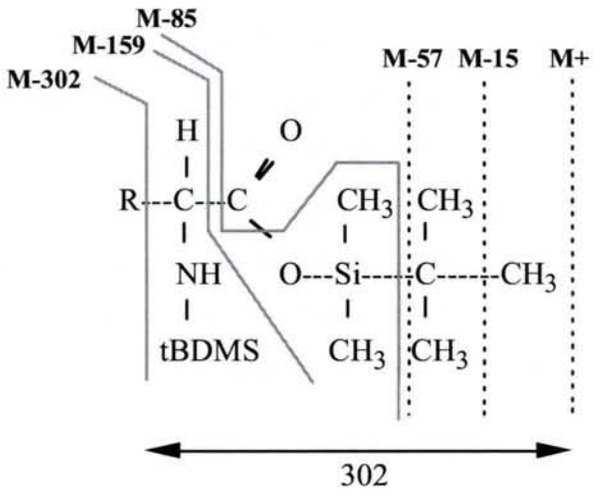


Figure 26: Modèle de fragmentation par ionisation des composés t-TBDMS-aa lors de l 'analyse en spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase gazeuse.

4. Méthodes

4.1. Techniques analytiques générales

4.1.1. Extraction de l'ammonium et des acides aminés intracellulaires

Ammonium et acides aminés sont extraits après lyophilisation d'environ 150 mg de matière fraîche. Le champignon lyophilisé est réduit en poudre (broyeur vibrant MM300, RETSCH) et l'ammonium et les acides aminés sont extraits deux fois à l'éthanol froid 70%. Les surnageants sont regroupés. Pour la purification des acides aminés, le surnageant est évaporé à sec (Speed Vac Jouan 1010). Les acides aminés sont repris dans 2 fois 200 µl d'HCl 0,1N et purifiés sur colonne par chromatographie échangeuse de cations Dowex 50WX-8, Forme H+, 100-200 mesh. 20 µl de solution de standards acide et basique à 2,5 mM sont aussi purifiés de la même manière. La colonne est lavée deux fois à l'eau ultrapure et les acides aminés sont élués avec 4 ml de NH_3 3M. 400 µl sont évaporés à sec.

4.1.2. Analyse par GC-MS des acides aminés

Les acides aminés extraits sont dérivatisés avec 41,7 µl de MTBSTFA et 8,3 µl de DMF et injectés dans l'appareil. La GC-MS est un appareil Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) 5973 HP MS qui combine un chromatographe en phase gazeuse (modèle 6890 HP GC), un autosampler (modèle 7673) et un spectromètre de masse (SM) (modèle 5989A). La colonne de capillarité (30 m x 0,25 mm HP5'MS; Hewlett Packard) est initialement maintenue à 110 °C. Après 2 minutes, la température atteint 260°C ce qui permet l'élution successive des acides aminés qui sont ensuite injectés dans le SM. L'identification des acides aminés se fait grâce à la comparaison des spectres de masse avec ceux qui sont présents dans une base de données.
Pour la détermination de l'enrichissement isotopique, le fragment utilisé est $\{M-57\}^+$ (Mawhinney et al., 1986) (Figure 26). Les ions $[m + 1]^+$ et $[m + 2]^+$ correspondant à un simple ou double marquage ont aussi été déterminés pour l'asparagine et la glutamine. L'enrichissement isotopique a été calculé comme décrit par Campbell (1974).

Composé	Concentration
Tris-HCl pH 7,6	50 mM
Glycérol	10 % (v/v)
PVP	2 % (p/v)
PVPP	10 % (p/p)
Na_2EDTA	2 mM
$MgSO_4$	5 mM
Glutamate de sodium	10 mM
β-mercatoéthanol	14 mM

Tableau 12 : Tampon d'extraction utilisé pour le dosage de la GS

Composé	Concentration
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Glycérol	10 % (v/v)
PVP	2 % (p/v)
PVPP	10 % (p/v)
β-mercatoéthanol	14 mM

Tableau 13 : Tampon d'extraction utilisé pour le dosage de la GDH à NADP

4.1.3. Dosage de l'ammonium par colorimétrie

L'ammonium de l'extrait brut est déplacé en milieu alcalin à l'aide d'une solution saturée de tétraborate de sodium pH 10, puis est piégé dans une solution d'acide borique 2% selon la technique de microdiffusion développée par Conway (1967). L'ammonium est ensuite dosé dans la solution d'acide borique. La méthode de dosage est basée sur la capacité de l'ammonium à produire un chromophore, le bleu d'indophénol, en présence d'une solution alcaline de phénol et d'hypochlorite (réaction de Berthelot). L'absorbance du chromophore est mesurée à 625 nm. 150 µl d'acide borique qui a piégé l'azote ammoniacal sont additionnés de 2,5 ml d'une solution de phénol à 10g/l et 50 mg/l de nitroprussiate de sodium et de 2,5 ml d'une solution d'hypochlorite de sodium 25ml/l et 5 g/l de NaOH. La coloration bleue se développe 15 min au bain marie à 37°C. La concentration est déterminée par référence à une courbe étalon.

4.1.4. Dosages enzymatiques

4.1.4.1. Extraction des protéines solubles

Environ 100 mg de mycélium sont broyés au mortier, en présence de sable de fontainbleau, de PVPP (10% p/p) et de 1 ml de tampon d'extraction dont la composition est donnée dans le tableau 12 pour la GS et 13 pour la GDH à NADP. L'extrait est ensuite centrifugé à 20 000g pensant 20 min. Le surnageant recueilli constitue l'extrait brut.

4.1.4.2. Détermination des activités enzymatiques

4.1.4.2.1. Glutamine synthétase

L'activité de la GS a été déterminée par dosage colorimétrique. Ce dosage est basé sur la propriété que possède l'enzyme de catalyser la formation de γ-glutamylhydroxamate lorsque l'ion ammonium est remplacé par l'hydroxylamine (Rhee et al., 1976). Le substrat utilisé est la glutamine, cette réaction est appelée réaction transférasique :

$$\text{L-glutamine} + NH_2OH + Mg^{2+} + \text{ADP} + \text{arsenate} \rightarrow \gamma\text{-glutamylhydroxamate} + NH_4^+$$

Substrat	Concentration finale	Concentration de la solution mère	Essai
L-glutamine	125 mM	250 mM	500 µl
Hydroxylamine	30 mM	300 mM	100 µl
Na_2EDTA	4 mM	40 mM	100 µl
$MgSO_4$	20 mM	200 mM	100 µl
Arsenate de K^+	20 mM	400 mM	50 µl
ADP	0,5 mM	10 mM	50 µl
Tris-Extrait enzymatique	-	-	50 à100 µl
Tris-HCl pH 7,2	50 mM	50 mM	qsp 1000 µl

Tableau 14 : Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité GS par le dosage transférasique. Tous les produits sont en solution dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,2.

Substrat	Concentration finale	Concentration de la solution mère	Essai
α-cétoglutarate	8,7 mM	100 mM	100 µl
$(NH_4)_2SO_4$	122 mM	1,406 mM	100 µl
NADPH	156 µM	2,4 mM	75 µl
Extrait enzymatique	-	-	50 à 200 µl
Tampon P de K^+	100 mM	100 mM	qsp 1150 µl

Tableau 15 : Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité GDH à NADP. Tous les produits sont en solution dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,2.

La composition des milieux réactionnels pour le dosage est donnée dans le tableau 14. Des témoins sont réalisés par omission de l'ADP. Elle s'effectue à 30°C pendant 30 min puis est stoppée par l'addition de 1 ml d'une solution contenant du FeCl3 (0,37 M), TCA 0,20M et HCl (0,67N). En présence de FeCl3, le γ-glutamylhydroxamate forme un complexe coloré en brun dont la densité optique est lue au spectrophotomètre à 540 nm. Les quantités de produit formé sont déterminées à partir d'une courbe étalon, réalisée avec des concentrations croissantes en γ-glutamylhydroxamate de 0 à 3 µmoles par ml de mélange réactionnel. Les résultats sont exprimés en nkatals par mg de protéines totales.

4.1.4.2.2. Glutamate deshydrogénase à NADP

L'activité de cette enzyme est déterminée par la mesure de l'oxydation du NADPH suivie à 340 nm en cellule thermostatée à 30°C. La composition du milieu réactionnel est donnée dans le tableau 15. L'α-cétoglutarate est utilisé pour déclencher la réaction et un témoin est réalisé par omission de ce substrat. Les résultats sont exprimés en nkatals par mg de protéines totales, sachant que 1 mole de NADPH réduit produit une variation de DO de 0,00622 unité (= coefficient d'extinction molaire) à 340 nm dans une cuve de 1 cm de large.

4.1.4.3. Dosage des protéines

Basée sur la méthode développée par Bradford (1976), la technique utilisée repose sur le déplacement d'absorption de 465 nm à 595 nm qui se produit lorsque le bleu de Coomassie se lie aux protéines. Aux 500 µl d'extrait protéique dilué sont ajoutés 500 µl de réactif de dosage (Pierce). Après 10 min d'incubation à température ambiante, la densité optique est lue au spectrophotomètre à 595 nm contre un témoin sans protéine. La quantité de protéines de la prise d'essai est déterminée par référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations croissantes en sérum albumine bovine de 0 à 25 µg/ml de mélange réactionnel.

4.1.4.4. Utilisation d'inhibiteurs métaboliques

Des inhibiteurs métaboliques ont été utilisés pour bloquer la synthèse d'un composé spécifique, dans le but de modifier les pools azotés intracellulaires du champignon. La L-Phosphinothricin PPT (Kalys) a été utilisée à raison de 2,5 mM pour inhiber la glutamine

synthétase et ainsi permettre l'accumulation d'ammonium au détriment de la glutamine. L'acide acétohydroxamique (AHA) a lui été utilisé à raison de 5 mM pour inhiber l'uréase et ainsi permettre une accumulation d'urée dans la cellule au détriment de l'ammonium. Les champignons sont préalablement incubés 45 min dans le milieu contenant l'inhibiteur avant l'ajout de la source azotée d'intérêt (ammonium ou urée à 1mM).

4.2. Production hétérologue de protéines fongiques chez *Escherichia coli*

4.2.1. Clonage

La souche bactérienne utilisée pour la production de protéine recombinante est une souche d'*Escherichia coli* nommée BL21(DE3) (§ 3.4.1.) préalablement transformée par le plasmide pSBET (§ 3.6.1.). Cette souche est transformée par le plasmide recombinant par électroporation comme décrit au § 5.11.4.1. Une colonie résistante à l'ampicilline et à la kanamycine est alors mise en culture à 37°C dans 3 ml de milieu LB supplémenté en ampicilline (50 μg/mL) et en kanamycine (50 μg/mL), et le volume de culture est augmenté successivement à 400 ml puis à 4,8l, ceci en maintenant la pression de sélection due à la présence des deux antibiotiques. Lorsque cette culture arrive en phase exponentielle, correspondant généralement à une absorbance de 0,6 à 600 nm, elle est induite pour une durée de 4 heures par de l'IPTG (isopropyl-b-D thiogalactoside) à une concentration finale de 100 µM. Dans cette souche, le gène de l'ARN polymérase du phage T7 a été intégré dans le génome de la bactérie. Ce gène est sous le contrôle du promoteur β-galactosidase, lui-même régulé par la fixation d'un répresseur. L'IPTG empêche ce répresseur de se fixer sur le promoteur et permet une synthèse accrue de la séquence introduite derrière ce promoteur.
Les bactéries sont alors collectées par centrifugation à 5 000 rpm pendant 15 minutes à 20°C (rotor JA10 Beckman), puis reprises dans du tampon TE I (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl). Le tampon utilisé contient du NaCl pour éliminer toutes interactions électrostatiques avec d'autres molécules.

4.2.2. Purification des protéines recombinantes

4.2.2.1. Sonication des bactéries

Les bactéries sont lysées par sonication de 2 fois 2 minutes pour casser membranes et parois bactériennes (Sonicator Ultrasonic processor XL, Misonix, sonde de 1 cm de large, output 4, duty cycle 50). Entre chaque étape de sonication, on laisse reposer 3 minutes environ. Ensuite l'extrait obtenu est centrifugé à 16 000 rpm pendant 45 minutes à 5°C (rotor JA20 Beckman) pour séparer soluble et insoluble. Le culot est repris dans du tampon TE I. Le surnageant est utilisé pour la précipitation au sulfate d'ammonium.

4.2.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Le surnageant obtenu est amené lentement à 40 % (291 g/l) de la saturation en sulfate d'ammonium, puis centrifugé à 16 000 rpm pendant 30 minutes à 5°C (rotor JA20 Beckman). Le culot contient les débris cellulaires et les protéines qui précipitent à moins de 40 %. Le surnageant est cette fois saturé lentement à 80 % (485 g/l) en sulfate d'ammonium. Après centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment, le culot contenant principalement les protéines ayant précipité entre 0 et 40 % de la saturation, est resuspendu dans un petit volume de tampon TE II (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).
Pour déterminer dans quel domaine de saturation se trouve la protéine étudiée, des aliquots de chaque fraction sont déposés sur un gel SDS-PAGE 15 % (Tableaux 16 et 17).

4.2.2.3. Chromatographie d'exclusion de taille

L'échantillon contenant la protéine d'intérêt est alors déposé sur une colonne de gel filtration ACA44, équilibrée dans du tampon TE I, pour une séparation des protéines dans un domaine de fractionnement allant de 130 à 10 kDa. Cette colonne se présente sous la forme d'un gel composé de petites billes poreuses. Les plus grosses protéines passant à l'extérieur des billes sont éluées rapidement, au contraire des petites protéines qui pénètrent dans les pores des billes et sont ralenties pour ne sortir qu'en dernier. Les protéines sont éluées par gravité, récoltées par fractions grâce à un collecteur et l'absorbance des fractions est mesurée à 280 nm pour localiser les protéines. Les protéines d'intérêt sont détectées par SDS-PAGE.

	Gel de concentration	Gel de séparation 15%
Tris-HCl 1M pH 6,8	0,75 ml	-
Tris-HCl 1M pH 8,9	-	1,875 ml
Acrylamide 40%	399 µl	2,81 ml
SDS 20%	15 µl	37,5 µl
APS (100mg/ml)	27 µl	45 µl
TEMED	4,8 µl	11 µl
H_2O	1,77 ml	2,68 ml

Tableau 16 : Composition d'un gel SDS-PAGE 15%

	Solution de dissociation
Tris 1M pH 6,8	250 µl
β mercaptoéthanol	50 µl
SDS 20%	100 µl
Glycérol	100 µl
BBP 2%	2 µl

	Solution de migration pH 8,8
Tris 25 mM	3 g
Glycine 122 mM	14,4 g
SDS 0,1%	1 g
H_2O	1000 ml

	Solution de coloration	Solution de décoloration
Acide acétique	100 ml	75 ml
Ethanol	500 ml	50 ml
H_2O	500 ml	850 ml
Bleu de coomassie R250	2,75 g	

Tableau 17 : Solutions pour l'électrophorèse de protéines.

4.2.2.4. Concentration des protéines

La protéine recombinante est ensuite concentrée dans des cellules Amicon contenant une membrane (YM10) qui possède des pores ne laissant passer que les protéines et autres molécules de masse moléculaire inférieure à 10 kDa. L'échantillon est d'abord concentré sous une pression d'azote de 5 bars, puis dialysé avec le tampon TE II pour éliminer les acides nucléiques restants et les sels présents.

4.2.2.5. Chromatographie échangeuse d'ions

Les fractions d'intérêt sont rassemblées et déposées à l'aide d'une pompe péristaltique sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE-Sépharose fast flow) équilibrée dans le tampon TE II. Le gel est composé de billes de Sépharose sur lesquelles sont fixés des groupements diéthylaminoéthyls chargés positivement à pH 8.0.
Les molécules chargées négativement à ce pH sont retenues sur la colonne, alors que les autres passent au travers. Les protéines et l'essentiel des acides nucléiques retenus sont alors élués sous l'action d'un gradient de NaCl entre 0 et 0,4 M dans du tampon TE I, du fait d'une compétition de plus en plus forte pour la fixation sur les sites diéthylaminoéthyle et recueillis également par un collecteur de fractions. La sélection et la concentration de la protéine recombinante se fait de la même manière qu'après chromatographie d'exclusion de taille.

Connaissant le coefficient d'extinction molaire et la masse moléculaire de la protéine recombinante purifiée, les concentration et quantité de protéines peuvent être évaluées. Enfin la pureté de la protéine peut être analysée en déposant des quantités de protéines allant de 2 à 5 μg sur gel SDS-PAGE. De plus, par comparaison avec un marqueur de masse moléculaire, la masse moléculaire exacte de la protéine peut être déterminée.

4.3. Techniques d'analyse des protéines par détection immunologique (Western blot)

30 μg de protéines extraites à l'aide du TRI REAGENT d'Euromedex, sont solubilisées dans le tampon de Laemmli (1970) composé de Tris-HCl 250 mM pH 6,8 ; SDS 2% ; glycérol 10% ; β-mercaptoéthanol 5% sont chargées sur un gel SDS-PAGE (15%) (Tableau 16) et séparées selon la méthode de Schagger et von Jagow (1987). L'électrophorèse est conduite à 160 V à

l'aide du système PROTEAN II XL cells (Bio-Rad) dans un tampon composé de 25 mM Tris, 122 mM glycine et 0,1% SDS.

Le transfert est ensuite réalisé sur membrane de PVDF (Millipore) dans du tampon de transfert (Tris 25mM, Glycine 192 mM et méthanol 20%) pendant une nuit, à raison de 100 mA par gel à l'aide du système Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Après le transfert, les sites de fixation libres de la membrane sont bloqués par incubation pendant 3 à 4h dans du tampon de blocage composé de : 20 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% lait en poudre, 0.05% de tween 20. Des anticorps anti CipC2 ont été générés par injection de5 mg de CipC2 recombinante dans un lapin. 35 mL de sérum ont ensuite été recueillis.
Après mise en contact pendant 2h avec l'immunosérum " primaire " dilué au 1/1000 dans le tampon de blocage, la membrane est lavée trois fois 10 min dans ce même tampon de façon à éliminer les anticorps primaires avant d'être incubée 1h à température ambiante dans ce même tampon contenant l'immunosérum " secondaire " (anticorps anti-anticorps de lapin couplés à la phosphatase alcaline (Immuno Star Detection Kit Bio rad) à la dilution 1/3000. La membrane est ensuite rincée comme décrit précédemment puis dans une solution 20 mM de Tris pH 7.5. Après ajout du substrat, la réaction est révélée par bioluminescence. Un marqueur de poids moléculaire précoloré (Kaléidoscope de Biorad) est utilisé comme standard.

4.4. Cinétiques d'absorption de [^{14}C] urée dans *Paxillus involutus*

4.4.1. Marquage des échantillons

Des disques fongiques d'un diamètre d'environ 1,5 cm sont découpés en périphérie de la colonie et mis à incuber pour une durée de 15, 30 et 45 minutes dans des cupules contenant 1 ml de milieu MMN dépourvu de source azotée auquel est ajouté de l'urée marquée à 1 mM final (55,3 mCi mmol^{-1}). L'échantillon est ensuite rincé pendant 2 min dans une solution de sulfate de Calcium 0,1 mM, puis conservé au congélateur avant d'être lyophilisé, pesé et analysé.

4.4.2. Quantification de la radioactivité et expression des résultats

Le champignon lyophilisé est digéré dans des tubes à scintillation par du Soluène 350 (Packard) pendant une nuit à 60°C, 3 ml de liquide de scintillation (Ionic Fluor) est ajouté et la radioactivité dans les tissus est quantifiée au compteur à scintillation. Les résultats sont exprimés en cpm/mg MS.

5. Technique d'extraction et d'analyse des acides nucléiques

5.1. 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 3 ml de culture bactérienne en milieu TB ou LB en fin de phase exponentielle de croissance. Le volume final d'ADN et de 100 µl avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 600 ng/µl. La qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 0,8% où il doit apparaître sous forme de trois bandes correspondant aux trois formes d'enroulement du plasmide.

5.2. Extraction de l'ADN génomique des différents champignons étudiés

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit " Dneasy Plant Mini Kit " (Qiagen) à partir de 100 mg de mycélium congelé. Le volume final d'ADN est de 200 µl avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 200 ng/µl. La qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 0,8% où il doit apparaître sous forme d'une bande large, de taille comprise entre 20 et 25 kpb.

5.3. Extraction des ARN totaux

5.3.1. Extraction des ARN totaux de champignon en culture pure

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du kit " Rneasy Plant Mini Kit " (Qiagen) à partir de 100 mg de mycelium. Les ARN sont repris dans 50 µl d'eau " Rnase free " (traitée au DEPC) avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 1 μg/μl. La qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 1% où les ARNr 25 S et 17S apparaissent comme deux

	Tampon d'extraction	TE
Tris-HCl, pH 8	100 mM	10 mM
EDTA	20 mM	1 mM
NaCl	0,5 M	-
SDS	0,5%	-
β-mercaptoethanol	0,1 M	-

Tableau 18 : Tampons utilisés lors des extractions d'ARNs de m ycélium extramatriciel et des mycorhizes.
La solution mère de β-mercaptoethanol (14M) est ajoutée extemporanément au tampon. Le pH final de la solution de TE est ajusté à 7,5.

bandes intenses. La bande correspondant aux ARNr 25S doit être approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARNr 17S.

5.3.2. Extraction des ARNs totaux de mycorhizes et de mycelium extramatriciel

La très faible quantité de matériel prélevée, notamment concernant le mycélium extramatriciel ne permettant pas une extraction d'ARNs totaux basée sur le protocole précédemment décrit, une autre méthode a été utilisée (la composition des tampons utilisés est donnée dans le tableau 18):

Quelques milligrammes de tissus sont broyés au broyeur vibrant (MM300, RETSCH). 750 µl de tampon d'extraction sont mélangés à 150 µl de phénol (Aquaphénol, Appligène) et ajoutés à la poudre préalablement obtenue. Après homogénéisation, le mélange est incubé dans un bain marie à 65°C pendant 10 min. 450 µl de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont incubés dans de la glace pendant 15 min. Le mélange est centrifugé 10 min à 9000g à 4°C. La phase aqueuse est précipitée par ajout de LiCl à une concentration finale de 2M. Les tubes sont incubés 1 à 2 heures dans la glace et centrifugés 10 min à 9000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est traité à la Rnase free-Dnase (Qiagen) pendant 15 min. 170 µl de TE pH 7,5 sont ajoutés ainsi que 250 µl de phénol. Les tubes sont centrifugés à 14 000g à 4°C pendant 5 min et le surnageant est additionné de 250 µl de chloroforme. Après centrifugation à 14 000g à 4°C pendant 5 min et collecte du surnageant, 250 µl de chloroforme sont ajoutés à nouveau et les tubes sont soumis à la même étape de centrifugation. Les ARNs sont ensuite précipités par 82,5 µl d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et 500 µl d'éthanol 100%. Les tubes sont incubés 1 nuit à -70°C puis centrifugés 10 min à 9 000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé 2 fois à l'éthanol 70% avant d'être séché et repris dans 30 µl d'eau contenant 0,02% DEPC.

5.4. Analyse des taux de transcrits par Northern blot

5.4.1. Préparation des membranes

Les ARNs sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % (p/v) en conditions dénaturantes. L'agarose est porté à ébullition dans 43,5 ml d'eau stérile complétés par 5 ml de tampon MOPS[acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique]/EDTA 10X composé de MOPS

0,2 M, d'EDTA 10 mM et d'acétate de sodium 50 mM. La solution est refroidie à 50°C et est complétée par 2,55 ml de formaldéhyde 36 % (v/v) puis coulée dans la cuve.

Avant d'être déposés sur gel d'agarose, les échantillons (20 µg d'ARNs) sont mélangés à 1 volume d'une solution dénaturante composée de formamide 53 % (v/v), formaldéhyde 17 % (v/v), MOPS 10X 10,5 % (v/v), glycérol 7 % (v/v), bleu de bromophénol 5,6 % (v/v) et d'eau exempte de RNase 7 % (v/v). Les échantillons ainsi préparés sont chauffés à 65°C pendant 5 min puis immédiatement refroidis dans la glace et déposés sur le gel d'agarose.

L'électrophorèse est réalisée dans le tampon MOPS sous une tension de 4 V/cm pendant 4 h à température ambiante.

Après migration, le gel est immergé pendant 20 min dans une solution de NaOH 0,05 N, rincé pendant 3 fois 10 min dans de l'eau stérile traitée au DEPC puis immergé 40 min dans une solution de 20X SSC. Le transfert est réalisé par simple diffusion pendant 20 h dans du tampon 20X SSC. Après transfert, les membranes sont rincées dans du tampon 6X SSC puis séchées 30 min à température ambiante. Les ARNs sont ensuite fixés à la membrane par irradiation aux U.V. pendant 2,5 min.

5.4.2. Préparation des sondes d'ADN double brin marquées radioactivement

Le marquage d'ADN double brin est réalisé par la technique d'amorçages multiples (Feinberg & Vogelstein, 1984). Avant d'être marqués, les produits d'amplification sont préalablement purifiés par électrophorèse en gel d'agarose selon le protocole du kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification".

L'ADN matriciel, après dénaturation par la chaleur (10 min à 100°C), est mis en présence d'un mélange de nonanucléotides, du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et des 4 dNTPs dont l'un est radiomarqué. Les nonanucléotides hybridés à l'ADN matriciel fournissent à l'enzyme des amorces 3'OH à partir desquelles sera synthétisé un brin complémentaire radioactif.

Cette synthèse est réalisée à l'aide du kit "NonaPrimer™" (Appligène-Oncor) selon le protocole décrit par le fournisseur en présence de [α-^{32}P]dCTP (110 TBq/mmol, Amersham).

L'ADN radiomarqué est purifié selon le protocole du kit Qiaquick Nucleotide Removal (Qiagen). La radioactivité incorporée est quantifiée en utilisant un compteur à scintillation. La radioactivité spécifique de la sonde varie de $1x10^7$ à $1x10^9$ cpm/µg d'ADN.

5.4.3. Conditions d'hybridation

Les températures de préhybridation et d'hybridation varient selon l'homologie entre la sonde et l'ADN cible d'une part, et d'autre part leur pourcentage de paires de bases (G+C).
Une étape préliminaire à l'hybridation (la préhybridation) est nécessaire pour saturer les sites libres des filtres de nylon où sont fixés les ADNs. Les filtres sont placés dans un tube à hybridation en présence de tampon d'hybridation (1 ml/10 cm2) (Tableau 19). La préhybridation est réalisée pendant 2 heures à 37°C ou 42°C dans un four à hybridation à agitation rotative (Hybridizer, Techne).
La sonde marquée est dénaturée par chauffage à 100°C pendant 10 min puis refroidie dans la glace avant d'être ajoutée dans le tube à hybridation à raison de 10^7 cpm/ml de tampon. L'hybridation est effectuée à 37°C ou 42°C pendant 16 h. Afin de réaliser les normalisations indispensables à l'analyse des signaux des taux de transcrits, une hybridation d'une sonde ITS 1-4 avec l'ADNc de la sous-unité 25S est utilisée comme standard interne.

5.4.4. Conditions de lavages

Après hybridation, les filtres sont rincés 3 fois pendant 20 min à température ambiante dans du 2X SSC, 0,5 % SDS (p/v). Ces lavages sont suivis d'un lavage supplémentaire réalisé dans du 1X SSC, 0,1 % SDS (p/v) pendant 30-45 min à 65°C

5.4.5. Conditions de révélation

Après les lavages, les membranes sont rincées brièvement dans du 2X SSC à température ambiante puis exposées avec un film autoradiographique (Kodak BioMax MS) à -70°C entre 2 écrans amplificateurs. Les temps d'exposition varient de 7 h à plusieurs jours. Les signaux ont été évalués avec un densitomètre couplé au logiciel Quantity one (Bio-Rad).

Composés	Northern et Southern blot	Filtres à ADNc
Formamide	50 % (v/v)	-
SSC 20X:	5X	5X
NaCl	3 M	
Citrate de Na	0,3 M	
Denhardt 50X :	5X	5X
Ficoll	10 g/ l	
Polyvinyl pyrrolidone	10 g/ l	
BSA	10 g/ l	
SDS	0,1 %(p/v)	0,5 %(p/v)
Tris-HCl pH 7,6	20 mM	-
ADN de sperme de saumon dénaturé	200 µg/ ml	100 µg/ ml

Tableau 19 : Composition des tampons de préhybridation et hybridation pour les Northern blot, Southern blot et les filtres à ADNc.

5.5. Analyse de l'ADN génomique par Southern Blot (Southern, 1975)

5.5.1. Digestion et transfert d'ADN sur membranes

Environ 20 µg d'ADN génomique sont digérés par des enzymes de restriction sélectionnées. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%, puis dépurinisés par immersion du gel dans une solution d'HCl 0,2 N pendant 10 min puis transférés sous vide sur membrane de nylon N^+ (Appligène) à l'aide de l'appareil commercialisé par Appligène (TransDNA Express), dans une solution de NaOH 0,4 N.
Après transfert, les membranes sont rincées brièvement dans du tampon SSC 2 X (NaCl 300 mM, citrate de sodium 30 mM). L'ADN est fixé à la membrane par irradiation aux U.V. pendant 2,5 min.

5.5.2. Conditions d'hybridation, de lavage et de révélation

Ces conditions sont les mêmes que celles utilisées en analyse Northern Blot (§ 5.4.)

5.6. Analyse des taux de transcrits par filtres à ADNc

L'analyse de l'expression des gènes à l'aide de filtres d'ADNc a consisté à hybrider par une sonde complexe constituée des ADNc issus d'une population d'ARN totaux, marqués radioactivement au ^{33}P, des membranes de nitrocellulose sur lesquelles ont été déposés les ADNc précédemment obtenus. Ces dépôts ont été effectués par la société Eurogentec (Belgique).

5.6.1. Préparation des ADNc

Les ADNc sont issus d'une d'ADNc clonée dans le plasmide pGEM-T, disponible au laboratoire (A. Brun, 2001), conservée sous forme de clones bactériens à -70°C dans 35% de glycérol en plaque de 96 puits. Ces ADNc ont été obtenus par hybridation soustractive et suppressive (Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) à partir de mycélium en culture sur glutamine (30 mg/l) ou $(NH_4)_2HPO_4$(250 mg/l).

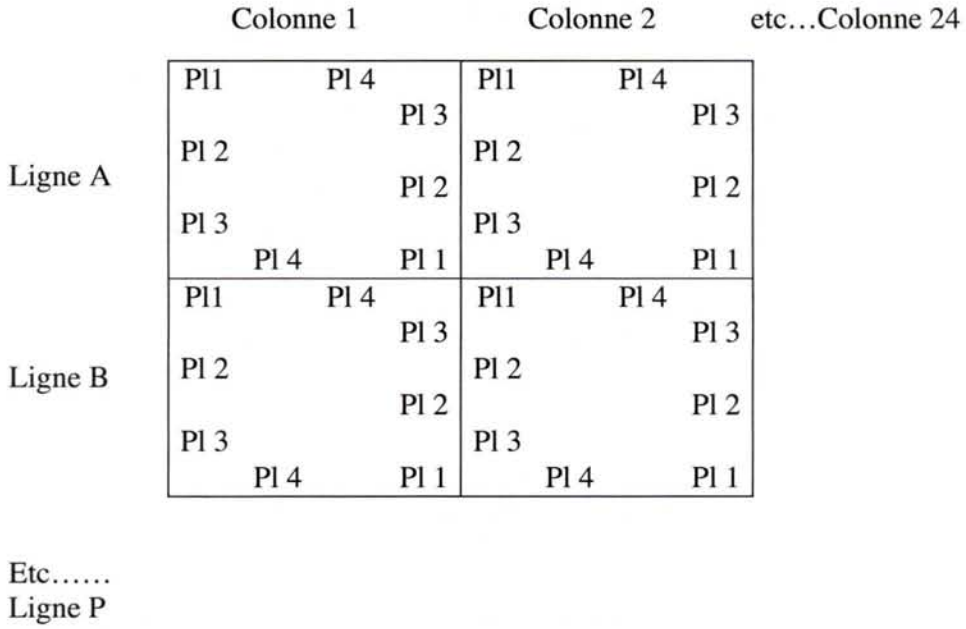


Figure 27 : Plan de dépôt des ADNc sur les filtres de Nylon par la société Eurogentec.

En colonne 1/ ligne A vont être déposés les ADNc qui correspondent à la colonne 1/ ligne A des plaques de 384 puits selon la disposition présentée.

Les plaques de microtitration stockées à -70°C sont repiquées à l'aide d'un réplicateur dans de nouvelles plaques dont les puits contiennent 100 µl de milieu LB liquide additionné d'ampicilline à 50 mg/ml. Les plaques sont alors incubées pendant 12 h à 37°C.
Les ADNc sont amplifiés par PCR à partir des cultures bactériennes en utilisant les amorces universelles SP6 et T7.
La présence, la taille et la concentration des inserts sont vérifiées par migration, en présence du marqueur de taille φX174 DNA/ Hae III (MBI Fermentas), sur un gel d'agarose à 2 %, puis coloration au BEt. Dans ces conditions, une réaction PCR produit en moyenne 30 ng/ µl d'ADN. Les produits d'amplification sont conservés dans des plaques de 384 puits à -70°C jusqu'à utilisation.

5.6.2. Préparation des filtres d'ADNc

Les 4 plaques de 384 puits sont envoyées congelées à Eurogentec (Liège, Belgique). Les produits PCR sont prélevés et déposés sur des filtres de nitrocellulose par leurs soins en utilisant le robot MicroGrid (Biorobotics, Cambridge, UK). Les pointes de 0.4 mm déposent 500 nl de chaque produit PCR en duplicat avec un espacement de 500 µm sur des filtres de 7x10 cm saturés en NaOH 0.1 M. La densité est de 16 ADNc par cm2 pour une seule plaque mais de 66 ADNc par cm2 si l'on dépose 6 plaques en duplicat (comme c'est le cas ici). Les filtres de nitrocellulose sont lavés et les ADNc fixés selon le protocole d'Eurogentec.
L'ordre général de dépôts des clones se fait selon un carré de 6 points sur 4 points comme schématisé ci-dessous, avec un dépôt de chaque clone en duplicat dans un même bloc (Figure 27).
Afin de s'affranchir d'une éventuelle hybridation aspécifique des plasmides utilisés, nous avons également fait déposer sur les membranes les amplifications des zones de clonage des différents plasmides que nous avons utilisés pour les clonages.

5.6.3. Préparation des sondes radioactives

Les sondes radioactives sont préparées à partir d'ARN totaux extraits de mycélium extramatriciel de *P. involutus* et de mycorhizes de *P. involutus/B. pendula* cultivé en microcosme (§ 3.3.2.). 300 ng d'ARN totaux sont ensuite convertis en ADNc à l'aide du kit "SMART™ PCR cDNA Synthesis" (Clontech) en suivant les instructions du fournisseur.

Environ 200 ng d'ADNc de chacune des conditions sont dénaturés par la chaleur (10 min à 100°C) et marqués radioactivement. Cette synthèse est réalisée en présence de [α-^{33}P]dCTP et de [α-^{33}P]dATP (110 TBq/mmol, NEN Perkin Elmer). Les sondes ainsi marquées sont purifiées comme décrit précédemment (§ 5.4.2.). La radioactivité incorporée est quantifiée en utilisant un compteur à scintillation (4 µl dans 400 µl de liquide de scintillation). La radioactivité spécifique de la sonde varie de 1.10^5 à 2.10^5 cpm/µg d'ADN.

5.6.4. Conditions d'hybridation et de lavage

5.6.4.1. Conditions d'hybridation

Une étape préliminaire à l'hybridation est nécessaire pour saturer en ADN les sites libres des filtres de nitrocellulose où sont fixés les ADNc. Les filtres sont placés dans des tubes à hybridation en présence de 20 ml de tampon de préhybridation (Tableau 19). La préhybridation est réalisée pendant 3 heures à 65°C dans un four à hybridation à agitation rotative (Robbins Scientific).

La sonde marquée ($2x10^6$ cpm/ml de tampon) est dénaturée par chauffage à 100°C pendant 10 min puis refroidie dans la glace, avant d'être ajoutée au tampon d'hybridation (identique au tampon de préhybridation sauf qu'il ne contient que 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé) préchauffé à 65°C. Le tampon de préhybridation est remplacé par 20 ml de tampon d'hybridation. L'hybridation est effectuée à 65°C pendant 20 h.

5.6.4.2. Conditions de lavages et d'exposition

Après hybridation, les filtres sont d'abord rincés 3 fois à température ambiante dans du SSC 2X, SDS 0,05 % pendant 5 min. Ensuite, les filtres sont lavés à 65°C successivement dans du SSC 2 X, SDS 0,05 %; puis dans du SSC 1 X, SDS 0,1 %; et enfin dans du SSC 0,1 X, SDS 0,1 % . Chaque lavage est réalisé 2 fois dans un laps de temps de 40 min.

Après les lavages, les filtres sont séchés brièvement, emballés dans un film plastique puis exposés sur l'écran de PhosphorImager (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Le temps d'exposition varie de 4 à 60 h de façon à faire apparaître le plus grand nombre de signaux.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

5.6.5. Numérisation et normalisation des signaux

5.6.5.1. Acquisition des données

L'écran activé est scanné à l'aide du laser Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), puis les filtres sont numérisés avec une définition de 50 µm. L'image est transférée sur un PC travaillant sous Système Linux (Su SE Professional 8.0) et la quantification de chaque signal est réalisée à l'aide du logiciel Xdots Reader 2.0 (COSE, Paris) et les valeurs numériques obtenues sont transférées vers le logiciel Microsoft Excel en vue de leur traitement.

5.6.5.2. Normalisation des données

La première étape consiste donc à tenir compte du bruit de fond, des zones sont donc choisies aléatoirement autour des zones de dépôts pour chaque filtre, sans interférer avec ces dernières. La moyenne de ces valeurs est ensuite retranchée aux valeurs brutes des ADNc déposés sur le filtre considéré.
Les valeurs de chaque clone sont ainsi normalisées et analysées statistiquement, en tenant compte des duplicats de chaque clone sur les membranes et des 3 répétitions biologiques, par un test-t Bayesian (Cyber-T ; http//visitor.ics.uci.edu/genex/cybert/).

5.7. Analyse des taux de transcrits par RT-PCR

Entre 300 ng et 1 µg d'ARN totaux préalablement extraits (§ 5.3.), sont rétrotranscrits en utilisant le Kit Omniscript (Qiagen) selon le protocole décrit par le fournisseur. Pour un volume réactionnel de 20 µl, sont ajoutés 2 µl d'oligodT18(10µM), 2 µl de dNTP (5 mM), 5 µl de tampon 10X et 1 µl de reverse transcriptase (4U/µl). La réaction se déroule à 37 °C pendant une heure et 2 µl des ADNc ainsi produits sont amplifiés par PCR. Afin d'éviter une saturation de l'amplification, un gradient de cycles est réalisé. A chaque nombre de cycle déterminé, pouvant aller de 15 à 39 cycles, 5 µl de mélange réactionnel sont prélevés et analysés sur gel d'électrophorèse.

5.8. Techniques d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction)

5.8.1. Géneralités

La technique PCR utilisée est celle décrite par Saiki et al., (1985). 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.

5.8.2. 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 Tm théorique proche pour que la température d'hybridation choisie soit adéquate pour les 2 amorces. Le Tm est la température de fusion qui correspond à la température pour laquelle deux brins d'ADN sont associés par 50 % de leurs séquences complémentaires. La formule permettant de calculer la valeur du Tm est la suivante: $Tm = (2A+T) + 4(G+C)$.

5.8.3. Amorces dégénérées

L'amplification de fragments d'ADN dont la séquence est inconnue nécessite la conception d'amorces dites dégénérées. Pour cela, plusieurs séquences nucléotidiques connues correspondant à la séquence du gène recherché sont alignées et les zones les plus conservées sont considérées pour la conception d'amorces correspondant alors à un mélange de plusieurs amorces. Les symboles suivants sont utilisés : I lorsque l'on désire un mélange de A,G, C et T ; R pour G et A ; Y pour C et T ; H pour A, C et T ; D pour G, A, T ; K pour G et T ; M pour A et C ; S pour G et C ; V pour G, A et C et W pour A et T.

5.8.4. Composition de l'essai

La composition de l'essai pour un volume réactionnel de 50 µl est la suivante: 0,5 à 1 ng d'ADN cible sont mis au contact de 0,2 µM de chaque amorce nucléotidique et de 200 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides (dNTPs). La composition du tampon de réaction est: Tris-HCl 10 mM, pH 9; KCl 50 mM, MgCl2 1,5 mM; Triton X-100 0,1 %; BSA 0,2 mg/ml lorsque l'enzyme utilisée est l'ADN polymérase de Thermus aquaticus (Chien et al., 1976) fournie par Appligene et est additionnée à raison de 1 U.

Dans les cas où les produits de PCR serviront de matrice aux réactions de séquençage, ou bien seront clonés dans des vecteurs d'expression, ou encore dans les cas particuliers d'utilisation de certains kits, 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 commercialisées 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: Tricine-KOH 40 mM, pH 8,7; KOAc 15 mM; Mg(OAc)2 3,5 mM; BSA 3,75 µg/ml; Tween-20 0,005 %; Nonidet-P40 0,005 %.

5.8.5. 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 1 min pour les cycles suivants. Les conditions d'hybridation sont de 40 sec à 1 min à des températures comprises entre 50 et 68°C, cette valeur étant fonction des Tm de chaque amorce. Les conditions d'élongation sont de 1 min à 72°C. Le mélange est soumis à 34-35 cycles d'amplification dans les conditions décrites puis à un dernier cycle d'élongation de 10 min à 72°C. La durée de cette étape dépend de la longueur de la molécule d'ADN à synthétiser. Les amplifications réalisées grâce à des amorces dégénérées sont généralement obtenues grâce à des températures d'hybridation très basses (40 à 50°C).

5.9. Technique d'amplification rapide des extrémités des ADNc ou RACE

La technique RACE (Frohman et al., 1988) permet d'amplifier des séquences d'ADNc inconnues à partir de séquences connues, soit du côté 5' de la séquence connue, soit du côté 3': on parle alors de 5'- ou de 3'-RACE. Cette technique permet d'obtenir les ADNc pleine longueur. Il existe plusieurs variantes de la technique RACE, nous avons utilisé celle proposée par le kit "SMART™ RACE cDNA Amplification Kit" commercialisé par Clontech. Cette méthode fait également appel à la technologie SMART™.

5.9.1. Conception d'amorces

Des amorces spécifiques du gène étudié (GSP pour gene specific primer) sont conçues pour les réactions de 5'- et 3'-RACE. Les amorces doivent répondre à certains critères comme une longueur d'environ 25 nucléotides, un pourcentage en bases guanine plus cytosine voisin de 60 % et une valeur de Tm supérieure à 70°C. Deux amorces sont nécessaires: une amorce antisens (GSP1) pour les réactions de PCR de 5'-RACE et une amorce sens (GSP2) pour les réactions de PCR de 3'-RACE.

5.9.2. Synthèse des ADNc simple brin

Dans un premier temps, les ADNc 5'-RACE Ready et 3'-RACE Ready sont préparés. A 1 µg d'ARN totaux sont ajoutés 1 µM d'amorce oligo(dT)25 additionnée de deux bases aléatoires en 3' et 1 µM d'oligonucléotide SMART II pour la préparation de l'échantillon d'ADNc 5'-RACE Ready, ou bien 1 µM d'amorce oligo(dT)30 greffée à une portion de l'oligonucléotide SMART II en 5' et additionnée de deux bases aléatoires en 3' pour la préparation de l'échantillon d'ADNc 3''RACE Ready. L'hybridation est effectuée pendant 2 min à 72°C. Après un refroidissement dans la glace pendant 2 min, la synthèse du premier brin est réalisée en ajoutant à chacun des mélanges précédents: 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 6 mM MgCl2; 75 mM KCl; 2 mM DTT; 1 mM dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et 200 U de MMLV reverse transcriptase (Gibco BRL) et en incubant le tout 1 h 30 à 42°C. Le produit de réaction est dilué dans 100 µl de tampon tricine-EDTA (10 mM Tricine-KOH pH 8,5; 1 mM EDTA) et chauffé pendant 7 min à 72°C.

5.9.3. Amplification rapide des extrémités des ADNc (RACE)

Les amorces utilisées pour les réactions de PCR sont les deux amorces spécifiques du gène étudié (GSP1 et 2), ainsi que l'amorce UPM (universal primer mix) fournie qui reconnaît la séquence de l'oligonucléotide SMART II. L'ADN polymérase utilisée est l'"Advantage 2 Polymerase Mix" commercialisée par Clontech. (Figure 28)

Les réactions de PCR 5'-RACE sont composées de 2,5 µl d'ADNc 5'-RACE Ready auxquels sont ajoutés 5 µl d'amorce UPM; 0,2 µM de GSP1; 0,2 mM dNTPs et 1 µl d'"Advantage 2 Polymerase Mix" pour un volume final de 50 µl en présence du tampon réactionnel de l'enzyme. De la même façon, les réactions de PCR 3'-RACE sont composées de 2,5 µl d'ADNc 3'-RACE Ready auxquels sont ajoutés 5 µl d'amorce UPM; 0,2 µM de GSP2; 0,2 mM dNTPs et 1 µl d'"Advantage 2 Polymerase Mix" pour un volume final de 50 µl en présence du tampon réactionnel de l'enzyme.

Une touchdown PCR est pratiquée afin d'augmenter la spécificité de l'amplification. La température d'hybridation des premiers cycles de PCR est supérieure au Tm de l'UPM, et donc seule l'élongation à partir de l'amorce GSP a lieu. Puis la température d'hybridation est baissée pour permettre à l'UPM de s'hybrider, ce qui conduit à une amplification très spécifique. Les conditions de réaction de PCR sont les suivantes: 5 cycles composés des 2 étapes suivantes: 94°C pendant 5 sec, 72°C pendant 3 min 15 sec; suivis de 5 cycles composés des 3 étapes suivantes: 94°C pendant 5 sec, 70°C pendant 10 sec, 72°C pendant 3 min 15 sec; puis 23 cycles composés des 3 étapes suivantes: 94°C pendant 5 sec, 68°C pendant 10 sec, 72°C pendant 3 min 15 sec.

5.9.4. Caractérisation des fragments 5'- et 3'-RACE

Les produits PCR sont purifiés sur gel à l'aide du kit "GFX™ PCR DNA Purification et clonés dans le plasmide pGEM-T comme décrit § 5.11. Les minipréparations correspondant à chacun des fragments 5'- et 3'-RACE ont servi de matrice aux réactions de séquençage afin (1) de s'assurer que l'amplification est spécifique du gène étudié et (2) d'obtenir les séquences des régions voisines du codon ATG initiateur de la traduction et du codon stop.

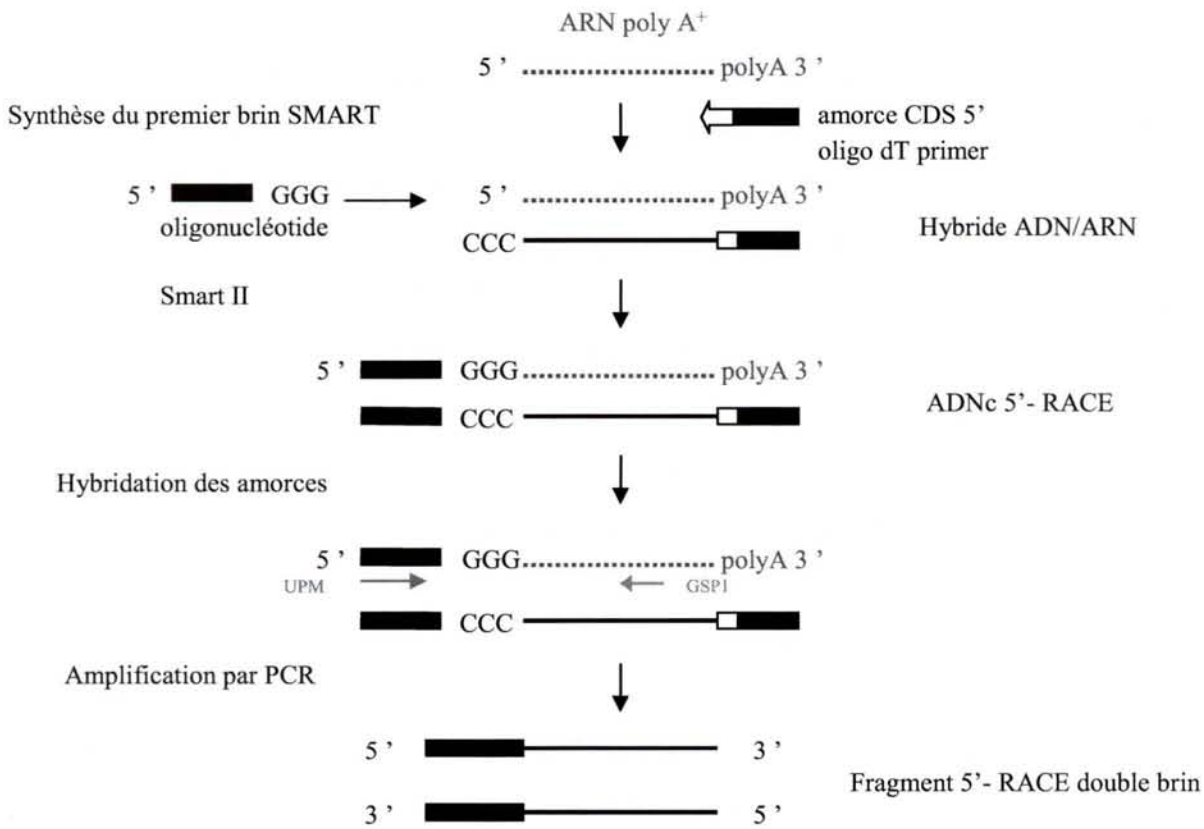


Figure 28: Principe de la technique SMART™ RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends).

Les ARN totaux sont d'abord convertis en ADNc simple brin (5 '-RACE Ready) en utilisant la technologie SMART ™ (Clontech). L 'amplification du fragment 5 '-RACE utilise une amorce universelle UPM qui reconnaît une séquence nucléotidique commune à l 'oligonucléotide SMART ™ et à l'oligo(dT) modifié et une amorce spécifique de l'ADNc étudié (GSP). Ces fragments peuvent ensuite être clonés et séquencés. L'analyse des séquences nucléotidiques permettra de concevoir des amorces spécifiques aux deux extrémités de la séquence codante de l'ADNc étudié et de l'amplifier à partir de la population 5'-RACE, pour obtenir l 'ADNc complet correspondant à la région codante.

5.9.5. Amplification du cadre ouvert de lecture (O.R.F.) de l'ADNc étudié

La connaissance des séquences nucléotidiques de ces deux régions (ATG et Stop) de l'ADNc va nous permettre de concevoir un nouveau couple d'amorces pour amplifier par PCR longue distance l'ORF entière. Pour faciliter le clonage orienté de cette ORF, chaque amorce est additionnée à son extrémité 5' d'un site de restriction différent.
L'ORF est générée en utilisant l'ADNc 5'-RACE Ready comme matrice et les deux amorces spécifiques des codons ATG et Stop dans les réactions de PCR RACE décrites au paragraphe précédent. Les conditions de réaction de PCR sont les mêmes que celles décrites précédemment.

5.10. Séquençage de l'ADN

Le séquençage est réalisé par la méthode de Sanger et al. (1977). L'analyse des réactions de séquençage à été réalisée par électrophorèse des fragments d'ADN marqué au ^{33}P puis autoradiographie du gel ou à l'aide d'un séquenceur automatique de type ABI Prism 310 Genetic Analyser par Christine Delaruelle (UMR INRA/UHP 1136 IaM). Pour l'obtention de séquences d'ADN de grande taille (>1kb), les échantillons ont été séquencés par le programme « Eco Read Fast » de la société Genome express (France).

5.11. Techniques de clonage

5.11.1. Préparation du vecteur

Le plasmide pGEM-T utilisé pour le clonage des fragments PCR est fourni dans le kit "pGEM-T Vector Systems" (Promega) prêt à l'emploi.

Concernant les autres vecteurs, ceux-ci sont linéarisés par la (ou les) enzyme(s) de restriction choisie(s) puis déphosphorylés afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même. Deux microgrammes de plasmide sont digérés pendant 2 à 4 h dans un volume de 50 µl, puis le tampon 10x de la phosphatase et l'enzyme sont ajoutés au mélange pour un volume final de 90 µl. La réaction se déroule à 37°C pendant 1h. Le vecteur digéré et déphosphorylé et alors

purifié à l'aide du Kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Pharmacia Biotech).

5.11.2. Préparation du fragment à cloner

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans le vecteur pGEM-T, sont purifiés directement ou après séparation sur un gel d'agarose, à l'aide du kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Pharmacia Biotech).
Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs autres que pGEM-T sont purifiés comme décrit précédemment et hydrolysés par la (ou les) enzyme(s) de restriction adéquate(s).

5.11.3. Ligation

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

$$\frac{\text{ng de vecteur x taille de l'insert}}{\text{taille du vecteur}} \times \frac{\text{mole d'insert}}{\text{mole de vecteur}} = \text{ng d'insert}$$

La ligation est conduite à 4°C pendant 16 h dans un volume de 10 µl final contenant 10 à 50 ng de vecteur, 20 à 100 ng de fragment à cloner, 1 unité de T4 ADN ligase dans le tampon de réaction préconisé par le fournisseur (Boehringer Mannheim). Le mélange est ensuite dialysé 20 min sur membrane 0,022 µM (Millipore) afin d'en éliminer les sels qui gènent la transformation.

5.11.4. Transformation des bactéries

5.11.4.1. Par électroporation

5.11.4.1.1. Préparation des cellules électrocompétentes

Les bactéries sont précultivées une nuit dans 100 ml de milieu LB. 30 ml de cette préculture sont ensuite ensemencées dans 800 ml de LB jusqu'à une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 1 (phase exponentielle de croissance). La culture est alors centrifugée à 4 000 g pendant 15 min. Les cellules sont lavées à deux reprises dans de l'eau ultrapure stérile et remises en

suspension dans du glycérol 10 %. Après une nouvelle sédimentation, le culot est dispersé dans 3 ml de glycérol 10 %. Cette suspension bactérienne est répartie par fractions de 40 µl qui sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -70°C.

5.11.4.1.2. Transformation des cellules compétentes

Les bactéries décongelées à 4°C sont additionnées de 0,5 µl du mélange de ligation. Après une incubation de 5 min dans la glace, le mélange est transféré dans une cuve à électroporation dont les électrodes sont espacées de 0,2 cm. La cuve est ensuite placée dans l'appareil à électroporation (Savant Instruments) puis soumise à un choc électrique de 14 kV/cm pour une capacitance de 25 mF et une résistance de 160 W. Ces conditions génèrent un pulse électrique d'environ 5 ms. Les cellules transformées sont reprises immédiatement dans 1 ml de milieu LB et incubées à 37°C pendant 1 h avant d'être étalées sur milieu LB solide additionné d'ampicilline à 50 mg/ml. L'incubation est poursuivie à 37°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes bien distinctes. L'efficacité de transformation par électroporation est habituellement supérieure à 10^8 transformants par µg d'ADN.

5.11.4.2. Par choc thermique $CaCl_2$

500 µl de 5 ml d'une préculture cultivée pendant une nuit à 37°C sont placés à 37°C dans 5 ml de LB pendant 1 à 2 heures. Les cellules sont ensuite centrifugées et reprises dans 500 µl de $CaCl_2$ froid (50mM). 200 µl sont ajoutés au mélange de ligation (environ 200 ng d'ADN). Les tubes sont congelés dans de l'azote liquide pendant 2 min et réchauffés à 37°C. Les bactéries sont transférées dans 5 ml de LB pendant 2 à 4 heures, puis centrifugées et étalées sur des boîtes de LB avec l'antibiotique de sélection.

6. Expression hétérologue dans *S. cerevisiae*

6.1. Transformation de *S. cerevisiae*

La transformation des cellules de levure par des plasmides d'expression est réalisée comme d'écrit dans Sherman et al. (1986), après traitement des cellules à l'acétate de lithium (AcLi) (Ito et al., 1983).

6.1.1. Préparation des cellules

100 ml d'une culture en milieu riche (Tableau 11) à DO 0,6 sont centrifugés 5 min à 4 000 rpm afin d'éliminer le milieu. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans successivement 30 ml puis 1 ml d'eau stérile. Les cellules sont ensuite lavées dans 1 ml d'un tampon TE 1x (0.01M tris-base; EDTA 0.001M pH 7,5) / AcLi 1x (0,1 M, pH 7,5) puis reprises dans 0,5 ml du même tampon. Les cellules sont alors compétentes.

6.1.2. Transformation

A 50 μl de cellules sont ajoutés, 5µl d'ADN " carrier " de sperme de saumon soniqué (10 mg/ml), 1 µg d'ADN à transformer et 300 μl d'une solution PEG 4 000 40%/TE 1x/AcLi 1x. Le mélange est incubé 30 min à 30 °C sous agitation puis un choc thermique est réalisé 15 min à 42°C. Les cellules sont ensuite rapidement lavées dans 1 ml d'eau et étalées sur milieu minimum solide sans uracile. Les clones apparaissent après quelques jours à 29°C. La fonction du gène cloné dans le vecteur d'expression de levure peut être vérifiée grâce à des tests de croissance sur des milieux de culture permettant la restauration d'un phénotype sauvage d'une souche de levure délétée pour la fonction d'intérêt (=test de complémentation fonctionnelle).

6.2. Cinétiques d'absorption de [^{14}C] urée dans *S. cerevisiae*

6.2.1. Marquage des échantillons

3 ml de culture cellulaire en milieu proline sont placés dans un bain agitant à 29°C. 0,25 mM de [^{14}C]Urée, est ajouté aux cellules au temps T0. Des échantillons de 1 ml sont prélevés à 6, 15 et 30 min, filtrés (filtre millipore 0,45 µM) et lavés avec environ 4 ml d'eau. Les filtres sont ensuite placés dans du liquide de scintillation (Picofluor, Packard) et la radioactivité est mesurée dans un compteur Beckman (DPM100).

6.2.2. Expression des résultats

La radioactivité incorporée est donnée en cpm. Connaissant la radioactivité spécifique de la solution utilisée et les DO à 600 nm des cultures cellulaires, les résultats peuvent être exprimés en nmol/mg prot/min.

7. Analyse bioinformatique

Les programmes informatiques utilisés sont hébergés pour la majorité sur les serveurs (http://www.infobiogen.fr et http://www.expasy.org/tools). Les comparaisons de séquences protéiques ont été réalisées à l'aide de l'algorithme BLAST (Basic Alignment Search Tool) version 2.0 (Altshul et al., 1994; Altshul et al., 1997). Le programme utilisé (blastx) compare les produits de la traduction de la séquence étudiée dans les six phases de lecture possible avec les séquences présentes dans les bases de données. Les banques de données consultées sont les banques non redondantes de séquences nucléotidiques et protéiques du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La caractérisation des protéines résultantes de la traduction de la séquence nucléotidique est réalisée à l'aide d'outils répertoriés dans le serveur (http://www.infobiogen.fr). Les bases de données biologiques PROSITE (http://www.expasy.org/tools) et *e*motif (http://motif.stanford.edu/emotif/emotif-search.html), regroupant les motifs, les signatures et les profils caractéristiques de protéines connues ont été utilisées pour obtenir des compléments d'information. Cet outil permet de formuler des hypothèses quant à la fonction d'une protéine issue de la traduction d'une séquence nucléotidique nouvellement séquencée.

La recherche des fragments transmembranaires et les prédictions de topologie sont réalisées à partir des algorithmes TMHMM (Sonnhammer et al., 1998) ; TMpred (Hofmann and Stoffel, 1992), HMMTOP (Tusnády and Simon, 2001).

Les alignements multiples ont été réalisés en utilisant la méthode Clustal W (Thompson et al., 1994). L'élaboration des arbres phylogénétiques a été réalisée à l'aide des logiciels Clustal X et TreeView.

Section 3- Résultats

1. Identification de gènes différentiellement exprimés dans le mycélium extramatriciel comparativement aux racines mycorhizées de la symbiose entre *Paxillus involutus* et *Betula pendula.*

Publication n°1 – Applied and Environmental Microbiology 2005

Résumé : Le développement de la symbiose ectomycorhizienne induit des changements drastiques de l'expression des gènes pour les deux partenaires. Cependant, la régulation spatiale de ces gènes est encore peu connue. Grâce à la technique des filtres à ADNc, les taux d'expression d'environ 1200 ESTs ont été comparés entre les apex mycorhiziens et le mycélium extramatriciel de l'association entre *Paxillus involutus* et *Betula pendula* dans un système en microcosme constitué de tourbe. Soixante-cinq gènes uniques sont différentiellement exprimés entre les deux compartiments fongiques. Au niveau des apex mycorhiziens, un gène codant pour une phosphatidylserine decarboxylase est surexprimé 24 fois, alors des gènes codant pour des transporteurs d'urée et de spermine sont surexprimés respectivement 4,1 et 6,2 fois dans le mycélium extramatriciel. De plus, l'urée est le composé majoritaire trouvé par analyse en GC-MS dans le mycélium extramatriciel. Ces résultats suggèrent que (i) il existe une différence spatiale dans le profil d'expression des gènes dans les apex mycorhiziens comparativement au mycélium extramatriciel, (ii) les transporteurs d'urée et de polyamine sont susceptibles de faciliter la translocation des composés azotés au sein du mycélium extramatriciel, et (iii) une phosphatidylserine decarboxylase fongique pourrait contribuer au réarrangement membranaire lors de la formation de l'ectomycorhize.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Jan. 2005, p. 382–391 Vol. 71, No. 1
0099-2240/05/$08.00+0 doi:10.1128/AEM.71.1.382–391.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Identification of Genes Differentially Expressed in Extraradical Mycelium and Ectomycorrhizal Roots during *Paxillus involutus-Betula pendula* Ectomycorrhizal Symbiosis

Mélanie Morel,[1] Christophe Jacob,[1] Annegret Kohler,[2] Tomas Johansson,[3] Francis Martin,[2] Michel Chalot,[1]* and Annick Brun[1]

UMR INRA/UHP 1136, Interactions Arbres/Micro-Organismes, Faculté des Sciences et Techniques, Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-les-Nancy,[1] and UMR INRA/UHP 1136, Interactions Arbres/Micro-Organismes, INRA Nancy, Champenoux,[2] France, and Department of Microbial Ecology, Lund University, Lund, Sweden[3]

Received 2 July 2004/Accepted 29 August 2004

The development of ectomycorrhizal symbiosis leads to drastic changes in gene expression in both partners. However, little is known about the spatial regulation of symbiosis-regulated genes. Using cDNA array profiling, we compared the levels of expression of fungal genes corresponding to approximately 1,200 expressed sequenced tags in the ectomycorrhizal root tips (ECM) and the connected extraradical mycelium (EM) for the *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizal association grown on peat in a microcosm system. Sixty-five unique genes were found to be differentially expressed in these two fungal compartments. In ECM, a gene coding for a putative phosphatidylserine decarboxylase (Psd) was up-regulated by 24-fold, while genes coding for urea (Dur3) and spermine (Tpo3) transporters were up-regulated 4.1- and 6.2-fold in EM. Moreover, urea was the major nitrogen compound found in EM by gas chromatography-mass spectrometry analysis. These results suggest that (i) there is a spatial difference in the patterns of fungal gene expression between ECM and EM, (ii) urea and polyamine transporters could facilitate the translocation of nitrogen compounds within the EM network, and (iii) fungal Psd may contribute to membrane remodeling during ectomycorrhiza formation.

Soils of temperate forests show both spatial and temporal heterogeneities in nutrient availability, particularly the availability of nitrogen, which is essential for growth processes (50). To access more nutrients, trees have developed a mycorrhizal strategy, in which the expanding mycelium of ectomycorrhizal fungi is able to explore a larger soil volume than the root alone (45). The ectomycorrhizal association is therefore a great advantage for controlling plant nutrient status and growth.

The well-characterized structure of *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizae (7) is formed by three components: a sheath enclosing the root, an intraradicular network of hyphae, and an outwardly growing system of hyphae, which form essential connections with both the soil and the fruit bodies (50). The ectomycorrhizal mantle provides a structure suitable for nutrient storage and plays a key role in controlling nutrient transfer between the fungus and the plant through its intimate contact with the root surface (35). The extraradical mycelium (EM), which extends from the mantle as single hyphae or linear aggregates of such hyphae, is of additional importance, because these structural attributes form the connection between the mantle and the soil and thus provide pathways for nutrient exchange (41). The positive effect of ectomycorrhizal fungi on plant nutrition could be attributed largely to the activity of EM. The ability of *P. involutus* to take up and transfer nitrogen compounds to its host, *B. pendula* Roth, was demonstrated by ^{15}N feeding experiments (14, 18, 23). It was shown that labeled N was incorporated into a range of amino acids in the fungal mycelium at considerable distances from the fungal sheath. The main sinks for assimilated N appeared to be Glu-Gln, Asp-Asn, and Ala (16, 32). In addition, nutrient mobilization from natural organic substrates in the fermentation horizon of forest soils may be a function of the vegetative mycelium of mycorrhizal systems. An increase in the activities of nutrient-mobilizing enzymes in *P. involutus* colonizing birch litter and a significant decline in the nutrient contents of the colonized litter were demonstrated (4, 37).

Moreover, mycorrhizal roots act as greater sinks for newly fixed ^{14}C-photosynthates than do nonmycorrhizal roots (NMR) in *Eucalyptus pilularis-Pisolithus* sp. associations, especially in young mycorrhizae (9). These labeled compounds, which are likely to be in the form of trehalose, mannitol, and arabitol, are translocated at rates in excess of 20 cm h^{-1} through the mycorrhizal mycelium from the host toward the advancing hyphal front (16, 17). The exchange of nutrients and carbohydrates in ectomycorrhizal symbiosis likely follows rules of a simple "fair trade," probably regulated by signaling substances in response to environmental changes (60). Indeed, it was shown that elevated levels of CO_2 increase the trading potential of the plant, whereas elevated levels of mineral N increase the trading potential of the fungus (21).

Conventional molecular approaches and large-scale gene profiling experiments have identified several symbiosis-regulated genes in model systems such as *Eucalyptus globulus-Pisolithus microcarpus* (59), *Tilia platyphyllos-Tuber borchii* (40), *Pinus* sp.-*Laccaria bicolor* (39), and *B. pendula-P. involutus* (25). Nevertheless, no global molecular approach has yet been applied in investigations of spatial differences in gene expression to study gene regulation in the different compartments of

* Corresponding author. Mailing address: Université Henri Poincaré—Nancy I, UMR INRA/UHP 1136, Interactions Arbres/Micro-Organismes, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. Phone: 33 3-83 68 42 38. Fax: 33 3-3 68 42 92. E-mail: Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr.

the symbiosis. Instead, global transcription studies so far conducted have been designed to allow comparisons of gene expression in ectomycorrhizae, root tissues, or pure cultures of fungi in axenic systems. One therefore needs to consider an intact ectomycorrhizal system providing ideal natural simulations for determining mycorrhizosphere-driven nutrient cycling in forest soils by allowing the formation of EM. Such a system was developed by Read and coworkers with mycorrhizal pine and birch seedlings (4, 17) and was used to study nutrient translocation within a symbiotic association as described before (14, 16, 37).

Previous results suggested that the amount of NADP-Gdh in *Cenococcum geophilum* decreased progressively from the peripheral cells of the sheath to the most internal cells of the Hartig net (5, 11), suggesting that EM possesses primary N-assimilating functions. It was then hypothesized that functional compartmentation occurs in intact ectomycorrhizal symbiosis.

In addition, some studies have provided examples of differential gene expression in the sheath and the Hartig net. Ectomycorrhizae of *Amanita muscaria-Populus tremula* × *tremuloides* were dissected (35), and it was found by reverse transcription (RT)-PCR that hexose transporter (AmMst1) expression was enhanced about sixfold in hyphae of the Hartig net compared with those of the fungal sheath. In contrast, phenylalanine ammonium lyase (AmPal) was only barely detectable in the Hartig net but was highly expressed in the fungal sheath. Moreover, as determined by in situ hybridization, Gln synthetase of *T. borchii* was expressed in symbiosis-engaged hyphae with *T. platyphyllos*; higher hybridization signals were seen in hyphae that were penetrating root cells (34).

Gene profiling with an intact ectomycorrhizal system including EM should allow the determination of specific cellular functions operating solely at the symbiotic interface or in the external mycelial network, especially in terms of nutrient acquisition and transfer. In this study, we combined the use of a two-dimensional peat microcosm to allow the formation of an intact mycorrhizal network from the *P. involutus-B. pendula* association (41) and a cDNA array approach to investigate the differential expression of fungal genes in EM and in the ectomycorrhizal root tips (ECM). Amino acid pools were also analyzed by gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS) to assess the nutrient status of the two compartments.

MATERIALS AND METHODS

Growth conditions and ectomycorrhiza synthesis. The ectomycorrhizal fungus *P. involutus* (Batsch) Fr. (ATCC 200175) was originally isolated from a fruiting body associated with 15- to 30-year-old *B. pendula* trees growing on coal waste in Midlothian, Scotland. The fungus was grown on cellophane-covered agar medium containing modified Melin-Norkrans medium (MMN). MMN contained (in milligrams liter^{-1}) the following: KH_2PO_4, 500; $(NH_4)_2HPO_4$, 250; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 50; NaCl, 25; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15; thiamine hydrochloride, 0.1; and $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1. The glucose concentration was 10 g liter^{-1}. For library constructions, Gln at 30 mg liter^{-1} or $(NH_4)_2HPO_4$ at 250 mg liter^{-1} was used. All pHs were adjusted to 5.5.

To synthesize ectomycorrhizae, seeds of birch (*B. pendula* Roth) from Docksta (Sweden) were stored dried at +5°C until required. They were surface sterilized with 5% (wt/vol) calcium hypochlorite for 30 min, rinsed in several changes of sterile distilled water, and then placed on agar petri dishes to germinate. Two-week-old seedlings were transferred to petri dishes on which the fungus *P. involutus* had been grown on peat-vermiculite (1:4 [vol/vol]) substrate moistened with double-strength MMN solution and supplemented with malt extract at 10 g liter^{-1} and glucose at 1.25 g liter^{-1}. Root systems were grown under aseptic conditions, whereas shoot parts were in contact with the atmosphere. Dishes were incubated in a growth chamber maintained with a 16-h photoperiod (150 μmol m^{-2} s^{-1}); day and night temperature and relative humidity were 22 and 18°C and 85 and 65%, respectively. After 10 weeks, mycorrhizal birch seedlings were transferred to humidified peat microcosms and returned to the growth chamber (16). At 2 weeks after transfer of the seedlings to the peat microcosms, EM and ECM were harvested from four different microcosms and pooled before RNA or amino acid extractions. ECM were made up of the Hartig net, mantle hyphae, and root cells, whereas EM, which had extended from ECM and had spread out onto the peat substrate, was collected at the margin (i.e., 10 cm away from the root tips). Three independent RNA or amino acid extractions were carried out.

Axenic mycorrhizal birch seedlings were produced as described previously (7). Pure cultures of mycelium and mycorrhizal roots were harvested at 4, 8, and 12 days after contact from four petri dishes and pooled before RNA extractions.

The *Escherichia coli* strain used was DH5α. Classical procedures for manipulating *E. coli* cells and DNA were essentially based on those described by Sambrook et al. (46).

cDNA library construction. Total RNA from fungi grown on NH_4^+- or Gln-containing MMN were extracted from approximately 100 mg of frozen mycelium by using an RNeasy plant minikit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Two double-stranded cDNA populations were synthesized from total RNA by using a Smart PCR cDNA synthesis kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, Calif.). Suppression subtractive hybridization (SSH) was performed by using a PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech). A population enriched for differentially expressed cDNAs with Gln (Gln cDNA population) was obtained after the SSH procedure when the Gln and NH_4^+ cDNA populations were considered the tester and the driver, respectively. Similarly, a population enriched for differentially expressed cDNAs with NH_4^+ (NH_4^+ cDNA population) was obtained with the original tester as a driver and the driver as a tester. In further experiments, both Gln and NH_4^+ cDNA populations were used for the construction of a plasmid cDNA library. PCR products from the SSH procedure were ligated into plasmid vector pGEM-T (Promega, Madison, Wis.) and transferred to DH5α competent cells. Bacterial clones were stored at −70°C in 35% glycerol.

DNA sequencing. Clones were transferred to 150 μl of 0.1 M Tris-EDTA buffer (pH 8) in 96-well microtiter plates. Cells were immediately lysed in a microwave oven and then stored frozen at −20°C until use. The bulk of cDNA sequencing was automated, with bacterial lysate as the starting material for PCR amplification of the plasmid insert and then 5′ DNA sequencing of purified PCR products. Reaction mixtures were prepared with a Biomek 2000 robot (Beckman Coulter, Roissy, France) in a 96-well microtiter format. PCR amplifications were performed with the universal T7 promoter primer (5′-TAATACGACTCACTA TAGGG-3′) and the SP6 promoter primer (5′-TATTTAGGTGACACTATAG-3′) and standard PCR protocols. PCR products were purified by isopropanol precipitation (46), followed by assessment of the size and quality by gel electrophoresis. Partial nucleotide sequences of the cDNA inserts were determined by using the dideoxy chain termination method (47) with either a BigDye Terminator kit (Applied Biosystems) or a CEQ Dye Terminator cycle sequencing Quick Start kit (Beckman) and the T7 promoter primer. Sequencing products were purified by isopropanol precipitation and then loaded onto an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) or a CEQ 2000 XL apparatus (Beckman). Base calling of DNA sequencer traces was conducted by using the PHRED program with the quality level set to 20 (15). After quality trimming and translation into all three forward frames, sequence comparisons against the GenBank nonredundant protein database were performed by using the FASTA program (6, 36). Expressed sequence tags (ESTs) from SSH were assembled by using a contig assembly program (20). Parameters for the contig assembly program were optimized for the EST data, and the following values were set: overlen, 20; percentage, 0.85; cutoff, 40; delta, 8.5; open, 0; and pos5, 20. The entire processing of EST data was performed by using the PHOREST tool (1).

RNA isolation for target preparation. Total RNAs from EM, ECM, and NMR of *B. pendula* grown in microcosms were extracted by using a hot phenol procedure. Tissues were ground (Retsch blender model MM 300; Qiagen) and homogenized in a mixture of extraction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8], 20 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 0.1 M β-mercaptoethanol) and phenol (Aquaphenol; 5:1 [vol/vol]; Appligene Oncor, Illkirch Graffenstaden, France), followed by incubation at 65°C for 10 min. After the addition of chloroform (1:1 [vol/vol]), the mixture was maintained on ice for 15 min and then centrifuged at 9,000 × *g* for 10 min at 4°C. The supernatant was collected, and RNA was precipitated by the addition of 8 M LiCl to a final concentration of 2 M. The pellet was resuspended in Tris-EDTA buffer (pH 7.5) and purified by a phenol-chloroform procedure. RNA finally was precipitated overnight in 3 M sodium acetate (pH 5.2)–100% ethanol (1:6 [vol/vol]), washed twice in 70% ethanol, and resuspended in diethyl pyrocarbonate-treated water.

TABLE 1. Primers used for RT-PCR and RACE-PCR analyses

Gene (function)	Primer(s)	Sequence
cipC (unknown)	cip1[a]	5′ GGGGAAGCTTATGCCCCACCACGAT 3′
	cip2[a]	5′ GGGGGATCCTCAGTAGCGATCTTT 3′
dur3 (urea transport)	dur1[a,b]	5′ GGCCCTTGCCGGAGTCATCT 3′
	dur2[a]	5′ ATCAGAGAAGCGGCAACG 3′
ti (translation initiation inhibitor)	ti1[a]	5′ GGCAACCAACCCAAGATG 3′
	ti2[a]	5′ GCGACGCCTTCTATCTCG 3′
psd (phosphatidylserine decarboxylase)	psd1[a]	5′ TTCCAAACCTGGGACGCTTT 3′
	psd2[a]	5′ TGAGGGTCGCCTGGGTTGAG 3′
	psd3[b]	5′ TCTCAAGGCTGGCTCACTGTCTCAT 3′
dal5 (allantoate transporter)	dal[b]	5′ TCAAATAGTGTATCTGAAGAGAGG 3′

[a] Used for RT-PCR.
[b] Used for RACE-PCR.

cDNA array construction. One-microliter quantities of the bacterial stocks were used to PCR amplify cDNA inserts with primers present in plasmid vector pGEM-T (Promega). The purity and length of all PCR products (20 to 40 ng μl^{-1}) were checked by agarose gel electrophoresis. The length of the PCR products varied between 300 and 1,000 bp. A total of 1,230 PCR products, which satisfied our quality control requirements (single PCR products with homogeneous band intensities), were arrayed from 384-well microtiter plates onto nitrocellulose membranes (Eurogentec, Seraing, Belgium) by using a microGrid spotting device (BioRobotics, Cambridge, United Kingdom) with a 384-pin gadget (27). The 0.4-μm pins deposited 100 nl of each PCR product in duplicate with a spacing of 500 μm between spots on filters (7 by 10 cm) saturated with NaOH (0.1 M) at a final density of approximately 55 clones per cm^2. The nitrocellulose filters then were washed, blocked, and baked according to the manufacturer's protocol (Eurogentec).

cDNA array hybridization. Complex probes were prepared by RT and PCR amplified by using the Smart PCR cDNA synthesis kit. Labeling of the cDNA probes was done in the presence of 30 μCi of [^{33}P]dCTP, 30 μCi of [^{33}P]dATP, and random hexamers by using a Prime-a-Gene kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The unincorporated labeled nucleotides were removed by using QIAquick columns (Qiagen). The nitrocellulose filters were preincubated in 30 ml of hybridization solution (5× SSC [1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate], 10× Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100 μg of shared salmon sperm DNA ml^{-1}) for 4 h at 65°C in an HIR10M rotating hybridization incubator (Grant/Boekel, VWR International, Strasbourg, France). The filters then were incubated in 10 ml of fresh hybridization solution containing ^{33}P-labeled probe at 65°C for 22 h. Hybridized filters were washed successively three times for 5 min each time in 2× SSC at room temperature, two times for 20 min each time in 2× SSC containing 0.5% SDS (65°C), two times for 20 min each time in 1× SSC containing 0.1% SDS (65°C), and two times for 20 min each time in 0.1× SSC containing 0.1% SDS (65°C). Air-dried filters then were wrapped in thin, flexible sheets of plastic and exposed to a phosphorimaging screen (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y.) for various periods (12 h to 3 days), after which the imaging plate was scanned by using Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) at a resolution of 50 μm per pixel.

Data analysis. To calculate the signal intensities of each spot, a grid was overlaid on phosphorimages and quantitation of signals was performed by using the volume quantitation method of XDOTREADER (Cose, Paris, France). Signal intensities lower than two times the mean of the background plus the standard deviation were eliminated, and central normalization was performed on the remaining valid data. A Bayesian statistical method (Cyber-T software; http://visitor.ics.uci.edu/genex/cybert/) based on the *t* test was used to test for statistically significant differences in gene expression for each pair of conditions tested. The Bayesian *t* test allows statistical inference to be made even when experiments are replicated only at nominal levels. It assumes that genes with similar expression levels have similar measurement errors (31).

RT-PCR analysis. Total RNA isolation was performed as described above except that RNase-free DNase (Promega) was applied to avoid genomic DNA contamination. RT reactions were performed with total RNA and with the enzyme Omniscript (Qiagen) as recommended by the manufacturer. RT reactions were performed for 60 min at 37°C, and RT products were used for PCR. The products were amplified by PCR with a Mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France) under the following conditions: 95°C for 1 min, followed by 24, 30, 30, and 33 cycles for *cipC* (concanamycin-induced protein type C gene), *dur3* (urea transporter gene), *psd* (phosphatidylserine decarboxylase gene), and *ti* (translation initiation inhibitor gene), respectively, at 95°C for 5 s, 60°C for 45 s, and 72°C for 1 min. The primers used are shown in Table 1. The suitability of the extracted RNA for RT-PCR amplification was checked by performing RT-PCR control experiments with *ti* and with primers ti1 and ti2 (Table 1). The control gene was one of those showing no differential expression on cDNA arrays.

RACE-PCR. First-strand cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA (extracted from *P. involutus* by using the RNeasy plant minikit) by using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), an RNase H-negative derivative from Moloney murine leukemia virus, according to the manufacturer's protocol. Specific primers psd3, dur1, and dal (Table 1) were designed from the sequences obtained from the library sequencing and were used in 5′ and 3′ rapid amplification of cDNA ends (RACE) reactions performed by using a Smart RACE cDNA kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. 3′ RACE fragments were successfully amplified for *dur3* and *psd*, and 5′ and 3′ RACE fragments were obtained for *dal5*.

Extraction of amino acids and GC-MS analysis. Amino acids were extracted and analyzed by GC-MS as described previously (24).

RESULTS

Amino acid and urea contents. The most abundant nitrogenous compounds detected in ECM were Glu, Asp, and Urea (Fig. 1a). Including Ala, Val, Leu, and Ser, which were found at lower concentrations, the total content of N compounds was 3.6 nmol mg^{-1} (dry weight). In EM, urea was the major nitrogenous compound detected (Fig. 1b), representing 73.0% (0.9 nmol mg^{-1} [dry weight]) of the total soluble N compounds (Fig. 1c). Urea was also found in free-living mycelia (FLM) of *P. involutus*, although it represented only 1.9 and 11.0% of the total soluble N compounds in mycelia grown on MMN with 3.8 mM N (FLM +N) and on N-free MMN (FLM −N), respectively (Fig. 1c). Indeed, concentrations of free amino acids were much higher in free-living mycelia (110.3 and 17.2 nmol mg^{-1} [dry weight] on MMN with 3.8 mM N and on N-free MMN, respectively) than in the microcosm system used in the present study (Fig. 1). It must be noted that the amino acids detected in ECM may well be of plant origin, since NMR contained 28.2 nmol of free amino acids mg^{-1} (dry weight) (Fig. 1c).

EST analysis. A set of 1,230 clones were collected after SSH performed on free-living mycelia. The SSH procedure, comparing Gln-fed mycelia (N derepression, i.e., low internal amino acid content) and ammonium-fed mycelia (N repres-

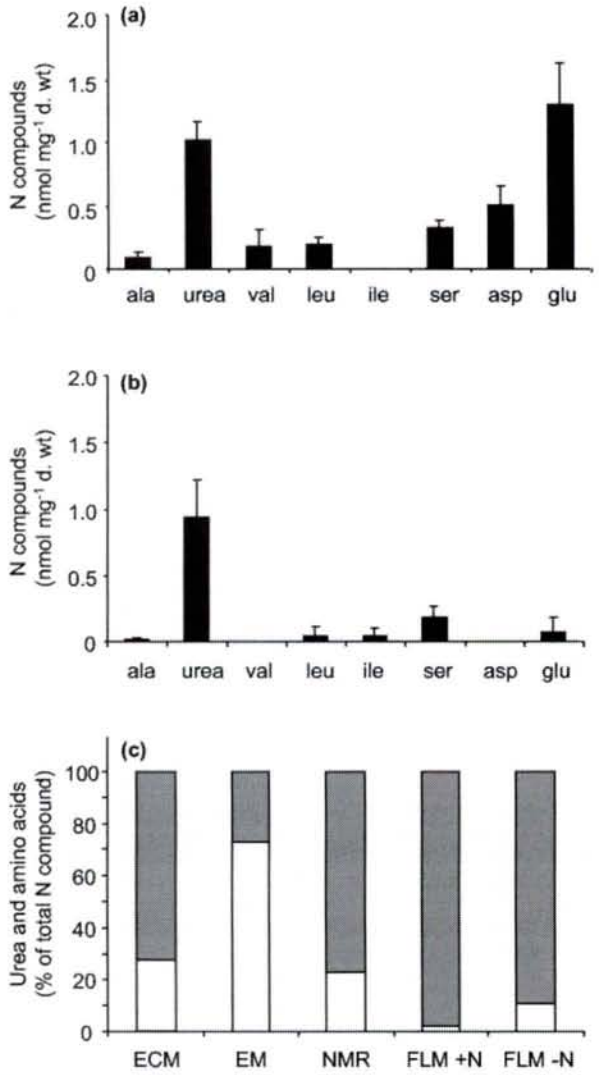


FIG. 1. Amino acids and urea in various components of the *P. involutus-B. pendula* symbiosis. (a and b) Amino acids and urea were measured in ECM (a) and in EM (b) of *P. involutus-B. pendula* microcosms. d. wt, dry weight. (c) Proportions of urea (white bars) and total amino acids (gray bars) were calculated and expressed as percentages of total N compounds measured; 100% represented 3.6, 1.3, 36.6, 112.5, and 19.3 nmol mg^{-1} (dry weight), respectively, in ECM, EM, and NMR of *P. involutus-B. pendula* microcosms and in free-living mycelium grown on medium with 3.8 mM N (FLM +N) or on N-free medium (FLM −N). Amino acid and urea contents were determined by GC-MS analysis as described in Materials and Methods.

sion, i.e., high internal amino acid content), was performed to produce cDNA libraries enriched in genes involved in N nutrition and in genes that are usually underrepresented in cDNA libraries (i.e., transporter genes). A total of 892 ESTs were successfully sequenced (>99 bp) (Table 2). The ESTs were assembled into 623 tentative consensus contigs, each putatively representing one gene. Of those, 76% appeared as singletons. The redundancy seemed low compared to that seen in similar projects (25) and may indicate that the subtractive hybridization reduced a pool of more common transcripts. The assembled sequences were analyzed for homology with known sequences in databases by using the BLASTX program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Totals of 46, 33, and 19% of the sequences, respectively, displayed low, moderate, and high degrees of similarity to protein sequences in the GenBank nonredundant protein database (1).

Among the most redundant clones, we found ESTs coding for acyl coenzyme A oxidase (nine ESTs), cytochrome P450 (eight ESTs), 40S ribosomal protein S27 (seven ESTs), 40S ribosomal protein S15 (seven ESTs), 40S ribosomal protein S12 (six ESTs), a protein involved in actin filament assembly (Arp2-3) (six ESTs), and actin (five ESTs). A large proportion of the identified sequences corresponded to proteins involved in primary metabolism (29.0%); protein synthesis (17.0%); protein fate (8.0%); transport (7.8%); control of cellular organization (4.7%); cell rescue, defense, and virulence (4.2%); regulation (3.6%); and the cell cycle (0.8%).

Differential gene expression in EM and ECM. To assess gene expression profiles in EM and ECM, cDNAs from the subtracted libraries were arrayed at high density on nitrocellulose membranes. Probes were synthesized from EM and ECM total RNAs and used for hybridization. Twenty-eight percent of the signals showing intensities lower than two times the mean of the background plus the standard deviation were eliminated before statistical analysis. Central normalization was applied, compensating for the probable dilution of fungal transcripts in mycorrhizae due to extraction from material containing both fungal and plant RNAs. It was previously shown, by using several independent techniques, that only 30% of the transcripts extracted from *P. involutus-B. pendula* ectomycorrhizae are of plant origin (25). We confirmed that the higher level of transcripts found in ECM was not due to transcripts of *B. pendula* roots by hybridizing a membrane with a probe synthesized from RNA from NMR grown under similar conditions. No signals were detected, indicating that there was no cross hybridization between the plant target and the fungal reporters (data not shown). Principal-component analysis performed with GeneAnova software demonstrated that transcript profiles between the two compartments analyzed were statistically

TABLE 2. cDNA library characterization

Parameter	Value[a]
Total	1,230
ESTs	892
Assembled sequences[b]	
Total	623
Singletons	76%[c]
Sequence similarity[d]	
Orphans	3%
Low (<100)	46%
Moderate (100–299)	33%
High (>299)	19%

[a] Given as numbers, unless otherwise indicated.

[b] Assembled sequences, putatively representing different transcripts, refer to the combined sets of contigs (assembled continuous sequences) and singletons after assembly by the contig assembly program (20).

[c] Fraction of singletons out of the total number of assembled sequences, an indication of the level of redundancy.

[d] ESTs are distributed according to various ranges of sequence homology scores after sequence comparison with the GenBank nonredundant protein database (1).

TABLE 3. Transcripts significantly up-regulated in ECM

Function	GenBank accession no.	Best database match[a]	Expected value[b]	Bayes.lnp[c]	PPDE[d]	Fold change between ECM and EM
Metabolism, cell rescue, and transport	CN072155	Phosphatidylserine decarboxylase (*Psd*) (*Arabidopsis thaliana*)	6e−04	4.38E−06	0.996	23.98
	CN072156	CipC protein (*Emericella nidulans*)	2e−12	9.24E−06	0.993	21.41
	AF114848	Manganese superoxide dismutase (*Paxillus involutus*)	7e−43	5.00E−04	0.910	8.06
	CN072157	Guanine nucleotide binding protein beta subunit (*Lentinula edodes*)	8e−53	1.37E−03	0.840	5.79
	CN072158	Polyubiquitin (*Bos taurus*)	3e−48	8.91E−03	0.590	4.19
	CN072159	Inorganic diphosphatase (EC 3.6.1.1) (*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*)	2e−33	2.06E−02	0.450	3.26
	CN072162	Rehydrin-like protein (*Candida albicans*)	5e−41	1.07E−02	0.561	2.17
	CN072163	Symbiosis-related protein (*Laccaria bicolor*)	2e−17	4.35E−02	0.333	1.97
Protein synthesis and transcription	CN072164	Ribosomal protein L12 (*Neurospora crassa*)	3e−40	2.61E−04	0.940	12.64
	CN072165	60S ribosomal protein 19-a (*Schizosaccharomyces pombe*)	3e−35	5.25E−04	0.907	8.47
	CN072166	Translation initiation factor eIF1; Sui1p (*Saccharomyces cerevisiae*)	8e−24	1.05E−03	0.860	7.92
	CN072167	60S ribosomal protein L36 (*S. pombe*)	1e−07	1.11E−03	0.854	6.55
	CN072168	Ribosomal protein S9 (*S. pombe*)	2e−33	3.81E−03	0.718	5.62
	CN072169	40S ribosomal protein S27 (*S. pombe*)	7e−24	4.37E−03	0.699	5.51
	CN072170	Ribosomal protein S28 (*N. crassa*)	1e−32	2.80E−03	0.759	5.33
	CN072171	Ribosomal protein L26 (*Oryza sativa*)	1e−08	2.87E−03	0.755	5.31
	CN072172	60S ribosomal protein L12 (*Rattus norvegicus*)	4e−53	7.10E−03	0.626	5.30
	CN072173	Ribosomal protein L35 (*Paracoccidioides brasiliensis*)	9e−10	4.02E−03	0.711	5.30
	CN072174	Ribosomal protein 10 (*C. albicans*)	2e−27	3.51E−03	0.730	5.10
	CN072175	Cytoplasmic ribosomal protein S7 (*Podospora anserina*)	3e−12	3.00E−03	0.750	4.90
	CN072176	Elongation factor 3 (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*)	1e−11	4.24E−03	0.704	4.51
	CN072177	Homology to rat L35a; Rpl33ap (*S. cerevisiae*)	6e−33	1.29E−02	0.529	4.30
	CN072178	40S ribosomal protein S12 (*S. pombe*)	1e−17	6.85E−03	0.632	4.15
	CN072179	Ribosomal protein S3a (*Cicer arietinum*)	5e−69	1.03E−02	0.567	4.13
	CN072180	Heat shock protein 90 (*Trypanosoma cruzi*)	2e−23	6.10E−03	0.650	4.12
	CN072181	Elongation factor Tu; mitochondrial precursor (*S. pombe*)	3e−09	1.04E−02	0.565	3.51
	CN072197	40S ribosomal protein S3ae (*C. albicans*)	9e−57	1.87E−02	0.466	3.44
	CN072182	Ribosomal protein L11 (*Oryzias latipes*)	3e−18	1.87E−02	0.466	3.38
	CN072183	60S ribosomal protein L27a (*Mortierella alpina*)	7e−24	2.19E−02	0.441	3.15
	CN072184	Rat S25; Rps25ap (*S. cerevisiae*)	1e−19	1.19E−02	0.543	3.05
	CN072185	Alpha-NAC[e] protein (*A. thaliana*)	2e−14	2.62E−02	0.411	3.02
	CN072186	Translation initiation factor eIF4A.1 (rabbit)	8e−93	4.70E−02	0.322	2.85
	CN072187	Ribosomal protein L41 (*Coprinopsis cinerea*)	8e−42	4.38E−02	0.332	2.70
Unknown	CN072188	No homology	ND	8.22E−05	0.971	11.50
	CN072189	No homology	ND	2.91E−04	0.935	9.48
	CN072190	Predicted protein	3e−12	1.46E−03	0.830	6.69
	CN072191	Hypothetical protein	3e−04	6.23E−03	0.647	5.43
	CN072192	No homology	ND	2.66E−03	0.765	5.26
	CN072193	No homology	ND	5.24E−03	0.673	4.87
	CN072194	Hypothetical protein (*Schizophyllum commune*)	9e−06	4.44E−03	0.697	4.82
	CN072195	No homology	ND	8.00E−03	0.607	4.48
	CN072196	Hypothetical protein	1e−05	1.85E−02	0.469	3.61
	CN072198	No homology	ND	1.41E−02	0.514	3.33

[a] Best database match and corresponding species obtained with BLASTX search.
[b] Degree of similarity to known genes given by BLASTX. ND, not determined.
[c] *P* value associated with the Bayesian *t* test of log-transformed data.
[d] PPDE, a posteriori probability of differential gene expression between ECM and EM.
[e] NAC, nascent.

different (data not shown). Moreover, there were no significant variations among the three independent replicates analyzed as well as among redundantly spotted clones and duplicated spots. According to a statistical analysis based on a Bayesian *t* test with Cyber-T software (31), a total of 65 unique transcripts (19.5%) of *P. involutus* were differentially expressed ($P < 5 \times 10^{-2}$) between EM and ECM, with signal intensity ratios ranging from 1.9- to 24.0-fold (Tables 3 and 4). Seventeen of these 65 differentially expressed transcripts had no homology with any known sequence, and some of them may be of importance for the functioning of the symbiotic structure.

Forty-three transcripts showed up-regulated expression in ECM, with a *P* value of $<5 \times 10^{-2}$ (Table 3). Among the most abundant transcripts, a large proportion represented genes for homologues of ribosomal proteins (19 ESTs), 5 coded for translation and elongation factors or heat shock proteins, and 10 coded for proteins with unknown functions. A gene encoding a putative phosphatidylserine decarboxylase (Psd) related to *Arabidopsis thaliana* Psd showed 24-fold up-regulation in ECM. From the *psd* EST (Table 3), a forward primer was designed (psd3) (Table 1) to allow the amplification of an 866-bp 3′ fragment by RACE-PCR; this analysis revealed a 1.10^{-44} degree of similarity (E value) to *Burkholderia fungorum* Psd. This enzyme catalyzes the formation of phosphatidylethanolamine (PE) from phosphatidylserine (PS) (58). To confirm the up-regulation of *psd* in ECM, we measured its expression in a *P. involutus-B. pendula* axenic symbiotic system,

TABLE 4. Transcripts significantly up-regulated in EM

Function	GenBank accession no.	Best database match[a]	Expected value[b]	Bayes.lnp[c]	PPDE[d]	Fold change between EM and ECM
Metabolism, cell rescue, and transport	CN072199	Major facilitator superfamily multidrug efflux transporter (*Tpo3*) (*Schizosaccharomyces pombe*)	6e−19	5.00E−03	0.680	6.18
	CN072201	Dihydroorotase (*Ustilago maydis*)	3e−14	5.45E−03	0.667	4.91
	CN072202	Golgi membrane sorting protein (*S. pombe*)	3e−16	5.47E−03	0.667	4.21
	CN072203	Urea active transport protein (Dur3) (*Oryza sativa*)	6e−13	4.30E−03	0.702	4.10
	CN072204	Alpha-mannosidase (*S. pombe*)	2e−13	2.62E−02	0.411	3.99
	CN072205	Ubiquitin-like protein (*Cicer arietinum*)	6e−09	7.70E−03	0.614	3.84
	CN072206	Arsenite-translocating ATPase (*S. pombe*)	5e−35	3.13E−02	0.383	3.55
	CN072207	Subtilisin-like serine protease (*Coprinopsis cinerea*)	2e−42	2.54E−02	0.416	3.17
	CN072209	Aldose reductase (*Magnaporthe grisea*)	6e−14	4.74E−02	0.321	2.62
Protein synthesis and transcription	CN072210	40S ribosomal protein S10 (*Lumbricus rubellus*)	1e−14	9.27E−04	0.869	8.83
	CN072211	Probable translation release factor Erf3 (*Neurospora crassa*)	1e−07	2.90E−02	0.395	3.65
Unknown	CN072212	No homology	ND	1.66E−03	0.817	8.98
	CN072213	No homology	ND	5.83E−04	0.901	8.86
	CN072214	No homology	ND	9.66E−04	0.866	7.39
	CN072215	No homology	ND	2.60E−03	0.768	7.11
	CN072216	No homology	ND	2.31E−03	0.782	5.31
	CN072200	No homology	ND	2.58E−03	0.768	5.22
	CN072217	No homology	ND	1.04E−02	0.564	4.15
	CN072218	No homology	ND	1.82E−02	0.471	3.95
	CN072219	No homology	ND	1.02E−02	0.568	3.70
	CN072220	No homology	ND	3.47E−02	0.367	3.29
	CN072221	No homology	ND	3.48E−02	0.366	2.91

[a] Best database match and corresponding species obtained with BLASTX search.
[b] Degree of similarity to known genes given by BLASTX. ND, not determined.
[c] *P* value associated with the Bayesian *t* test of log-transformed data.
[d] PPDE, a posteriori probability of differential gene expression between EM and ECM.

which allowed us to monitor the development of the symbiotic structure in a time course series as described previously (7). Interestingly, *psd* transcripts were not detected in the free-living mycelium, whereas their expression increased markedly after 4, 8, and 12 days of contact between fungal and root cells (Fig. 2).

Another gene that was highly up-regulated in ECM (21.4-fold) was homologous to a gene encoding CipC protein (concanamycin-induced protein type C) from *Emericella nidulans*. This EST corresponds to the full-length cDNA (351 bp). The up-regulation of *cipC* in ECM was confirmed by RT-PCR (Fig. 3). Although its function remains unknown, its abundance was strikingly increased when *E. nidulans* was grown in concanamycin-containing medium, leading to drastic changes in hyphal morphology (33).

A putative manganese superoxide dismutase homologue was up-regulated in ECM (8.1-fold), in agreement with the up-regulation of manganese superoxide dismutase in ectomycorrhizal tissue compared with the free-living fungus (25). This enzyme was previously characterized in *P. involutus* (22) and might function as a defense mechanism against high concentrations of reactive oxygen species. A gene coding for a putative rehydrin-like protein, a peroxiredoxin, was up-regulated 2.2-fold in ECM. This enzyme is also able to detoxify various hydroperoxides and peroxynitrites (44). A homologue for a gene coding for polyubiquitin, a highly conserved protein, implicated in the function of vital cellular processes by protein

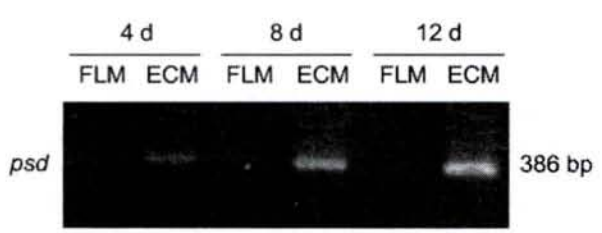


FIG. 2. Levels of *psd* transcripts after RT-PCR in free-living mycelium (FLM) and ECM of *P. involutus-B. pendula* axenic cultures after 4, 8, and 12 days (d) of contact. Mycorrhizae were synthesized as described previously (7). The primers used are listed in Table 1. The cycle number used is given in Materials and Methods.

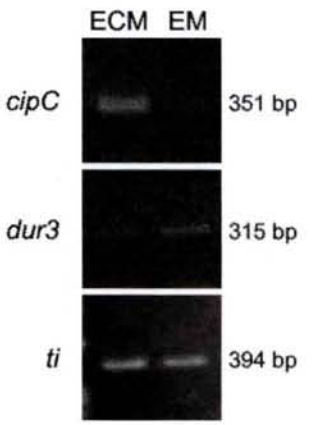


FIG. 3. Levels of *cipC*, *dur3*, and control gene *ti* transcripts after RT-PCR in ECM and in EM of *P. involutus-B. pendula* microcosms. The primers used are listed in Table 1. The cycle number used for each gene is given in Materials and Methods.

degradation, was up-regulated 4.2-fold in ECM. A homologue for a gene coding for a putative symbiosis-related protein of *L. bicolor* (Aut7), which has been shown to be involved in vesicular transport and autophagocytosis (26), was up-regulated 2.0-fold. The *aut7* transcripts were not detected in the free-living fungus and seemed to be dependent on a symbiotic interaction with the host plant (26). The protein encoded by this gene may thus play a key role during the colonization of the root by the fungus by providing necessary components for hyphal biogenesis and differentiation. Genes coding for a putative guanine nucleotide binding protein and inorganic diphosphatase were also up-regulated in ECM (5.8- and 3.3-fold, respectively) (Table 3).

In EM, 22 genes were significantly up-regulated, with a *P* value of $<5 \times 10^{-2}$ (Table 4), although the functions of 11 of these were unknown. A gene coding for a multidrug efflux protein from the major facilitator superfamily was found to be up-regulated (6.2-fold) in EM compared to ECM. It was a homologue (E value, 5.10^{-11}) of the *Saccharomyces cerevisiae tpo3* vacuolar spermine transporter gene (56). The first step of polyamine biosynthesis is the formation of putrescine, which is synthesized from ornithine by ornithine decarboxylase. Spermine, which is derived from putrescine by the activity of spermine synthase, then is oxidized by a polyamine oxidase, leading to the formation of 1,3-aminopropylpyrroline and H_2O_2 (Fig. 4). Both ornithine decarboxylase- and polyamine oxidase-encoding genes were slightly up-regulated in EM (1.3- and 1.7-fold, respectively) (data not shown). A gene coding for a putative dihydroorotase, which produces dihydroorotate from ureidosuccinate during the synthesis of pyrimidines, was 4.9-fold up-regulated in EM (Fig. 4). In agreement with these data, transcripts of a putative allantoate-ureidosuccinate transporter (Dal5) were up-regulated in EM (3.1-fold). This gene was not included in Table 4 because it did not meet the condition of a *P* value of $<5 \times 10^{-2}$ (*P* value, 8.4×10^{-2}). A 1,428 bp full-length cDNA obtained for *dal5* by RACE-PCR showed a 4.10^{-59} degree of similarity (E value) to the *S. pombe* allantoate transporter gene. Allantoate can be produced by purine catabolism and degraded into urea by the activity of allantoicase. Furthermore, an EST (*dur3*) that was homologous to a gene coding for a putative urea transporter was found to be up-regulated 4.1-fold in EM compared to ECM. From the *dur3* EST (Table 4), a forward primer was designed (Table 1) to allow the amplification of a 749-bp 3′ fragment by RACE-PCR; this analysis revealed a 2.10^{-18} degree of similarity (E value) to the *Oryza sativa* urea transporter. The up-regulation of *dur3* in EM was confirmed by RT-PCR (Fig. 3). Moreover, a homologue for the gene (*ureG*) coding for the urease accessory protein, a component of urease, was expressed (data not shown). This result may indicate that *P. involutus* possesses the enzymatic capacity to produce ammonia from urea.

Genes coding for a putative Golgi membrane sorting protein, alpha-mannosidase, arsenite-translocating ATPase, serine proteinase, and aldose reductase were also up-regulated in EM (4.2-, 4-, 3.5-, 3.2-, and 2.6-fold, respectively) (Table 4).

DISCUSSION

We have shown a spatial pattern of fungal gene expression in EM and ECM that suggests differences in metabolism in the two compartments. Among the fungal genes being up-regulated the most in ECM compared to EM is a homologue for a phosphatidylserine decarboxylase (Psd) gene (Table 3). We confirmed, in a time course experiment with an axenic system described previously (7), that *psd* was indeed up-regulated in the mycelium attached to the roots, whereas it remained almost undetectable in the free-living mycelium (Fig. 2). In all organisms, Psd plays a key role in phospholipid metabolism by catalyzing the formation of PE from PS (58). In *S. cerevisiae*, two different enzymes exist; one (Psd1) is associated with the inner mitochondrial membrane (61), and the other (Psd2) is associated with the Golgi and vacuolar compartments (57). In *A. thaliana*, mRNA of a mitochondrial Psd was found to be expressed throughout the plant (43). In agreement with a previous report suggesting that symbiosis development leads to increased membrane formation (28), these results suggest that the up-regulation of the *psd* gene in ECM could allow the synthesis of newly formed membranes at the symbiotic interface. This process could allow for the incorporation into the membrane of new permeases required for the transfer of N compounds at the symbiotic interface. The up-regulation of *psd* expression in *P. involutus-B. pendula* may be also linked to changes in the phospholipid fractions observed in *Pinus sylvestris-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal roots (29). Additionally, PE, the product of PS decarboxylation, may also be involved in the integration and stabilization of proteins in membranes and in membrane-membrane contact, as demonstrated for *S. cerevisiae* (13, 42).

Supported by the up-regulation of a gene coding for a vacuolar spermine transporter in EM (Tpo3), we hypothesize that the long-distance translocation of N compounds along the mycelial network, such as spermine, which has a low C/N ratio (2.5), occurs through vacuole exchange. It has repeatedly been demonstrated that vacuoles are motile structures that can be translocated from cell to cell across the dolipore septum for relatively long distances (2, 12, 49). Polyamines, whose biosynthesis, release, and uptake have been demonstrated in *P. involutus* (19), could be produced and stored in the vacuole, as suggested for *S. cerevisiae* (56). Thus, in ectomycorrhizal associations, the vacuole system may act as a conduit to move nitrogen between hyphal tips and the plant-fungus interface. This view is consistent with the observed translocation patterns of phosphorus through ectomycorrhizal mycelia in association with pine seedlings (53). Polyphosphates were detected in fungal vacuoles of ectomycorrhizae (8, 51), and Arg and Gln were proposed to be the associated cations to neutralize them (51). Through vacuole exchange, these N compounds, in particular, Arg, could be translocated from extraradical to intraradical mycelium, as already described for endomycorrhizal and ectomycorrhizal systems (3).

However, Arg and other urea cycle intermediates (ornithine and citrulline) were not detected in EM but were readily detected in *P. involutus* mycelia grown on standard MMN (10). It was shown previously that, after ammonium supply, Ala, Glu, or Gln and Asp or Asn were the most abundant amino acids and the major sinks for labeled N incorporation, both in EM and in mycorrhizal tips in a *P. involutus-Fagus sylvatica* microcosm (18). In peat medium of the microcosm, where no nutrients were applied and no amino acids were detected, the mycelium did not accumulate free amino acids (Fig. 1); the latter

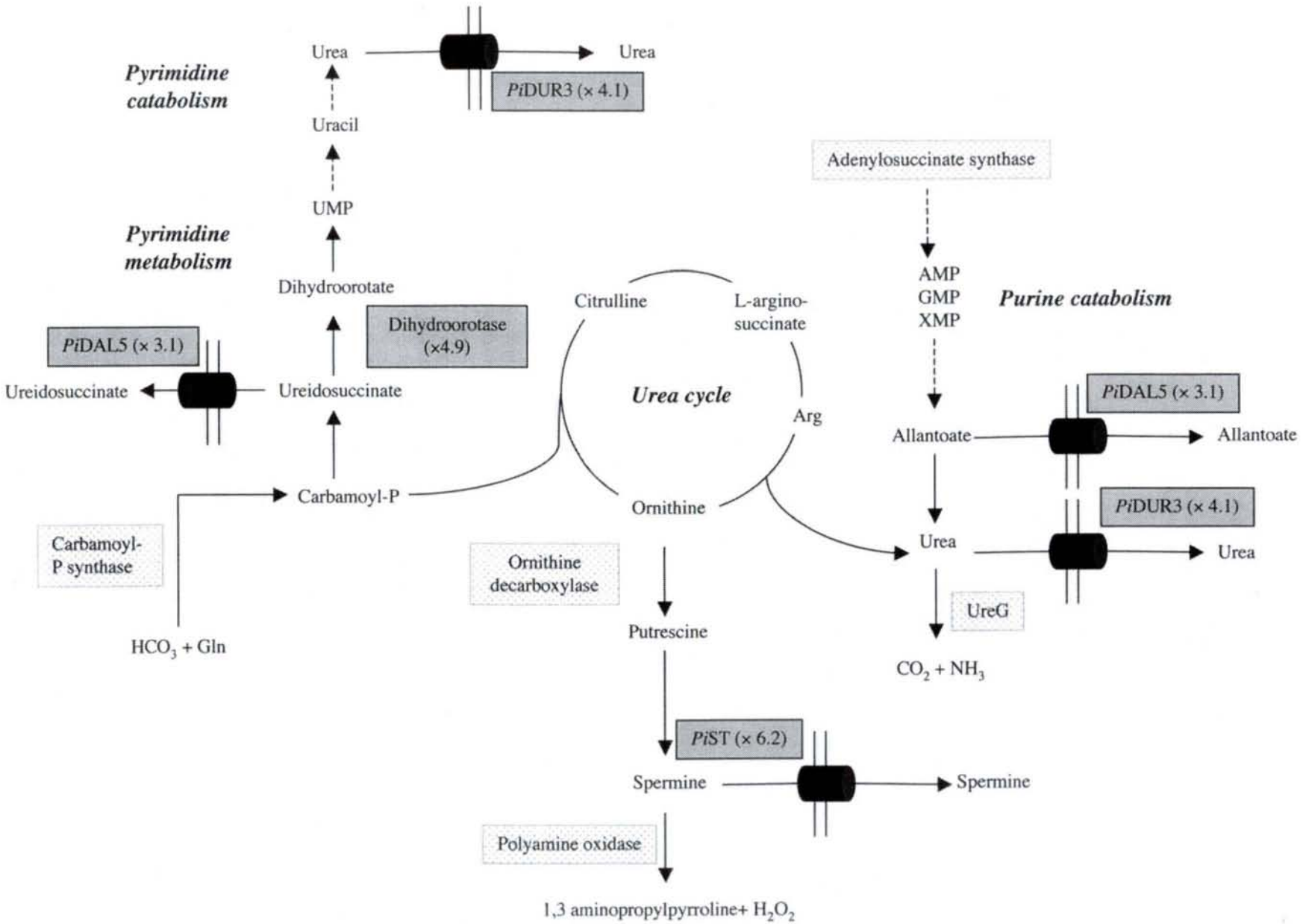


FIG. 4. Proposed model for urea, allantoate, and spermine synthesis and translocation in EM. Gray boxes represent proteins for which the corresponding genes were found to be up-regulated in EM. The expression ratios are given in parentheses. Stippled boxes represent expressed genes encoding proteins involved in the pathways described but not found to be up-regulated in EM. Urea could originate from the urea cycle and both pyrimidine and purine catabolism, with allantoate as an intermediate. Spermine could originate from ornithine, a urea cycle intermediate. These compounds could be translocated through EM by urea (Dur3), allantoate (Dal5), and spermine (Tpo3) transporters, which were found to be up-regulated in EM.

were probably directly incorporated into proteins. Conversely, a high proportion of urea was detected in our mycorrhizal system, indicating a rapid turnover of urea cycle intermediates, which could occur in an N-starved system (Fig. 1c). This "futile" cycle probably takes place to feed the margin of EM with carbon compounds, such as ornithine, to allow the survival of these active hyphae. Urea in EM may also originate from purine catabolism through allantoate degradation (Fig. 4). *P. involutus* was able to grow on 1 mM allantoate or urea, producing 29.6 and 20.9 mg of fresh weight biomass, respectively (compared with 67.2 and 2.5 mg for NH_4^+-grown and N-starved mycelia, respectively); these results demonstrated that it is able to use allantoate and urea as N sources for growth, as demonstrated by Schultz et al. (48). Moreover, urea has been shown to be an obligate intermediate in and the penultimate product of the catabolism of pyrimidine ring nitrogen (52). The synthesis of pyrimidines involves dihydroorotase, which is encoded by a gene observed here to be up-regulated in EM (Fig. 4). These data suggest that pyrimidines are probably synthesized at the active margin of the mycelium, while older hyphae possibly degrade them for the release of urea.

Thus, degradation products (allantoate and/or urea) of purine and pyrimidine catabolism may serve as nitrogen sources when the preferred nitrogen sources, e.g., Glu, ammonia, or Gln, are exhausted. In agreement with these conclusions, we observed the up-regulation in EM of genes homologous to the genes for a urea transporter (Dur3) and an allantoate-ureidosuccinate transporter (Dal5) (Table 4), possibly ensuring the transfer of these N sources between hyphae. Observations of ^{14}C-α-aminoisobutyric acid transport in colonies of *Phanerochaete velutina* are consistent with the idea that nutrients effectively cycle through the mycelium from a loading site and are drawn off as required at different sinks (54, 55). Moreover, such circulation of nutrients in fungal mycelia should equalize differences in nutrient concentrations in various parts of the mycelia, enabling the net translocation of nutrients from areas of nutrient availability to those of nutrient demand (30).

For the growth conditions used, we could not find any statistical difference between EM and ECM in transcriptional levels for Gln synthetase, Glu synthase, Ala aminotransferase, or Asp aminotransferase, which are involved in the assimilation of ammonia. Instead, the genes for these enzymes were expressed in both compartments, a finding which may suggest that the corresponding enzymes are constitutively expressed in our system. Thus, EM does not favor primary amino acid anabolism under our starvation conditions; rather, the results indicate that the activation of urea-producing pathways may occur in EM.

The up-regulation in ECM of 25 ESTs coding for proteins involved in protein synthesis, including ribosomal proteins and translation factors, supports the fact that ECM cells need to rearrange their structure and metabolism to form an efficient symbiotic organ. It was previously shown that plant transcripts corresponding to ribosomal proteins were also up-regulated during ectomycorrhiza formation (25). Indeed, the intercellular penetration and formation of the Hartig net induce a profound change in the morphology and metabolism of fungal hyphae (7, 50). Hyphal proliferation and prolific branching, decreased interhyphal spacing, and increased hyphal density around roots are primary events that are often observed during ectomycorrhiza formation (50). We may therefore speculate that the up-regulation of *cipC* may be linked to changes in the growth morphology of the fungus. Interestingly, *cipC* homologues have also been found in several EST studies of ECM fungi, including *Laccaria laccata* and *P. tinctorius* (38).

Our results allow us to hypothesize that the spatial regulation of transport functions occurs in the intact mycorrhizal system used. It appears that the active hyphae of ECM could represent an important sink for phospholipids from the plant under the nutrient starvation conditions used, considering the up-regulation of *psd*.

Genes up-regulated in EM code for proteins (Dur3 and Tpo3) involved in the transport of N compounds. Long-distance translocation of specific N compounds (such as spermine) or hypha-to-hypha transfer of urea seems to occur in EM but would not be needed in ECM, where other amino acids (Glu and Asp) may serve as primary N sources.

Further investigations are needed to understand how the mycelium may adjust its metabolism under changing nitrogen conditions. A combination of transcriptional and biochemical studies should allow determination of the form in which nitrogen is transferred to the host plant, depending on the soil nitrogen status.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martina Peter and Sébastien Duplessis for helpful assistance and advice on cDNA array analysis and Nicolas Rouhier for helpful discussions. We also acknowledge Antoine Le Quéré and Eva Friman at Lund University, Pierre-Emmanuel Courty, and Christine Delaruelle for technical assistance and sequencing.

The research used in part the DNA sequencing and functional genomics facilities at INRA Nancy financed by INRA and Région de Lorraine through Institut Fédérateur de Recherche No. 110. DNA sequencing was also performed at the SWEGENE Center of Genomic Ecology at the Ecology Building, Lund University, supported by the Knut and Alice Wallenberg Foundation through the SWEGENE Consortium.

REFERENCES

1. **Ahren, D., C. Troein, T. Johansson, and A. Tunlid.** 2004. PHORESTt: a web-based tool for comparative analyses of expressed sequence tag data. Mol. Ecol. Notes **4:**311–314.
2. **Ashford, A. E.** 1998. Dynamic pleiomorphic vacuoles: are they endosomes and transport compartments in fungal hyphae? Adv. Bot. Res. **28:**119–159.
3. **Bago, B., P. Pfeffer, and Y. Shachar-Hill.** 2001. Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytol. **149:**4–8.
4. **Bending, G., and D. Read.** 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. New Phytol. **130:**411–417.
5. **Botton, B., and B. Dell.** 1994. Expression of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in eucalypt ectomycorrhizas. New Phytol. **126:** 249–257.
6. **Brenner, S. E., C. Chothia, and T. J. Hubbard.** 1998. Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95:**6073–6078.
7. **Brun, A., M. Chalot, R. Finlay, and B. Söderström.** 1995. Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* Roth. New Phytol. **129:**487–493.
8. **Bücking, H., and W. Heyser.** 1999. Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi—an X-ray microanalytical study. Mycol. Res. **103:**31–39.
9. **Cairney, J. W. G., A. E. Ashford, and W. G. Allaway.** 1989. Distribution of photosynthetically fixed carbon within root systems of *Eucalyptus pilularis* plants ectomycorrhizal with *Pisolithus tinctorius*. New Phytol. **112:**495–500.
10. **Chalot, M., A. Brun, R. D. Finlay, and B. Söderström.** 1994. Respiration of [^{14}C]alanine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. FEMS Microbiol. Lett. **121:**87–91.
11. **Chalot, M., A. Brun, A. Khalid, B. Dell, R. Rohr, and B. Botton.** 1990. Occurrence and distribution of aspartate aminotransferases in spruce and beech ectomycorrhizas. Can. J. Bot. **68:**1756–1762.

12. **Cole, L., D. A. Orlovich, and A. E. Ashford.** 1998. Structure, function, and motility of vacuoles in filamentous fungi. Fungal Genet. Biol. **24:**86–100.
13. **Dowhan, W.** 1997. Phosphatidylserine decarboxylases: pyruvoyl-dependent enzymes from bacteria to mammals. Methods Enzymol. **280:**81–88.
14. **Ek, H., S. Andersson, K. Arnebrant, and B. Söderström.** 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 Phytol. **128:** 629–637.
15. **Ewing, B., L. Hillier, M. C. Wendl, and P. Green.** 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Res. **8:**175–185.
16. **Finlay, R., H. Ek, G. Odham, and B. Söderström.** 1988. Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ^{15}N-labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. New Phytol. **110:**59–66.
17. **Finlay, R. D., and D. J. Read.** 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 Phytol. **103:**143–156.
18. **Finlay, R. D. E., H. Odham, and B. Söderström.** 1989. Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ^{15}N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. New Phytol. **113:**47–55.
19. **Fornalé, S., T. Sarjala, and N. Bagni.** 1999. Endogenous polyamine content and metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phytol. **143:**581–587.
20. **Huang, X.** 1992. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. Genomics **14:**18–25.
21. **Ineichen, K., V. Wiemken, and A. Wiemken.** 1995. Shoots, roots and ectomycorrhizal formation of pine seedlings at elevated atmospheric carbon dioxide. Plant Cell Environ. **18:**703–707.
22. **Jacob, C., M. Courbot, A. Brun, H. M. Steinman, J. P. Jacquot, B. Botton, and M. Chalot.** 2001. Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Eur. J. Biochem. **268:**3223–3232.
23. **Javelle, A., M. Chalot, B. Söderström, and B. Botton.** 1999. Ammonium and methylamine transport by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and ectomycorrhizas. FEMS Microbiol. Ecol. **30:**355–366.
24. **Javelle, A., M. Morel, B. R. Rodriguez-Pastrana, B. Botton, B. Andre, A. M. Marini, A. Brun, and M. Chalot.** 2003. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. Mol. Microbiol. **47:**411–430.
25. **Johansson, T., A. Le Quéré, B. Söderström, R. Erlandsson, J. Lundeberg, M. Uhlén, and A. Tunlid.** 2004. Transcriptionnal responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. Mol. Plant-Microbe Interact. **17:**202–215.
26. **Kim, S. J., D. Bernreuther, M. Thumm, and G. K. Podila.** 1999. LB-AUT7, a novel symbiosis-regulated gene from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis. J. Bacteriol. **181:**1963–1967.
27. **Kohler, A., C. Delaruelle, D. Martin, N. Encelot, and F. Martin.** 2003. The poplar root transcriptome: analysis of 7,000 expressed sequence tags. FEBS Lett. **542:**37–41.
28. **Kottke, I., and F. Oberwinkler.** 1989. Amplification of root-fungus interface in ectomycorrhizae by Hartig net architecture. Ann. Sci. For. **46:**737s-740s.
29. **Laczko, E., T. Boller, and V. Wiemken.** 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 Environ. **27:** 27–40.
30. **Lindahl, B., R. Finlay, and S. Olsson.** 2001. Simultaneous, bidirectional translocation of ^{32}P and ^{33}P between wood blocks connected by mycelial cords of *Hypholoma fasciculare*. New Phytol. **150:**189–194.
31. **Long, A., H. Mangalam, B. Chan, L. Tolleri, G. Hatfield, and P. Baldi.** 2001. Improved statistical inference from DNA microarray data using analysis of variance and a Bayesian statistical framework. J. Biol. Chem. **276:**19937–19944.
32. **Martin, F., and D. Canet.** 1986. Biosynthesis of amino acids during ^{13}C-glucose utilization by the ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum* monitored by ^{13}C nuclear resonance. Physiol. Veg. **24:**209–218.
33. **Melin, P., J. Schnürer, and E. G. H. Wagner.** 2002. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. Mol. Genet. Genomics **267:**695–702.
34. **Montanini, B., M. Betti, A. J. Marquez, R. Balestrini, P. Bonfante, and S. Ottonello.** 2003. Distinctive properties and expression profiles of glutamine synthetase from a plant symbiotic fungus. Biochem. J. **373:**357–368.
35. **Nehls, U., A. Bock, M. Ecke, and R. Hampp.** 2001. Differential expression of the hexose-regulated fungal genes AmPAL and AmMst1 within *Amanita/Populus* ectomycorrhizas. New Phytol. **150:**583–589.
36. **Pearson, W. R.** 1994. Using the FASTA program to search protein and DNA sequence databases. Methods Mol. Biol. **24:**307–331.
37. **Perez-Moreno, J., and D. Read.** 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. New Phytol. **145:**301–309.
38. **Peter, M., P. E. Courty, A. Kohler, C. Delaruelle, D. Martin, D. Tagu, P. Frey-Klett, S. Duplessis, M. Chalot, G. Podila, and F. Martin.** 2003. Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytol. **159:**117–129.
39. **Podila, G. K., J. Zheng, S. Balasubramanian, S. Sundaram, S. Hiremath, J. H. Brand, and M. J. Hymes.** 2002. Fungal gene expression in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. Plant Soil **244:** 117–128.
40. **Polidori, E., D. Agostini, S. Zeppa, L. Potenza, F. Palma, D. Sisti, and V. Stocchi.** 2002. Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos-Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. Mol. Genet. Genomics **266:**858–864.
41. **Read, D.** 1984. The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots, p. 215–240. *In* D. H. Jennings and A. D. M. Rayner (ed.), The ecology and physiology of the fungal mycelium. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
42. **Robl, I., R. Grassl, W. Tanner, and M. Opekarova.** 2001. Construction of phosphatidylethanolamine-less strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Effect on amino acid transport. Yeast **18:**251–260.
43. **Rontein, D., W. I. Wu, D. R. Voelker, and A. D. Hanson.** 2003. Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in plants, and overexpression in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **132:**1678–1687.
44. **Rouhier, N., E. Gelhaye, and J. P. Jacquot.** 2002. Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants. II. The cytosolic and mitochondrial systems. Ann. N. Y. Acad. Sci. **973:**520–528.
45. **Rousseau, J., D. Sylvia, and A. Fox.** 1994. Contribution of ectomycorrhiza to the potentiel nutriment-absorbing surface of pine. New Phytol. **128:**639–644.
46. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
47. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74:**5463–5467.
48. **Schultz, A. C., P. Nygaard, and H. H. Saxild.** 2001. Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. J. Bacteriol. **183:**3293–3302.
49. **Shepherd, V. A., D. A. Orlovich, and A. E. Ashford.** 1993. Cell-to-cell transport via motile tubules in growing hyphae of a fungus. J. Cell Sci. **105:** 1173–1178.
50. **Smith, S., and D. Read.** 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
51. **Strullu, D. G., and J. P. Gourret.** 1981. Ultrastructure and electron-probe microanalysis of the metachromatic vacuolar granules occurring in *Taxus* mycorrhizas. New Phytol. **87:**537–545.
52. **Thwaites, W. M., C. H. Davis, N. Wallis-Biggart, L. M. Wondrack, and M. T. Abbott.** 1979. Urea: obligate intermediate of pyrimidine-ring catabolism in *Rhodosporidium toruloides*. J. Bacteriol. **137:**1145–1150.
53. **Timonen, S., R. D. Finlay, S. Olsson, and B. Söderström.** 1996. Dynamics of phosphorus translocation in intact ectomycorrhizal systems: non-destructive monitoring using a β-scanner. FEMS Microbiol. Ecol. **19:**171–180.
54. **Tlalka, M., D. Hensman, P. R. Darrah, S. C. Watkinson, and M. D. Fricker.** 2003. Noncircadian oscillations in amino acid transport have complementary profiles in assimilatory and foraging hyphae of *Phanerchaete velutina*. New Phytol. **158:**325–335.
55. **Tlalka, M., S. C. Watkinson, P. R. Darrah, and M. D. Fricker.** 2002. Continuous imaging of amino-acid transport in intact mycelia of *Phanerochaete velutina* reveals rapid, pulsatile fluxes. New Phytol. **153:**173–184.
56. **Tomitori, H., K. Kashiwagi, T. Asakawa, Y. Kakinuma, A. J. Michael, and K. Igarashi.** 2001. Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. Biochem. J. **353:**681–688.
57. **Trotter, P. J., and D. R. Voelker.** 1995. Identification of a non-mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase activity (PSD2) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **270:**6062–6070.
58. **Voelker, D. R.** 1997. Phosphatidylserine decarboxylase. Biochim. Biophys. Acta **1348:**236–244.
59. **Voiblet, C., S. Duplessis, N. Encelot, and F. Martin.** 2001. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. Plant J. **25:**181–191.
60. **Wiemken, V., and T. Boller.** 2002. Ectomycorrhiza: gene expression, metabolism and the wood-wide web. Curr. Opin. Plant Biol. **5:**355–361.
61. **Zinser, E., C. D. Sperka-Gottlieb, E. V. Fasch, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, and G. Daum.** 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **173:**2026–2034.

2. Caractérisation et régulation de PiDUR3, un transporteur impliqué dans l'acquisition de l'urée par le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus*.

Publication n°2 – Soumise dans Molecular Microbiology

Résumé : L'urée, qui est connue comme étant une source d'azote potentiellement utilisable par beaucoup d'organismes, permet la fertilisation des sols forestiers. Puisque la majorité des arbres forestiers forme des associations symbiotiques avec les champignons ectomycorhiziens, la capacité de ces champignons à prélever et assimiler l'urée va déterminer l'enrichissement en azote des plantes associées. Dans cette étude, nous avons montré que *P. involutus* était capable d'utiliser l'urée comme seule source d'azote. Un transporteur d'urée (PiDUR3) isolé chez *P. involutus* a été caractérisé. Son expression et son activité sont étroitement liées au pool intracellulaire de glutamine et à l'activité de l'uréase, responsable de la dégradation de l'urée en ammonium.

Characterization and regulation of PiDUR3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*

Running title: Urea transport in *Paxillus involutus*

Key words: urea transporter, urease, *Paxillus involutus*

Mélanie Morel, Christophe Jacob, Michel Chalot* and Annick Brun

IFR 110 Genomics, Ecophysiology and Functional Ecology. UMR INRA-Université Henri Poincaré 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

*Corresponding author: Michel Chalot

Université Henri Poincaré - Nancy I

UMR INRA 1136 Interactions Arbres Micro-organismes

BP 239

54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Phone : +33 3-83 68 42 38

Fax : +33 3-83 68 42 92

E-mail : Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Summary

Urea, which is known to be a source of nitrogen for the growth of many organisms, represents an important fertilizer in forest soils. Since most trees form symbiotic associations with ectomycorrhizal fungi, the capabilities of these fungi to take up and assimilate urea would determine the efficiency of urea nitrogen salvaging by plants. We showed that *Paxillus involutus*, an ectomycorrhizal basidiomycete, is capable of using urea as sole nitrogen source. We report the molecular characterization of an active urea transporter (PiDUR3) isolated from this ectomycorrhizal fungus and showed that its expression and activity are closely related to the intracellular glutamine pool and urease activity.

Introduction

Paxillus involutus is an ectomycorrhizal fungus, which explores forest soil surface by developing a tight extramatrical mycelium, to take up nutrients from soil and provide them to its host plant (Finlay *et al.*, 1988). In forest soil, urea is an important fertilizer, which originates mainly from the excretions of higher animals. The capabilities of fungi to take up and assimilate urea, would determine the efficiency of urea nitrogen salvaging by plants. However, urea concentrations in soils are low as a result of the rapid degradation by urease, the urea degrading enzyme, which can persist in soil because of its interaction with soil components, even when microorganisms are decaying (Mobley and Hausinger, 1989). Despite its low amount in soils, urea can serve as a nitrogen source for many microorganisms including some bacteria, yeast, fungi, algae and plants (Liu *et al.*, 2003; Mitamura *et al.*, 2000; Yamanaka, 1999).

Urea is a highly polar molecule, which has a low lipid solubility through artificial lipid bilayers (Galluci *et al.*, 1971). Thus, in the absence of a transport protein, urea should have a low permeability across cell membranes. Urea uptake in *Saccharomyces cerevisiae* occurs via

two systems, an active transport system with an apparent Michaelis constant (K_M) of 14 μM, and a facilitate diffusion system insensitive to inhibitors (Cooper and Sumrada, 1975). Active transport is the predominant way for urea entry in the cells when external concentrations are below 0.25 mM, while above 0.5 mM, urea diffuses via a diffusion-controlled transport pathway (Wilson *et al.*, 1988; Wilson and Walker, 1988). It was also demonstrated in *Corynebacterium glutamicum* that, with a sufficient nutrient supply, urea transport seems to occur via diffusion, while, under conditions of nitrogen starvation, an energy-dependent urea uptake system was synthetized (Beckers *et al.*, 2004). To date, only few urea transporters have been characterized at the molecular level. In *S. cerevisiae*, active transport is mediated by a urea active transporter (ScDUR3) whose expression is sensitive to nitrogen catabolic repression (NCR), in a manner similar to the other allantoin pathway genes (ElBerry *et al.*, 1993). Moreover, it is highly inducible in the presence of allophanate, a degradation product of urea in yeast, or the analog oxalurate. AtDUR3, a high-affinity urea/H^+ symporter in *Arabidopsis thaliana*, is expressed in shoots and roots and up-regulated during germination and under nitrogen deficiency in roots (Liu *et al.*, 2003). A bacterial urea active transporter, belonging to the ABC transporter family, has been identified in cyanobacteria and was also subjected to nitrogen control (Valladares *et al.*, 2002). Additionally, two active urea transporters have been characterized physiologically but not at the molecular level in mammals. One of these is an Na^+-dependent urea cotransporter and the second is a probable Na^+: urea antiporter (Minocha *et al.*, 2003).

The facilitate urea diffusion system appears to be neither dependent on urea degradation product (allophanate), nor sensitive to NCR (Cooper and Sumrada, 1975). A total of 10 isoforms of facilitated urea transporters have been well characterized in rat (Sands, 2003). They belong to the Urea Transporters (UT-A and UT-B) families and their expressions are tissue dependent. Other proteins such as the major intrinsec protein (MIPS) act as channels in

membranes to facilitate passive transport of urea across the membranes (Johanson and Gustavsson, 2002). Plant MIPS can be subdivided into plasma membrane intrinsec (PIPs), tonoplast intrinsec (TIPs), the NOD26-like intrinsec and small basic intrinsec (SIPs) proteins (Johanson *et al.*, 2001; Quigley *et al.*, 2002). Most of MIPs are known to be aquaporins, which exhibit specificity for small neutral molecules including water or glycerol. Several *A. thaliana* TIPs (AtTIPS) and *Cucurbita pepo* Nod26-like protein (CpNIP1), were shown to be involved in urea transport using the complementation of a urea transport-deficient strain of Baker's yeast (Klebl *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). In contrast to high-affinity urea/H^+ symporters, AtTIPS provide a transport pathway for urea, which is less concentration and pH-dependent. The expression of three of the four isolated AtTIP genes, was up-regulated during early germination and under N deficiency in roots whereas these genes are expressed constitutively in shoots (Liu *et al.*, 2003).

Once in the cell, urea is metabolized to provide ammonium and carbon dioxide by the activity of urease, an ubiquitous enzyme in plants, eukaryotic microorganisms and bacteria (Mobley and Hausinger, 1989). In *S. cerevisiae*, the enzymes responsible for urea degradation are urea carboxylase and allophanate hydrolase. Their production is contingent upon the presence of allophanate and is subject to nitrogen repression when cell are grown on readily utilized amino acids (Cooper and Sumrada, 1975).

Urea transport is well described in mammalians, where urea transporters are involved in urinary concentration processes (Smith and Rousselet, 2001), but very few studies concern the molecular system involved in urea nitrogen salvaging in other organisms. In this study, we investigated the mechanism of urea transport and utilization, by reporting the molecular characterization of a urea transporter from the ectomycorrhizal basidiomycete *P. involutus*.

Results

Cloning and sequence analysis of PiDUR3

To study the function of the PiDur3 protein, a 460bp fragment previously obtained in a cDNA library previously enriched in cDNA differentially expressed in two nitrogen conditions (Morel *et al.*, 2005) was used to isolate a full length cDNA with an open reading frame of 2136 bp (*PiDUR3*) by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE-PCR). It encodes a 712 amino-acid protein with a calculated molecular mass of 75 kDa. According to the *e*motif search algorithm (http://motif.stanford.edu/emotif/), this protein belongs to the sodium:solute symporter family (SSS), (TC 2.A.21 according to the TC classification (Saier, 1998)). PiDur3 showed 40%, 38% and 36% of identity with Dur3 proteins of *Oryza sativa* (OsDur3) (AAR27948), *A. thaliana* (AtDur3) (BAB09166) and *S. cerevisiae* (ScDur3) (AAA34582), respectively. The hydropathy profile generated by the TMHMM algorithm (Sonnhammer *et al.*, 1998) consists of 15 hydrophobic domains of sufficient length to be considered as potential membrane-spanning domains. This is in accordance with profiles of urea transporter from *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe, O. sativa*, *Cryptococcus neoformans* but not *A. thaliana,* which displays 14 domains. Moreover, this algorithm predicts an extracellular N-terminus and an intracellular C-terminus tail, similar to the ScDur3 profile but not to AtDur3, which exhibits an extracellular C-terminus tail (Liu *et al.*, 2003).

Phylogenetic analysis is based on the alignment of sequences which exhibit an alignment score greater than 200 bits with PiDur3 protein, according to BLAST search. All sequences presented belong to the SSS family, according to the *e*motif search algorithm. The tree reveals clustering of proteins according to the type of organism. Indeed, plant proteins clustered loosely together. Interestingly, PiDur3 did not cluster with the functionally well-characterized urea transporters AtDur3 and ScDur3. Although the other selected members of the SSS family

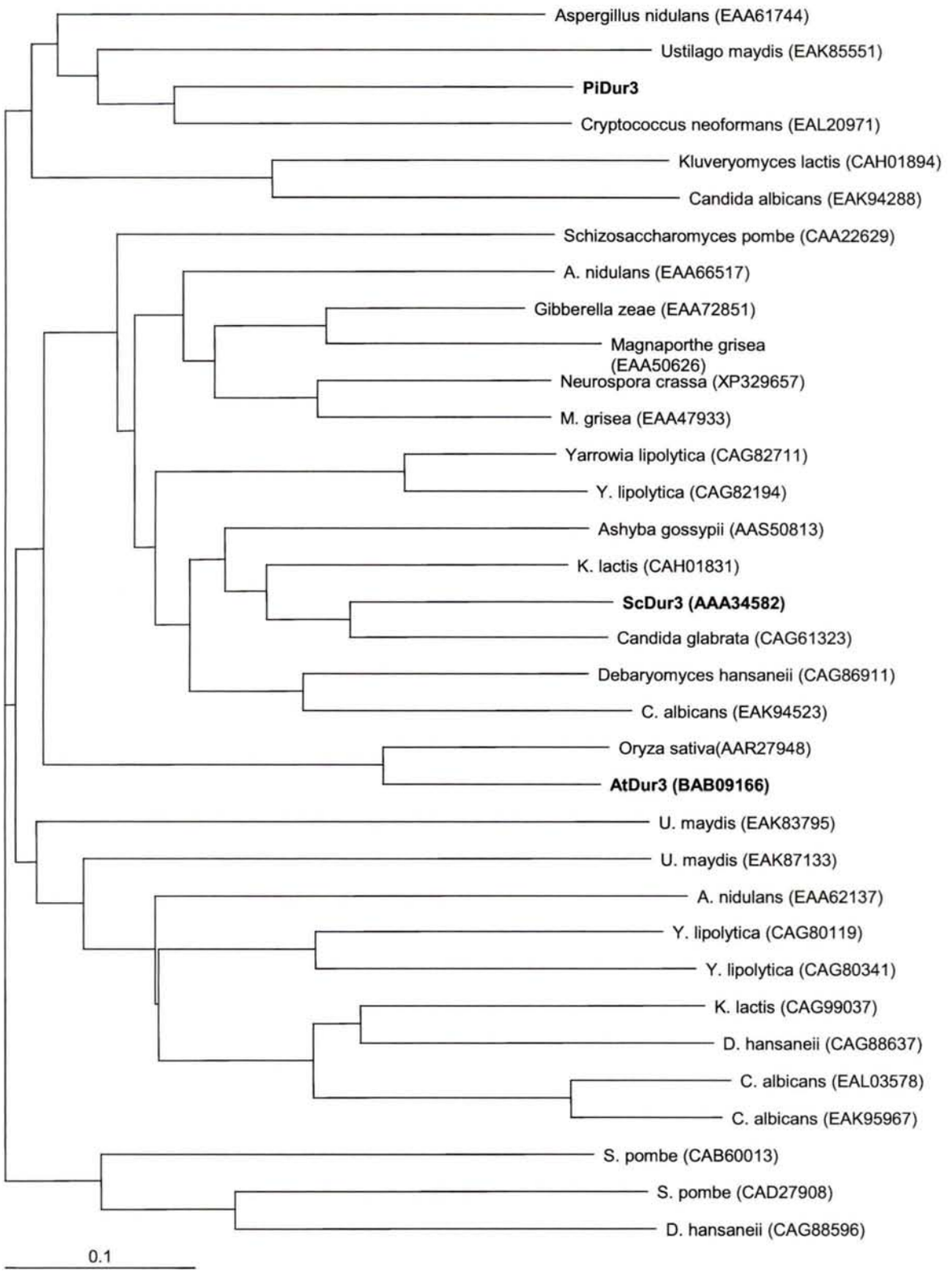


Figure 1 : Phylogenetic tree for Dur3 proteins and selected members of the SSS family. The proteins presented are those presenting the most homologous sequences to PiDur3 according to BLAST search with an alignment score > 200. The sequences were aligned using the CLUSTAL X program and the unrooted tree constructed using TreeView . Accession numbers are given in brackets.

have not been functionally characterized, their positions on the tree let us think that they have a function similar to ScDur3, AtDur3 and PiDur3, i.e. urea transport.(Fig.1).

Several sequences have been found close to PiDur3 in the genome of *Aspergillus nidulans*, *Kluveryomyces lactis* and *Candida albicans*, suggesting the existence of several paralogs among the family of urea transporters, at least for these species. Consequently, we can not conclude that PiDur3 is the only member of the active urea transporter family in *P. involutus,* as it was demonstrated in yeast and *A. thaliana*, whose genome sequences are available.

Indeed, two and three sequences similar to *PiDUR3* have been found in the genomes of the basidiomycetes *Laccaria bicolor* (Martin, personal communication) and *Phanerochaete chrysosporum*, respectively.

Functional analysis of PiDUR3 gene

The function of PiDur3 in urea transport was determined by complementation of a yeast mutant using the yeast strain YNVW1 (dur3Δ, *ura3*) defective in urea uptake (Liu *et al.*, 2003). This strain was unable to grow on 2 mM urea when transformed with the yeast expression vector pFL61 (Fig. 2). The transformation of this strain with the pFL61 vector harboring *PiDUR3* cDNA (pFL61-*PiDUR3*), under the control of the constitutive ADH promoter, resulted in the complementation of the growth defect in the presence of 2 mM urea as sole nitrogen source at pH 6 (Fig 2). This result suggests that PiDur3 is involved in urea uptake.

The capacity to transport urea was also tested by direct uptake measurements in the urea uptake-deficient strain YNVW1 transformed with the empty pFL61 vector or by pFL61-*PiDUR3* (Fig. 3). Expression of *PiDUR3* in the yeast mutant resulted in a progressive accumulation of [^{14}C]-compounds during the first 15 minutes of treatment, followed by a

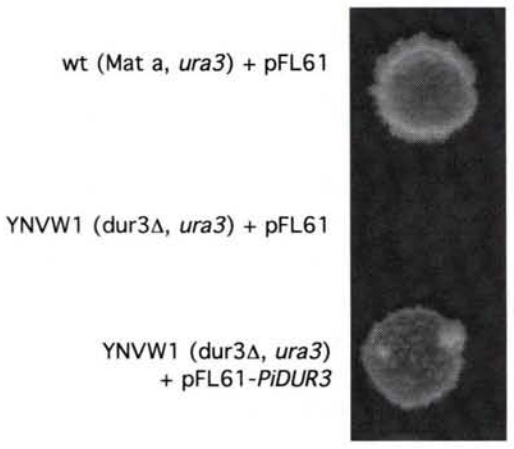


Figure 2 : Growth complementation of yeast by heterologous expression of *PiDUR3*.
The yeast strain YNVW1 (dur3Δ, *ura3*) was unable to grow on 2 mM urea as sole nitrogen source compared to the wild type strain 23346c (Mat a, *ura3*). YNVW1 was transformed with the empty vector pFL61 or the vector harboring the open reading frame of *PiDUR3*, and plated on yeast nitrogen base without ammonium and amino acid agar adjusted to pH 6.

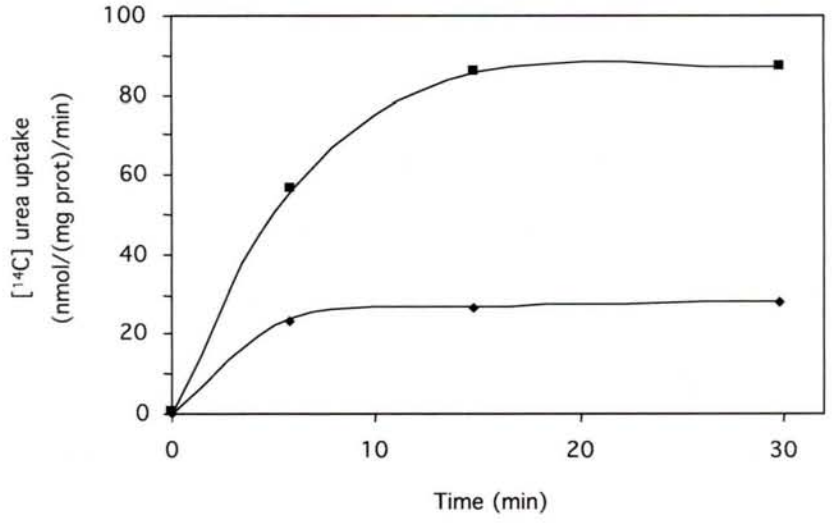


Figure 3: [^{14}C] urea uptake in the yeast strain YNVW1 (dur3Δ, *ura3*) transformed with the empty vector pFL61 (◆) or the vector harboring the open reading frame of *PiDUR3* (■). Yeast cells were grown on minimal proline medium and the accumulated radioactive labelling was followed in yeast cells at 6, 15 and 30 min after addition of 0.25 mM [^{14}C]-urea.

saturation phase. This label accumulation is nearly 4 times higher than in the control after 30 min. These results confirm that PiDur3 functions in urea transport.

Transcriptional regulation of PiDUR3 gene in P. involutus

PiDUR3 gene expression was studied by RT-PCR in *P. involutus* colonies in relation with the amino acid, urea and ammonium intracellular pools. The fungus was first grown on a nitrogen-starved MMN medium (-N) during 6 days in order to deplete the intracellular amino acid pools and thus favor the uptake of newly-fed N sources. In a first experiment (experiment 1), 1 mM NH_4^+ with or without 2.5 mM phosphinothricin (PPT), a specific glutamine synthetase (GS) inhibitor, 1 mM urea with or without 5 mM acetohydroxamic acid (AHA), a specific inhibitor of urease, were added and fungi were harvested and analyzed after 12 h of feeding.

Except some glutamate, almost no amino acid nor ammonium were detected in the –N treatment (Fig. 4A and 4B). Addition of NH_4^+ in the growth medium, led to the accumulation of intracellular amino acids, especially glutamine and glutamate, and NH_4^+ (Fig. 4A and 4B). As expected, the PPT treatment resulted in the accumulation of NH_4^+ (Fig. 4B) in cells instead of glutamine (Fig. 4A). The urea treatment resulted in a weak NH_4^+ accumulation and the synthesis of glutamine, suggesting that urea, once in the cells, was rapidly degraded into NH_4^+ by the activity of urease, and immediatly metabolized into glutamine by the GS activity. The urea+ AHA treatment resulted in a weak intracellular urea accumulation and the lack of glutamine or NH_4^+ production.

Transcript levels for *PiDUR3* gene increased strongly in –N and NH_4^++ PPT treatments (Fig. 4C). No glutamine was detected in these two treatments, while cells contained respectively 2.5 and 44.8 µmol mg^{-1} dry weight (DW) of NH_4^+ for the –N and NH_4^++ PPT conditions, respectively. This suggests that *PiDUR3* gene expression is repressed by intracellular

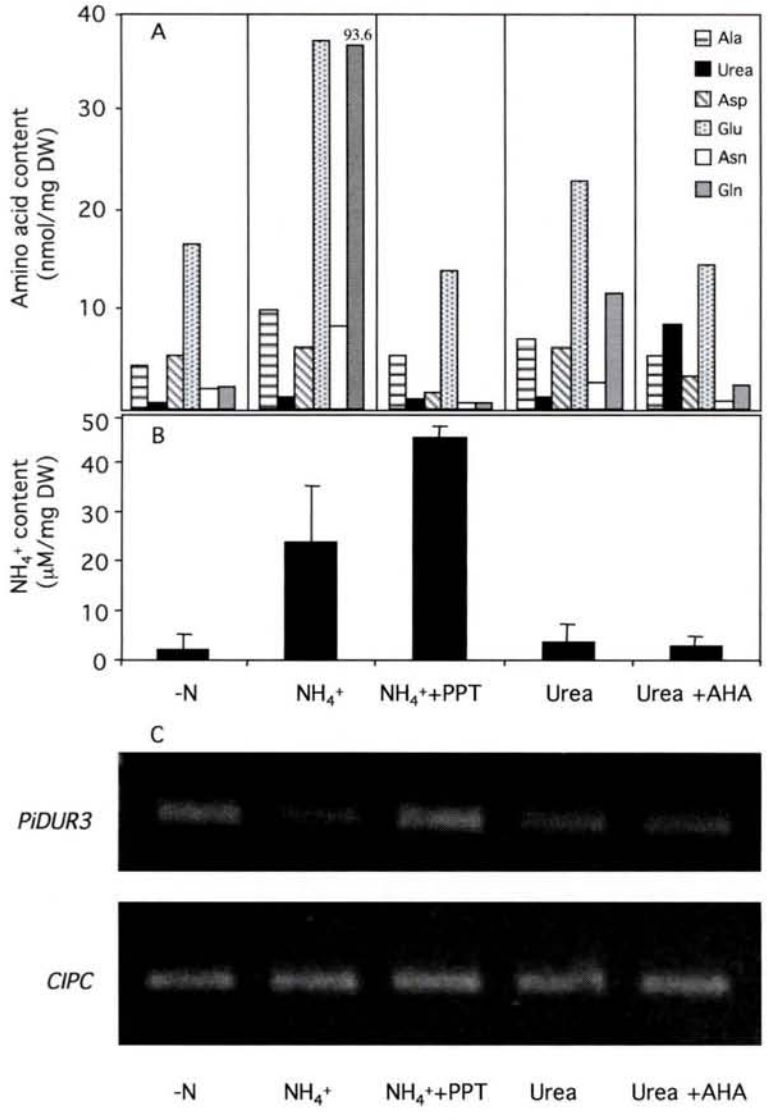


Figure 4 : Correlation between *PiDUR3* mRNA levels and major intracellular amino acids, urea and ammonium, after 12 h of various nitrogen treatments (experiment 1). Fungal colonies were grown for10 days on cellophane-covered agar medium and transferred to a N-deficient liquid medium for 6 days. Colonies were further transferred for 12 h onto a –N, 1 mM NH_4^+, 1 mM NH_4^+ + 2.5 mM phosphinothrincin (PPT), 1 mM urea or 1 mM urea + 5 mM acetohydroxamic acid (AHA) medium before analyzes. Amino acid and urea contents (A) were quantified by GC-MS and NH_4^+ content (B) was determined according to . *PiDUR3* gene expression was determined by RT-PCR and *CIPC* gene expression was used as a control (C).

glutamine rather than by intracellular NH_4^+. Moreover, in the urea+ AHA treatment, *PiDUR3* was poorly expressed although almost no glutamine was detected, suggesting that, additionally to the glutamine control, the intracellular pool of urea and/or the activity of urease could be linked to the expression of *PiDUR3*, as suggested in cyanobacteria (Valladares *et al.*, 2002).

Regulation of urea uptake by N sources in P. involutus

In a second experiment, kinetics of [^{14}C]-urea uptake were investigated on *P. involutus* colonies first treated during 12h with different N sources as described in experiment 1. Colonies were then transferred on MMN medium containing 1mM [^{14}C]-urea and harvested after 0, 15, 30, 45 and 60 min. Because AHA is a reversible inhibitor, which is not the case of PPT, the transfer on a new medium containing only urea restored urease activity.

The total incorporation of [^{14}C]-urea was quantified in fungal colonies (Fig. 5). No significant difference in urea uptake was observed for fungi grown on -N, NH_4^+, NH_4^+ + PPT or urea medium. In contrast, in the urea+ AHA treatment, urea uptake by the fungus increased about two times. Since this treatment allowed the accumulation of intracellular urea, this suggests that intracellular urea could be involved in the regulation of urea transport.

In order to confirm this hypothesis, glutamine and urea pools were measured at t0, where colonies were grown for 12h on various nitrogen conditions (–N, 1mM NH_4^+, 1 mM NH_4^++ 2.5 mM PPT, 1 mM urea or 1 mM urea + 5 mM AHA), and t60 after transfer of these colonies on a new medium containing only 1 mM of urea for 1 h (Fig. 6A and 6B). The 1h urea treatment (t60) led to a higher production of glutamine for –N, urea and urea+ AHA conditions compared to (t0), suggesting that *P. involutus* is capable of using urea rapidly as sole N source (Fig. 6A). However, the glutamine content of the NH_4^+ treatment decreased from 93.6 to 37.1 nmol mg^{-1} DW after 1h urea feeding compared to (t0), suggesting that *P.*

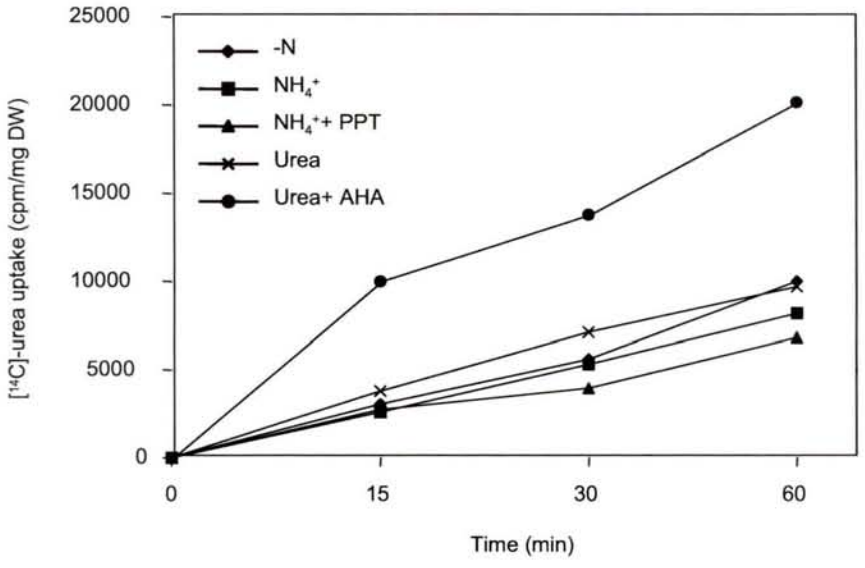


Figure 5 : [^{14}C] urea uptake by *Paxillus involutus*. Colonies were first grown for 12 h on a –N, 1mM NH_4^+, 1 mM NH_4^++ 2.5 mM phosphinothrincin (PPT), 1 mM urea or 1 mM urea+ 5 mM acetohydroxamic acid (AHA) medium and then transferred onto a N-free MMN medium containing 1mM [^{14}C] urea. The accumulated radioactive labelling was followed in the fungus at 15, 30 and 60 min after addition of [^{14}C] urea.

involutus did not incorpore urea efficiently when its intracellular glutamine pool is high, suggesting again a control of urea uptake by intracellular glutamine. No glutamine was produced in the NH_4^++ PPT condition due to the irreversible GS inhibition by PPT, even after transfer on a new medium without PPT.

The only major difference in urea content was observed for the urea+ AHA treatment, where about 75% of the urea previously accumulated during the 12h of feeding disappeared after transfer on a new medium containing 1 mM urea for 1h (Fig. 6B). This rapid disappearence suggests that the activity of urease, which was restored after transfer on a new growth medium, was increased to degrade the high amount of intracellular urea. Moreover, the higher glutamine level in the urea treatment compared to the -N treatment indicates that urease was activated by the12h urea treatment.

Gene expression analysis was also investigated in *P. involutus* for the same treatments at t60 (Fig. 6C). *PiDUR3* transcript level strongly increased in NH_4^++ PPT treatment where no glutamine is produced whereas it decreased for –N, and to a lesser extent in the urea treatment, were newly synthetized glutamine increased compared to experiment 1. The expression is still weak for NH_4^+ treatment due to the remaining glutamine in cells. This is in accordance with the repression of *PiDUR3* expression by glutamine described above. Moreover, transcript levels increased in the urea+ AHA treatment, suggesting an up-regulation of *PiDUR3* gene although some glutamine was synthetized. We can thus hypothetize that the increased *PiDUR3* transcript level is due to a possible induction of urease in this treatment.

Discussion

In this study, we demonstrated that the ectomycorrhizal fungus *P. involutus* is capable of using urea as a sole nitrogen source for amino acid production. We have isolated and characterized a cDNA coding for an active urea transporter (*PiDUR3*), which is capable of

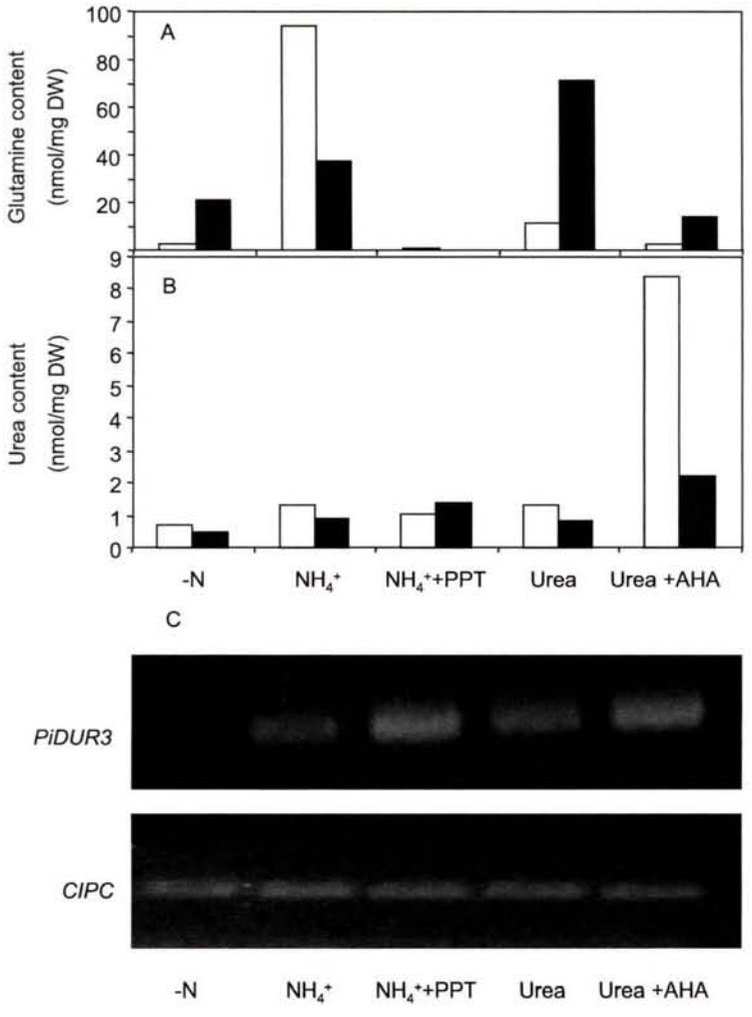


Figure 6 : Correlation between *PiDUR3* mRNA level and intracellular glutamine and urea contents, after induction by urea (experiment 2).

Glutamine and urea pools were measured at t0 (white bars) and t60 (black bars) after transfer of fungal colonies onto a new medium containing 1 mM urea as sole N source for 1 h. Colonies were initially grown as described in Fig.4 and transferred for 12h on various nitrogen conditions (–N, 1mM NH_4^+, 1 mM NH_4^++ 2.5 mM phosphinothrincin (PPT), 1 mM urea or 1 mM urea + 5 mM acetohydroxamic acid (AHA). Glutamine (A) and urea (B) contents were quantified by GC-MS. *PiDUR3* gene expression was determined by RT-PCR at t60. *CIPC* gene expression was used as a control (C).

restoring the phenotype of a urea-uptake deficient yeast strain. Although many other proteins such as aquaporins (Ishibashi *et al.*, 1997) are involved in the diffusive component of urea transport in plants, Dur3 protein seems to represent the only member of an identified gene family involved in the active transport of urea in *S. cerevisiae* and *A. thaliana* (ElBerry *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2003). However, our phylogenetic analysis shows that PiDur3 protein clustered differently from the well-characterized active urea transporters AtDur3 and ScDur3 and we can not exclude that *P. involutus* possess urea transporter paralogs since three or four genes corresponding to putative urea transporters have been detected for *A. nidulans*, *C. albicans* and *K. lactis*. *PiDUR3* gene expression was up-regulated under nitrogen deficiency. In *S. cerevisiae*, expression of *ScDUR3* is regulated in a manner similar to that of other genes of the allantoin pathway and requires Gln3, a transcriptional activator involved in the nitrogen catabolic repression (NCR). High-level expression of *ScDUR3* is inducer (oxalurate and allophanate) dependent, requiring functional *DAL81* and *DAL82* genes. Moreover, the maintenance of *DUR3* mRNA at uninduced, nonrepressed basal levels requires the negatively acting *DAL80* gene product (ElBerry *et al.*, 1993). In *A. thaliana*, *AtDUR3* was expressed in roots and up-regulated under nitrogen deficiency and early germination conditions, which are known to exhibit a nitrogen starvation pattern (Liu *et al.*, 2003). This mechanism of nitrogen regulation is designed to prevent or reduce the unnecessary divergence of the cell's synthetic capacity to the formation of enzymes and permeases for the utilization of compounds that are non-preferred sources when a preferred nitrogen source is available. One of the criteria to judge the quality of a particular nitrogen source is the growth rate (Magasanik and Kaiser, 2002). In a previous study, we have shown that *P. involutus* was able to grow on 1mM urea by producing 20.9 mg of fresh weight, compared to 67.2 mg and 2.5 mg for 1 mM NH_4^+ and N-starved condition respectively (Morel *et al.*, 2005). This suggests that external urea can be used by *P. involutus* but it is not a preferred nitrogen source. Although N supply is

responsible for the inactivation of *DUR3* gene expression in yeast, the intracellular effector directly involved in this control remained unknown. In *P. involutus*, by using PPT to modulate the intracellular pool of glutamine and NH_4^+, we found that intracellular glutamine but not NH_4^+, is responsible for the down-regulation of *PiDUR3* gene expression. This control of gene expression by glutamine alone has already been highlighted for ammonium transport in *H. cylindrosporum*, another ectomycorrhizal fungus (Javelle *et al.*, 2003). Moreover, previous studies have demonstrated that glutamine synthetase itself could play an important role in nitrogen catabolic repression (Margelis *et al.*, 2001; Teichert *et al.*, 2004). The enzyme could be required for the regulation of transcription factor by protein-protein interaction as described in *Bacillus subtilis* (Wray *et al.*, 2001). The results of (Teichert *et al.*, 2004) suggested that using methionine sulfoximine (MSX) to block GS activity prevented the interaction of GS with an as yet unknown protein and thus abolished the regulatory role of GS. In *P. involutus*, the selected growth conditions and the use of phosphinothricin (PPT) to block GS activity, allowed us to confirm that glutamine, and not GS, is the key effector of nitrogen metabolic repression. The *PiDUR3* expression pattern is rather correlated with glutamine depletion rather than with GS activity. Indeed, *PiDUR3* gene expression was up-regulated in –N and NH_4^+ + PPT treatment. For these two treatments, no glutamine was detected, while GS activity was measured in –N condition (data not shown).

Once in the cell, urea is hydrolyzed by the cytoplasmic urease, leading to the formation of two ammonium molecules. This protein has been identified in many microorganisms (Mobley and Hausinger, 1989) and plants (Sirko and Brodzik, 2000). In *S. cerevisiae*, urea degradation is not mediated by urease but by a multienzyme complex composed of urea carboxylase and allophanate hydrolase. For *P. involutus*, we have previously identified an EST, which sequence is homologous to *UREG*, a gene coding for an accesssory protein indispensable for urease activity in bacteria (Morel *et al.*, 2005). This suggests that urea degradation is mediated

by a similar enzyme in *P. involutus*. We demonstrated in the present study that urea degradation is dependent on the intracellular urea pool in *P. involutus*. Accordingly, urease has been shown to be urea inducible in plants (Bollard and Cook, 1968) and, in *S. cerevisiae*, the intermediate compound allophanate, which is the product of urea carboxylase, is an inducer of both urea carboxylase and allophanate hydrolase activities (Whitney *et al.*, 1973). Similarly, the transcription of *PiDUR3* gene and the transport of urea are mediated by a burst in intracellular urea degradation, as deduced from experiment using the urease inhibitor AHA. This induction of urea uptake by allophanate, the product of urea catabolism had already been observed in yeast (Cooper and Sumrada, 1975).

Results obtained in cyanobacteria, showed that a mutation in *UREG* gene, which leads to the lack of urease activation, causes an impairment in [^{14}C]-urea uptake (Valladares *et al.*, 2002). In *C. glutamicum*, urea transporter and urease are coded by *urtABCDE* and *ureABCDE* operons respectively (Beckers *et al.*, 2004). The authors showed that *urt* and *ure* clusters are both transcribed in response to nitrogen starvation and that their expressions are under the control of the global nitrogen regulator AmtR. Their data on the protein level validate those obtained for transcription control. These results, which show a common regulatory system for urea transporter and urease gene expression, corroborate the fact that urea import belongs to a urea uptake system, which includes a urease component. The fact that we did not find significant urea accumulation in fungal cells, even in the urea+ AHA treatment (Fig. 4), we could hypothetized that *P. involutus* regulates its urea intracellular pool by inhibiting urea uptake at the transcriptional level when urease is not efficient in urea degradation. A similar regulatory model has been described for nitrate utilization in *A. nidulans*, where nitrate accumulation is closely related to the nitrate utilizing nitrate reductase activity (Unkles *et al.*, 2004). In plants, nitrate transport activity is completly independent of the nitrate reductase

activity because plant are capable of storing nitrate in vacuoles of root cells, while fungi are incapable of nitrate storage.

We have previously shown that the EST coding PiDur3 was up-regulated in the absorbing structure of the ectomycorrhizal association between *P. involutus* and *Betula pendula* (Morel *et al.*, 2005). Thus, the present study, coupled with these previous results, indicates that PiDur3 could mediate urea uptake from the external growth medium and thereby provide a N acquisition pathway for the direct utilization of urea from the environment. This is of particular importance since nitrogen is a limiting factor of plant growth in forest soil. Moreover, as one of the major role of ectomycorrhizal fungi is to provide nutrients to its plant host, urea may represent an additional nitrogen source available for plants through the symbiotic association.

Experimental procedures

Organisms and culture conditions

The ectomycorrhizal fungus, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. (ATCC 200175) strain, was originally isolated from a fruitbody associated with 15-to 30-year-old *Betula pendula* trees growing on coal waste in Midlothian, Scotland. It was grown 10 days on cellophane-covered agar medium containing modified Melin-Norkrans medium (MMN). The MMN medium contained (mg l^{-1}): KH_2PO_4, 500; $(NH_4)_2HPO_4$, 250; $CaCl_2$, 50; NaCl, 25; $MgSO_4$ 7 (H_2O), 15; thiamine hydrochloride, 0.1; and $FeCl_3$ 6(H_2O), 1. Glucose concentration was 10 g l^{-1}. Colonies were then N-starved for 6 days to deplete cells of amino acids and favor the further uptake of the different N sources supplied. Different N treatments were applied during 12 hours: MMN medium without N (-N treatment), or supplemented with 1 mM NH_4^+ (NH_4^+ treatment) or 1mM urea (urea treatment) were used instead of $(NH_4)_2HPO_4$. 2.5 mM L-phosphinothricin (PPT) and 5 mM acetohydroxamate acid (AHA), which inhibits glutamine

synthetase (GS) and urease respectively, were also used when needed. This corresponds to experiment 1. Colonies were then treated with 1mM [^{14}C]-urea for 1h, to assess the capabilities of the fungus to take up urea in relation with its N status. This corresponds to experiment 2.

The yeast wild type strain Σ 23346c (Mat a, *ura3*) (Grenson, 1969) and mutant strain YNVW1 (dur3Δ, *ura3*), were kindly provided by Pr Von Wirén ((Liu *et al.*, 2003).

The *Escherichia coli* strain used was DH5α. Classical procedures for manipulating *E. coli* cells and DNA were essentially based on (Sambrook *et al.*, 1989).

Cloning of PiDUR3 cDNA

A partial cDNA of 460 bp, obtained from a suppressive subtractive library (SSH) previously constructed (Morel *et al.*, 2005) was used in a Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) experiment, performed using the following primers: PiDUR5' (5' CGAATATGGCGACCCCAGCA 3') and PiDUR3' (5' GGCCCTTGCCGGAGTCATCT 3') according to the manufacturer's instructions. PCR was performed on the single strand cDNA synthetized from 1 µg total RNA of *P. involutus* using the Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL), a RnaseH$^-$ derivative of moloney murine leukemia virus, according to the manufacturer's protocol. The 5' and 3' fragments amplified were sequenced and used to design the following primers PiDURstart (5' ATGTCAACGGAAGCCCTTCCCCAA 3') and PiDURstop (5' CTATAAGCTATGTGCGCAACTGTATAG 3') to obtain the full-lengh cDNA (accession number xxx) and cloned into the pGEM-T easy vector (Promega).

Functional expression in yeast

Full-length *PiDUR3* cDNA was excised from pGEM-T easy vector by NotI digestion and cloned into the NotI linearized yeast expression pFL61 vector. The urea-uptake defective yeast strain YNVW1 (dur3Δ, *ura3*) was transformed with pFL61-*PiDUR3* plasmid as described previously (Ito *et al.*, 1983). The transformants were directly plated on ura-selective medium (yeast nitrogen base with 2 mM urea, 2% (w/v) Glucose and 2% (w/v) agarose).

RNA isolation

Fungal colonies were fixed in liquid nitrogen. Total RNA isolation was performed using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) from approximatively 100 mg of frozen mycelia. According to the manufacturer's instructions, a buffer containing guanidium hydrochloride was used instead of a buffer containing guanidine isothiocyanate to avoid solidification of samples due to secondary metabolites in filamentous fungi. Moreover, RNase-free DNase treatment (Qiagen) was applied according to the manufacturer's protocol to avoid genomic DNA contamination. The integrity and quantity of total RNA extracted was checked by agarose gel electrophoresis.

Reverse transcription -PCR experiments

Reverse transcription (RT) reactions were performed from 300 ng of total RNA using the enzyme Omniscript (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RT reactions were performed at 37°C for 60 min and RT products were used in PCR. One microliter of RT products was amplified by PCR using the two primers: RT1 (5' GGCCCTTGCCGGAGTCATCT 3') and RT2 (5' ATCAGAGAAGCGGCAACG 3'), in the

following conditions : DNA denaturation for 1 min at 95°C and 29, 32 or 35 cycles at 95°C for 5s, 60°C for 45s, and 68°C for 1 min using an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, France). The suitability of the extracted RNA for RT-PCR amplification was checked by performing RT-PCR control experiments in the same amplification conditions with *CIPC* gene, which encodes a protein of unknown function, using the primers: CipC1 (5'GGGGAAGCTTATGCCCCACCACGAT 3') and CipC2 (5'GGGGGATCCTCAGTAGCGATCTTT 3').

Amino acid and urea extraction and analysis

Amino acids were extracted twice from 10-20 mg dried mycelium with 300 µl 70% (v/v) cold ethanol. The samples were dried using a Reacti-Therm™ Heating Module (PIERCE) and resuspended in 400 µl 0.1 N HCl. Amino acids and standards were then purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column and aliquots of purified samples were transferred to microvials, dried in a Reacti-Therm™ Heating Module (PIERCE) and derivatized according to the method of (Mawhinney *et al.*, 1986) but using 8.3 µl *N, N*-dimethylformamide and 41.7 µl MTBSTFA. Gas chromatography and mass spectrometry analysis (GC-MS) was performed as described by (Javelle *et al.*, 2003).

Ammonium quantification

Ammonium was extracted with cold ethanol as described above for amino acids. The second step requires the diffusion of ammonium. This method was developed by (Conway, 1962) and described by (Botton and Chalot, 1991). The ammonium determination method is based on the colorimetric Berthelot reaction i.e. the capacity of ammonium to produce a blue indophenol chromophore in the presence of alkaline solution of phenol and hypochlorite. The absorbance is measured at 625 nm.

[^{14}C] urea uptake experiments

The activity of the urea transporter of *P. involutus* was determined in the yeast strain YNVW1 transformed with pFL61-*PiDUR3* vector, or pFL61 vector. The incorporation of 0.25 mM [^{14}C]-urea was measured during 30 min. Permease assays were performed in exponentially growing cells on a minimal proline medium at pH 6.1.

The uptake of [^{14}C]-urea was also measured in *P. involutus*. Mycelium was first N-starved during 6 days and transferred for 12 h onto MMN medium containing 1 mM of NH_4^+ or urea as a N source, with or without PPT or AHA as described previously. Fungal discs have been cut from the actively growing edge of colonies and incubated for 15, 30 and 45 min in a solution of N-free MMN supplemented with [^{14}C]-urea at 1 mM (55,3 mCi $mmol^{-1}$). At the end of the uptake period, the mycelium was washed for 2 min in 0.1 mM $CaSO_4$ and freeze-dried prior to analysis. For the determination of radioactivity, mycelium was solubilised with Soluene 350 (Packard, USA) overnight at 60°C, mixed with 3 ml scintillation solution (Ionic Fluor) and the radioactivity in the tissues measured by liquid scintillation spectroscopy.

Aknowledgments

We are grateful to pf Von Wirén (Hohenheim University) for providing yeast strains, Bruno André (IBMM Gosselies) for ^{14}C-urea facilities, Stephan Vissers (IBMM Gosselies), for helpful discussions and his help in ^{14}C-urea uptake experiment in yeast, and Colette Munier-Lamy (LIMOS, Nancy) for radioactive counting.

References

Beckers, G., Bendt, A.K., Kramer, R., and Burkovski, A. (2004) Molecular identification of the urea uptake system and transcriptional analysis of urea transporter- and urease-encoding genes in Corynebacterium glutamicum. *J Bacteriol* **186**: 7645-7652.

Bollard, E.G., and Cook, A.R. (1968) Regulation of urease in a higher plant. *Life Sci* **7**: 1091-1094.

Botton, B., and Chalot, M. (1991) Techniques for the study of nitrogen metabolism in ectomycorrhiza. *Methods in microbiology* **23**: 203-251.

Conway, E.J. (1962) Microdiffusion analysis and volumetric error, 5th ed. Crosby Lockwood and Son Ltd., London.

Cooper, T.G., and Sumrada, R.A. (1975) Urea transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **121**: 571-576.

ElBerry, H.M., Majumdar, M.L., Cunningham, T.S., Sumrada, R.A., and Cooper, T.G. (1993) Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **175**: 4688-4698.

Finlay, R., Ek, H., Odham, G., and SÖderstrÖm, B. (1988) Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ^{15}N-labelled ammonium by Pinus sylvestris plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* **110**: 59-66.

Galluci, E., Micelli, C., and Lippe, C. (1971) Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Arch Int Physiol Biochem* **79**: 881-887.

Grenson, M. (1969) The utilization of exogenous pyrimidines and the recycling of uridine-5'-phosphate derivatives in Saccharomyces cerevisiae, as studied by means of mutants affected in pyrimidine uptake and metabolism. *Eur J Biochem* **11**: 249-260.

Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Suzuki, F., Marumo, F., and Sasaki, S. (1997) Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem* **272**: 20782-20786.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.

Javelle, A., Morel, M., Rodriguez-Pastrana, B.R., Botton, B., Andre, B., Marini, A.M., Brun, A., and Chalot, M. (2003) Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus Hebeloma cylindrosporum. *Mol Microbiol* **47**: 411-430.

Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjovall, S., Fraysse, L., Weig, A.R., and Kjellbom, P. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* **126**: 1358-1369.

Johanson, U., and Gustavsson, S. (2002) A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol Biol Evol* **19**: 456-461.

Klebl, F., Wolf, M., and Sauer, N. (2003) A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (Cucurbita pepo L.), and by Arabidopsis thaliana delta-TIP or gamma-TIP. *FEBS Lett* **547**: 69-74.

Liu, L.H., Ludewig, U., Frommer, W.B., and von Wiren, N. (2003) AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H^+ symporter in arabidopsis. *The plant cell* **15**: 790-800.

Magasanik, B., and Kaiser, C.A. (2002) Nitrogen regulation in Saccharomyces cerevisiae. *Gene* **290**: 1-18.

Margelis, S., D'Souza, C., Small, A.J., Hynes, M.J., Adams, T.H., and Davis, M.A. (2001) Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in Aspergillus nidulans. *J Bacteriol* **183**: 5826-5833.

Mawhinney, T., Robinett, R., Atalay, A., and Madson, M. (1986) Analysis of amino acids as their tert-butyldimethylsilyl derivates by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography*: 231-242.

Minocha, R., Studley, K., and Saier, M.H., Jr. (2003) The urea transporter (UT) family: bioinformatic analyses leading to structural, functional, and evolutionary predictions. *Receptors Channels* **9**: 345-352.

Mitamura, O., Kawashima, M., and Maeda, H. (2000) Urea degradation by picophytoplankton in the euphotic zone of Lake Biwa. *Limnology* **1**: 19-26.

Mobley, H.L., and Hausinger, R.P. (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev* **53**: 85-108.

Morel, M., Jacob, C., Kohler, A., Johansson, T., Martin, F., Chalot, M., and Brun, A. (2005) Identification of Genes Differentially Expressed in Extraradical Mycelium and Ectomycorrhizal Roots during Paxillus involutus-Betula pendula Ectomycorrhizal Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 382-391.

Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.

Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y., and Bohnert, H.J. (2002) From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0001.

Saier, M.H., Jr. (1998) Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv Microb Physiol* **40**: 81-136.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. *A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.*

Sands, J.M. (2003) Mammalian urea transporters. *Annu Rev Physiol* **65**: 543-566.

Sirko, A., and Brodzik, R. (2000) Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol* **47**: 1189-1195.

Smith, C.P., and Rousselet, G. (2001) Facilitative urea transporters. *J Membr Biol* **183**: 1-14.

Sonnhammer, E.L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **6**: 175-182.

Teichert, S., Schonig, B., Richter, S., and Tudzynski, B. (2004) Deletion of the Gibberella fujikuroi glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. *Mol Microbiol* **53**: 1661-1675.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.

Unkles, S.E., Wang, R., Wang, Y., Glass, A.D., Crawford, N.M., and Kinghorn, J.R. (2004) Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cells. *J Biol Chem* **279**: 28182-28186.

Valladares, A., Montesinos, M.L., Herrero, A., and Flores, E. (2002) An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. *Mol Microbiol* **43**: 703-715.

Whitney, P.A., Cooper, T.G., and Magasanik, B. (1973) The induction of urea carboxylase and allophanate hydrolase in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **248**: 6203-6209.

Wilson, M.R., O'Donoghue, S.I., and Walker, N.A. (1988) The transport and metabolism of urea in *Chara australis*. III. Two specific transport systems. *J Exp Bot* **39**: 763-774.

Wilson, M.R., and Walker, N.A. (1988) The transport and metabolism of urea in *Chara australis*. I. Passive diffusion, specific transport and metabolism of urea and methylurea. *J Exp Bot* **39**: 739-751.

Wray, L.V., Jr., Zalieckas, J.M., and Fisher, S.H. (2001) Bacillus subtilis glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell* **107**: 427-435.

Yamanaka, T. (1999) Utilization of inorganic and organic nitrogen in pure cultures by saprotrophic and ectomycorrhizal fungi producing sporophores on ure-treated forest floor. *Mycol. Res.* **103**: 811-816.

3. Caractérisation moléculaire d'un membre d'un nouveau groupe de phosphatidylserine decarboxylase chez *Paxillus involutus*

Publication n°3 – en préparation

Résumé : L'association entre *Paxillus involutus* et les racines fines des arbres permet l'établissement d'organes symbiotiques appelés ectomycorhizes. Dans une précédente étude, un gène codant une putative phosphatidylserine decarboxylase (PSD) a été détecté comme étant surexprimé 24 fois dans les mycorhizes comparativement au mycélium extramatriciel. La PSD joue un rôle central dans le métabolisme des phospholipides. Elle catalyse la formation de phosphatidylethanolamine (PtdEtn) à partir de phosphatidylserine (PtdSer). Dans cette étude, nous avons caractérisé un membre d'un nouveau groupe de la famille PSD dans le champignon ectomycorhizien *P. involutus*. L'expression du gène codant cette PSD est soumise à la répression catabolique azotée. De plus, l'alignement de séquences d'organismes variés, allant des bactéries jusqu'aux mammifères, nous a permis de proposer une signature de la famille des PSD, jusque-là inexistante dans les différentes bases de données.

Title: Molecular characterization of a new type of phosphatidylserine decarboxylase in *Paxillus involutus*

Running title: Phosphatidylserine decarboxylase in *Paxillus involutus*

Mélanie Morel[1], Dennis Voelker[2], Michel Chalot[1]* and Annick Brun[1]

[1] IFR 110 Genomics, Ecophysiology and functional Ecology. UMR INRA-Université Henri Poincaré 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

[2] Departments of Medicine and Pediatrics, Program in Cell Biology, National Jewish Medical and Research Center, Denver, Colorado 80206

*Corresponding author: Michel Chalot

Université Henri Poincaré - Nancy I

UMR INRA 1136 Interactions Arbres Micro-organismes

BP 239

54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France

Phone : +33 3-83 68 42 38

Fax : +33 3-83 68 42 92

E-mail : Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Abstract

Association of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with fine roots of trees results in the establishment of symbiotic organs named ectomycorrhizas. In a previous study, a putative phosphatidylserine decarboxylase (PSD) gene was found to be 24-fold up-regulated in the ectomycorrhizal tips compared to the extramatrical hyphae. PSD plays a central role in the phospholipid metabolism. It catalyzes the formation of phosphatidylethanolamine (PtdEtn) from phosphatidylserine (PtdSer). In this study, we have characterized a new type of PSD in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus,* whose gene expression is under the Nitrogen Catabolic Repression. Moreover, alignment of PSD sequences from many organisms, ranging from bacteria to mammals, led us to proposed a signature for PSD family, not yet available in the databases.

Introduction

The association of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with the fine roots of the trees results in the establishment of symbiotic organs named ectomycorrhizas. These structures are organized in three distinct components : (i) an extramatrical mycelium, which makes the connection between soil and root tips and is able to prospect a large surface of soil to access nutrients, (ii) a fungal sheat, which encloses the root and (iii) a Hartig Net, which extends between the epidermal and cortical cells of the root (1). Among other advantages, this symbiotic association allows the transfer of nutrients from the fungus to the host plant across symbiotic interfaces, where the two symbionts are in close contact. On the other hand, organic carbon derived from photosynthesis is transferred from the plant to the fungus, followed by translocation to the growing margins of the extraradical mycelium. A previous study on *P. involutus/Betula pendula* association, has pointed out the specificity of the extraradical mycelium compared to the mycelium in close contact with the root (2). The expression of

many genes was compared between the two tissues and a gene encoding a putative phosphatidylserine decarboxylase (PSD) was found to be 24-fold up-regulated in the ectomycorrhizal tips compared to the extramatrical hyphae.

PSD plays a central role in the phospholipid metabolism of organisms ranging from bacteria to humans (3). It catalyzes the formation of phosphatidylethanolamine (PtdEtn) from phosphatidylserine (PtdSer). PtdEtn can be used within the cell to synthesize the indispensable growth component phosphatidylcholine (PtdCho) (4). PtdEtn and PtdCho are the most abundant phospholipids of eucaryotic cells, comprising 25% and 50% of cell phospholipid mass, respectively (5,6).

PdtEtn is the major non bilayer phospholipid which causes non-leaky discontinuity in the overall bilayer structure of a membrane (7). It was suggested that non bilayer lipids may affect integration of proteins into membranes, their lateral movement within the membrane, and folding and stabilization of certain membrane protein complexes (8). PtdEtn might play a role in amino acid transport process or in the early steps of the secretion pathway common for all amino acid permeases or, eventually, it could affect the transport proteins directly at the plasma membrane. Indeed, the activity of arginine (Can1p), proline (Put4p) and general amino acid permeases (Gap1p) are decreased more than 20-fold in a yeast mutant lacking sphingosine lyase and phosphatidylserine decarboxylases (9). Moreover, it was shown that the yeast protein Apg8p, which is involved in autophagy, is reversibly modified with PtdEtn through a covalent bond between the C-terminal glycine of the protein and the amine of PtdEtn. Apg8p, through autophagy process, is responsible for the bulk import of cytosol into the vacuole for protein degradation, and PtdEtn modification is essential to its function (10). PtdEtn is also involved in glycosylphosphatidylinositol modification of proteins, a process essential for cell wall maintenance (11).

Two distinct PSD activities are expressed in yeast, one located in the inner mitochondrial membrane (type 1 PSD) and the other in Golgi and vacuole membranes (type 2 PSD). The major pathway of PtdEtn formation in yeast appears to be the Psd1 pathway, which catalyzes approximatively 80% of PSD activity in vitro (12).

PSD2 diverges from PSD1 since it possesses a C2 domain localized between the Golgi retention domain and the putative β-subunit in *S. cerevisiae* (13). The C2 domains were first identified in protein kinase C isoforms and constitute Ca^{2+} and phospholipid binding motifs (14). C2 domains are also known to promote both protein-protein and protein-phosphoinositide interactions.

Although PtdEtn synthesis by PSD is well documented in yeast (3) and mammals (15), few data are available for other eucaryotic organisms. A mitochondrial PSD, expressed throughout the plant, has been characterized in *A. thaliana* (AtPSD1) (16). The results indicated that this mitochondrial PSD is an important housekeeping enzyme whose expression is strongly regulated at the transcriptional level. Moreover, the authors suggested that plants have both mitochondrial and extramitochondrial PSDs. In *Plasmodium falciparum*, Baunaure et al. (2004) have identified a first type 1 PSD, which was not localized in mitochondria but rather in the endoplasmic reticulum.

Yeast PSD1 activity was not affected by carbon source, and the highest specific activity was observed in cells entering the stationary phase of growth, whatever the carbon source (17). However, global PSD activity was found to be regulated in response to soluble precursors of phospholipid biosynthesis, by the same mechanism than the other enzymes of phospholipid biosynthesis (18). It is fully derepressed in the absence of inositol and choline or ethanolamine ; it is partially repressed in the presence of inositol and fully repressed in the presence of inositol plus choline. Moreover, PSD activity neither responds to glucose repression nor to a feedback control by its immediate product, PtdEtn (17). At transcriptional

level, the response of coordinately regulated genes to inositol and choline is controlled by a single set of regulatory factors : two positive regulators, products of INO2 and INO4 genes (19), and a negative regulator, product of OPII gene (20). In accordance with previous studies, which found that PSD1 specific activity was reduced of 50% to 60% in the presence of inositol (17), Griac (1997) found that PSD1 gene is repressed in the presence of inositol. In contrast with this result, the expression of PSD2 is not regulated by the availability of the precursors of phospholipid biosynthesis, inositol and ethanolamine. Accordingly, there are apparently no sequence homologous to the inositol-sensitive upstream activating sequence (UAS_{INO}) in the region upstream from the PSD2 coding region (22).

In this study, we characterized a new type of PSD in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus,* whose gene expression is nitrogen dependent.

Experimental procedures

Strains and growth methods

The ectomycorrhizal fungus, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. (ATCC 200175) strain, was originally isolated from a fruitbody associated with 15-to 30-year-old *Betula pendula* trees growing on coal waste in Midlothian, Scotland. It was grown on cellophane-covered agar medium containing modified Melin-Norkrans medium (MMN). The MMN medium contained (mg l^{-1}): KH_2PO_4, 500; $(NH_4)_2HPO_4$, 250; $CaCl_2$, 50; NaCl, 25; $MgSO_4$ 7 (H_2O), 15; thiamine hydrochloride, 0.1; and $FeCl_3$ 6(H_2O), 1. Glucose concentration was 10 g l^{-1}. For the different N treatments, MMN medium without N, or supplemented with 1 mM NH_4^+ or 1 mM Gln, were used instead of $(NH_4)_2HPO_4$. 2.5 mM L-phosphinotricin (PPT), which inhibate glutamine synthetase (GS) was also used. Ectomycorrhizas between *P. involutus* and *Betula pendula* were synthetized according to (23).

The Brewer's yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) were the wild type SEY6210 (ura3 his3 trp1 leu2 lys2) and the corresponding mutant strain RYY51 (ura3 his3 trp1 leu2 lys2 psd1-Δ1::TRP1 psd2-Δ1::HIS3) (12). The yeast strains were grown in complete medium containing (per liter) 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 20 mg ml^{-1} each adenine and uracil, and 2mM ethanolamine as required (YPLAUE medium). The final pH of the medium was adjusted to 6.9.

The *Escherichia coli* strain used was DH5α. Classical procedures for manipulating *E. coli* cells and DNA were essentially based on (24).

RNA extraction

Total RNA isolation was performed using the Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen) from approximatively 100 mg of frozen mycelia. According to the manufacturer's instructions, a buffer containing guanidium hydrochloride was used instead of a buffer containing guanidium isothiocyanate to avoid solidification of samples due to secondary metabolites in filamentous fungi. Moreover, RNAse-free DNAse treatment (Qiagen) was applied according to the manufacturer to avoid genomic DNA contamination. The integrity and quantity of total RNA extracted was checked by agarose gel electrophoresis.

cDNA isolation

A partial cDNA of 386 bp was obtained from a suppressive subtractive library (SSH) previously constructed (2). Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) was performed using the following primers: PiPSD5' (5' TTCCGCCATTCCTACCCCAATAAA 3') and PiPSD3' (5' TCTCAAGGCTGGCTCACTGTCTCA 3') according to the manufacturer's instructions. PCR was performed on the first strand cDNA synthetized from 1 μg total RNA extracted from *P. involutus* using the Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL), a $RnaseH^-$

derivative of moloney murine leukemia virus, according to the manufacturer's protocole. The fragments amplified were sequenced and used to design the following primers PiPSDstart (5' ATGACCCCAAAGACTAAATTG 3') and PiPSDstop (5' TTACTGAACTTCTTCAGCTTT 3') to clone the full-lengh cDNA (accession number xxxx) into the pGEM-T easy vector (Promega).

cDNA expression in yeast

The full-lengh cDNA was excised from pGEM-T easy vector by NotI digestion and subcloned into the NotI linearized yeast expression vector pFL61 containing the promoter from alcohol dehydrogenase (ADH1) gene. The resulting plasmid PiPSD-pFL61 was used to transform the RYY51 strain as described by (12). The complementation tests were performed on the selective medium : Yeast Nitrogen Base Ammonium (Sigma), 2% Glucose and required amino acids.

Determination of Phosphatidylserine decarboxylase activity

Soluble proteins were extracted from *P. involutus* and ectomycorrhizas using the following extraction buffer: 100 mM phosphate buffer, 2 % polyvinylpyrrolidone, 10% polyvinylpolypyrrolidone, 14 mM β-mercaptoethanol. Protein content was determined by a modification of the Bradford method (25), using BSA as a standard.

[PSD activities are currently under investigation in Pr Voelker's laboratory (Denver, USA)].

Glutamine and ammonium assays

Glutamine and ammonium were extracted twice from 10-20 mg dried mycelium with 300 µl 70% (v/v) cold ethanol. For Gln content determination, the samples were dried using a Reacti-

Therm™ Heating Module (PIERCE) and resuspended in 400 µl 0.1 N HCl. Amino acids and standards were then purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column and aliquots of purified samples were transferred to microvials, dried in a Reacti-Therm™ Heating Module (PIERCE) and derivatized according to the method of (26) but using 8.3 µl *N, N*-dimethylformamide and 41.7 µl MTBSTFA. Gas chromatography and mass spectrometry analysis (GC-MS) was performed as described by (27).

For ammonium quantification, the second step after extraction requires the diffusion of ammonium. This method was developed by (28) and described by (29). The ammonium determination method is based on the colorimetric Berthelot reaction i.e. the capacity of ammonium to produce a blue indophenol chromophore in the presence of alkaline solution of phenol and hypochlorite. The absorbance is measured at 625 nm.

Transcriptional analysis of PSD gene

Fungal colonies, grown on –N, NH_4^+, NH_4^++PPT and glutamine as described previously, were fixed in liquid nitrogen and total RNA were extracted as described previously. Reverse transcription (RT) reactions were performed from 300 ng of total RNA using the enzyme Omniscript (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RT reactions were performed at 37°C for 60 min and RT products were used in PCR. Two microliters of RT products were amplified by PCR using the following primers: RT1 (5' TTCCAAACCTGGGACGCTTT 3') and RT2 (5' TGAGGGTCGCCTGGGTTGAG 3'), in the following conditions : 95°C for 1 min followed by 29, 32 or 35 cycles at 95°C for 5s, 60°C for 5s, and 72°C for 6 min using an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, France). The suitability of the extracted RNA for RT-PCR amplification was checked by performing RT-PCR control experiments with CipC gene using the primers: CipC1 (5'GGGGAAGCTTATGCCCCACCACGAT 3') and CipC2 (5'GGGGGATCCTCAGTAGCGATCTTT 3') in the same amplification conditions.

Promoter analysis

Genome walking was performed with the Universal Genome Walker kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions using the following primers : GSP1 (5' TCAACGGGCTGACTTGCAGAAAATA 3') and GSP2 (5' CTTTGAGGTAGGCCTCGCGAACTA 3'). The amplification product was cloned into the pGEM-T vector (Promega), sequenced and analyzed using Alibaba 2.1 (http://www.alibaba2.com) (30), Genome Net (http://www.genome.jp/) and TFScan (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/tfscan.html) softwares.

Results

PiPSD cDNA is a new type of PSD family

A cDNA clone (PiPSD) of 1358 bp was obtained by RACE-PCR from a previously 386 bp EST isolated by SSH. The open reading frame encodes a polypeptide of 456 amino acids with a predicted molecular mass around 50 kDa. According to BLAST search, PiPSD shows 27% of identity with the functionally characterized PSD2 of *S. cerevisiae*. In addition, a C-terminus GGSS motif in position 416 (Fig. 1) appears to be related to the VGSS motif detected in *Plasmodium falciparum* PSD (4) and LGST and VGST found in PSD1 and PSD2 respectively, of *S. cerevisiae* (3). This motif has been found to be the site of endoproteolytic processing to generate pyruvoyl prosthetic group formation (4,13,22).

Phylogenetic tree for fungal and plant PSDs, which sequences have been found in the available databases, is shown in Fig. 2. Among the reported sequences, only PSDs from *S. cerevisiae* (NP014230.1, NP011686.1) and *A. thaliana* (At4g16700) have been functionally characterized. The proteins cluster in three different groups: Group I and II contain respectively type 1 and type 2 PSDs. Among them, ScPSD1 and ScPSD2 have been well characterized in *S. cerevisiae*. PiPSD belongs to a third group, not yet characterized, that we

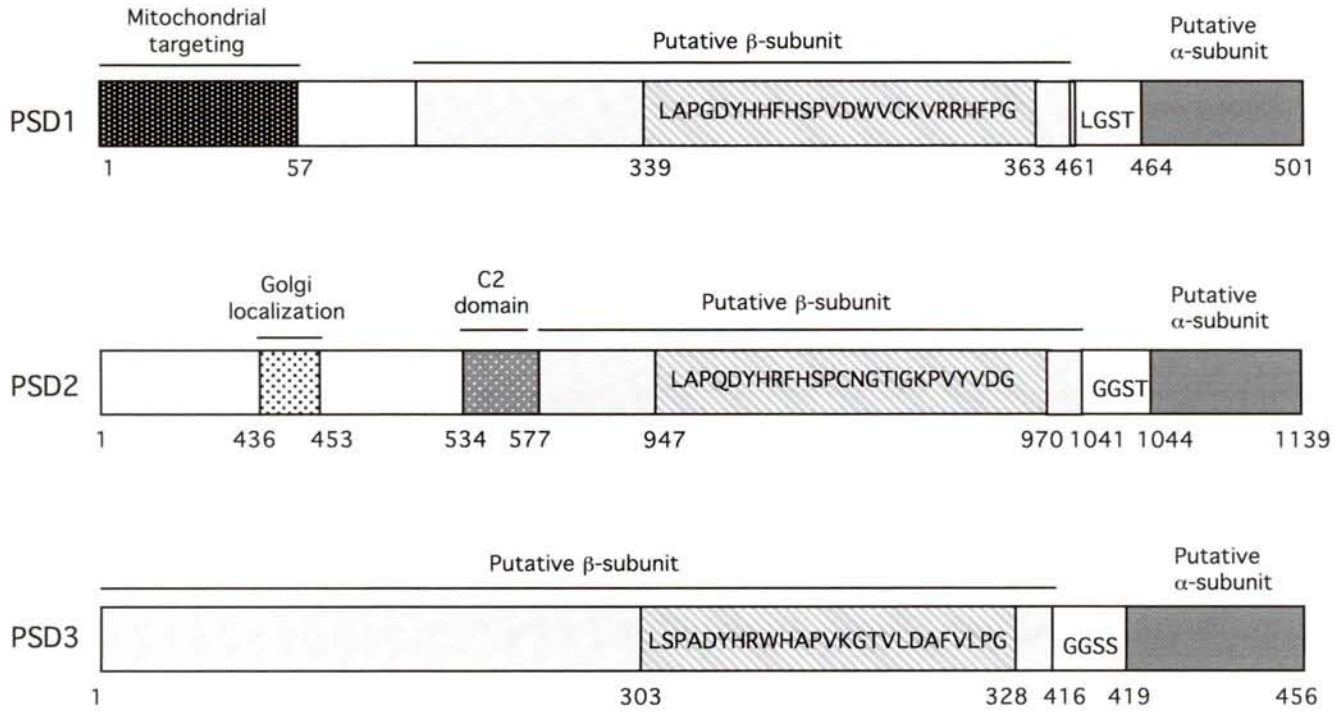


Figure 1 : Schematic representation of the major primary structural domains in eukaryotic phosphatidylserine decarboxylases (according to , modified). Type 3 PSD does not exhibit the specific PSD2 C2 domain, nor any targeting sequences. Cleavage of the proenzyme to yield α and β subunits is proposed to occur between the Gly and Ser residues within the GGSS motif.

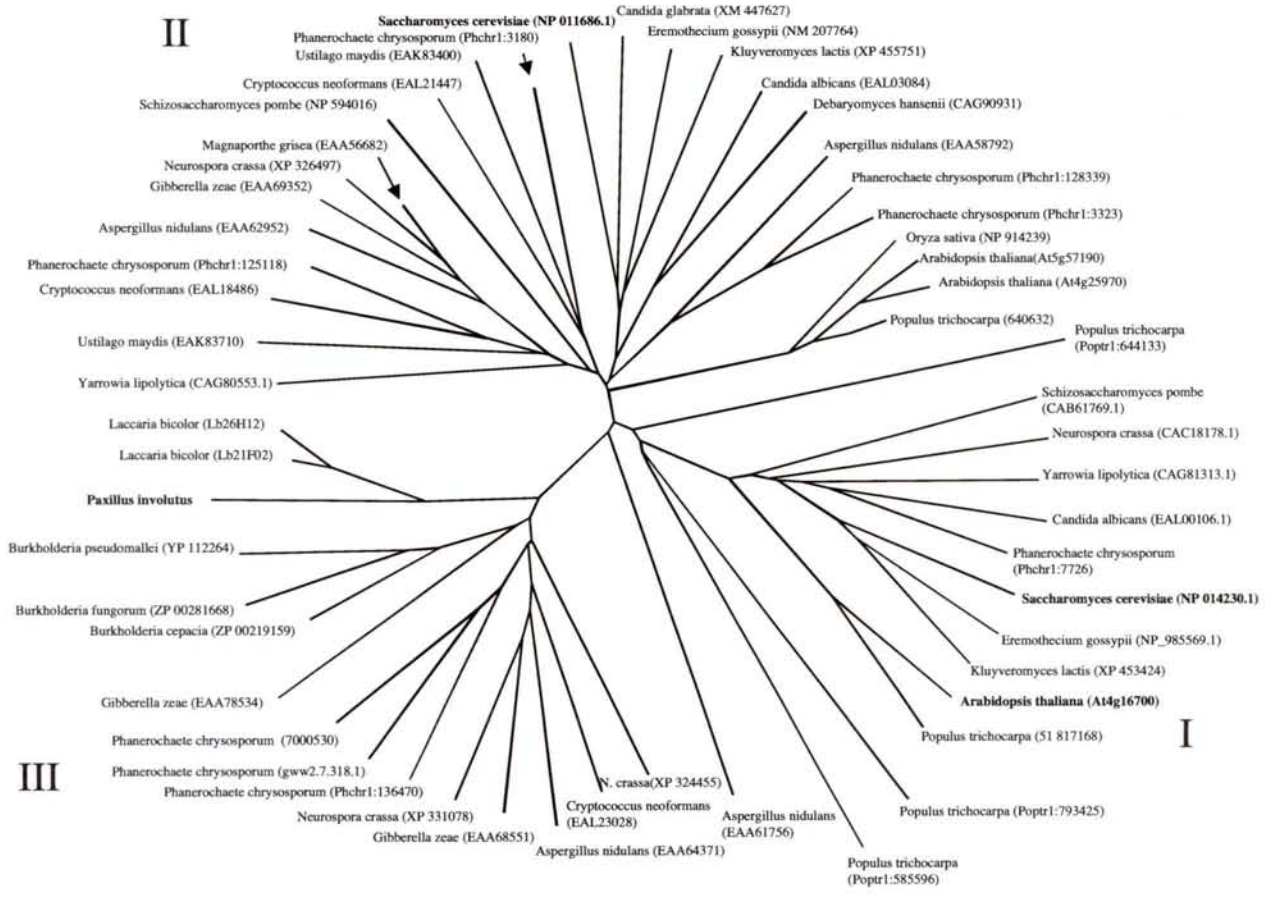


Figure 2 : Phylogenetic tree for PSD proteins. The proteins presented are those found in the available database (NCBI) and sequenced genomes. The sequences were aligned using the CLUSTAL X program and the unrooted tree constructed using TreeView . Accession numbers are given in brackets.

conveniently named here type 3 PSD (PSD3) (group III). The PiPSD sequence is closer to PSD2 than PSD1 type according to BLAST search, but it clearly diverges from group 2 since it does not exhibit the C2 domain.

Organisms such as *Neurospora crassa* or *Phanerochaete chrysosporum* display sequences in each group suggesting that exhibiting a third PSD type is not restricted to *P. involutus* and that PiPSD is probably not the only member of PSD family in *P. involutus* Interestingly, plant sequences have been found in group I and II where they cluster separately, but no plant sequences have been found in group III.

By extending the alignment to bacterial and metazoa sequences, a highly conserved zone, which is defined to be specific for PSD using PHI-PSI BLAST search algorithm, was identified. Six amino acids are highly conserved among all groups and species studied (Fig. 3), which led us to establish a global signature for PSD family, not yet available in the databases : LapxdYHrfHxP$(x)_2$g$(x)_9$G.

In addition, sequences of groups 1 and 3 exhibit specific conserved residues within this motif. The PSD1 sequences present two additional conserved residues, a glycine and a tryptophan at position 306 and 317 respectively, and a highly conserved RRHF motif at position 323. PSD3 shows one conserved tryptophan at position 311. Finally, it is noticeable that among the PSD1 group, the conserved zone T(V/I)SH (residues 318-321) seems to be specific for metazoa sequences.

PiPSD complementation tests in the S. cerevisiae Δpsd1Δpsd2 null mutant

Complementation tests have been carried out in yeast to confirm the function of the putative PiPSD. The *S. cerevisiae* null mutant psd1Δpsd2Δ is unable to grow without ethanolamine (22). Heterologous expression of PiPSD in the psd1Δpsd2Δ strain did not restore the ethanolamine auxotrophy of the mutant strain. However, this result is not really surprising

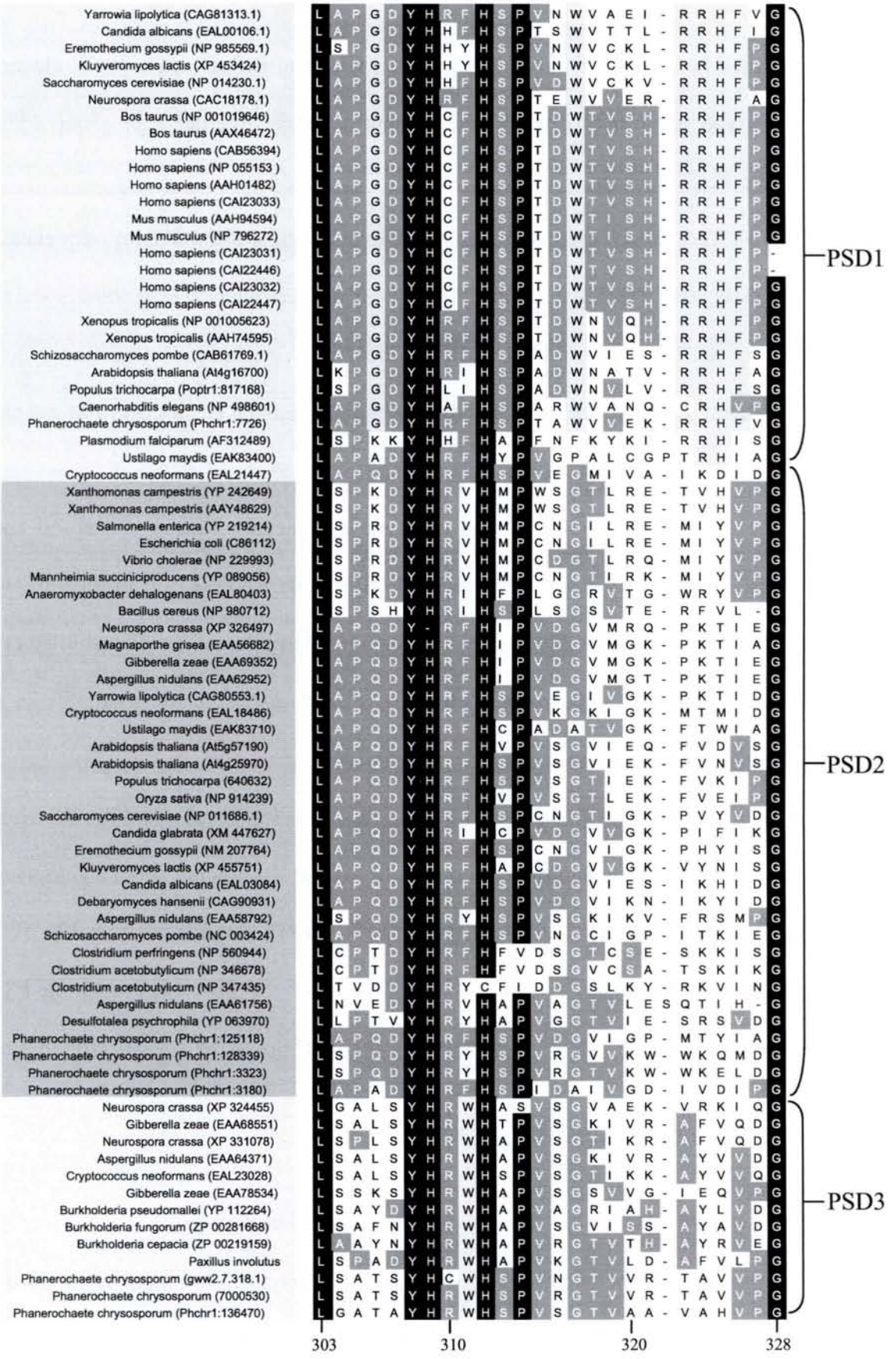


Figure 3 : Multiple alignment centred on the conserved sequence portion used to design a PSD signature. Highly conserved amino acid residues are boxed in black, less conserved amino acids are boxed in dark gray and conserved residues specific of a type of PSD are boxed in light gray. Positions mentioned are based on *P. involutus* sequence. Accession numbers are given in brackets.

since PiPSD clearly diverges from ScPSD1 and does not exhibit the C2 domain, essential for the in vivo function of ScPSD2.

[Thus, to check if PiPSD is catalytically active *in vitro* but cannot fulfill the in vivo function of *S. cerevisiae* Δpsd1Δpsd2 null mutant, *in vitro* activity assays are currently under investigations in collaboration with Pr Voelker (Denver, USA)].

PiPSD activity in P. involutus grown in different N conditions and in ectomycorrhizas

To assess the regulation of PiPSD activity in *P. involutus* in relation with the nitrogen status of the fungus in pure culture, *P. involutus* was first N starved during 6 days to deprive cells in amino acids and favor the incorporation of the newly-fed N source. Fungal colonies were then transferred onto various MMN mediums for 12h containing either no N source (-N), 1mM NH_4^+, 1mM NH_4^+ + 2.5 mM PPT or 1 mM glutamine (Gln). Soluble proteins were extracted for each samples. Ectomycorrhizas between *P. involutus* and *B. pendula* were synthetized in axenic plates. *P. involutus* and *B. pendula* roots were grown in the same conditions. Ectomycorrhizas, fungus and roots were harvested after 4, 8, 12 and 24 days of culture and soluble proteins were extracted for each samples.

[Protein extracts have been sent to Pr Voelker (Denver, USA), waiting for PSD activity measurement].

PiPSD gene expression is under the nitrogen catabolic repression in Paxillus involutus

PiPSD gene expression was compared in the different nitrogen conditions described above (-N, NH_4^+, NH_4^+ + PPT and Gln). PiPSD gene expression was reported in each growth condition in relation with the intracellular glutamine and ammonium contents of the fungus (Fig. 4). The N-starved condition allowed to empty fungal cells in glutamine and ammonium (Fig. 4B). The ammonium treatment resulted in an accumulation of both glutamine and

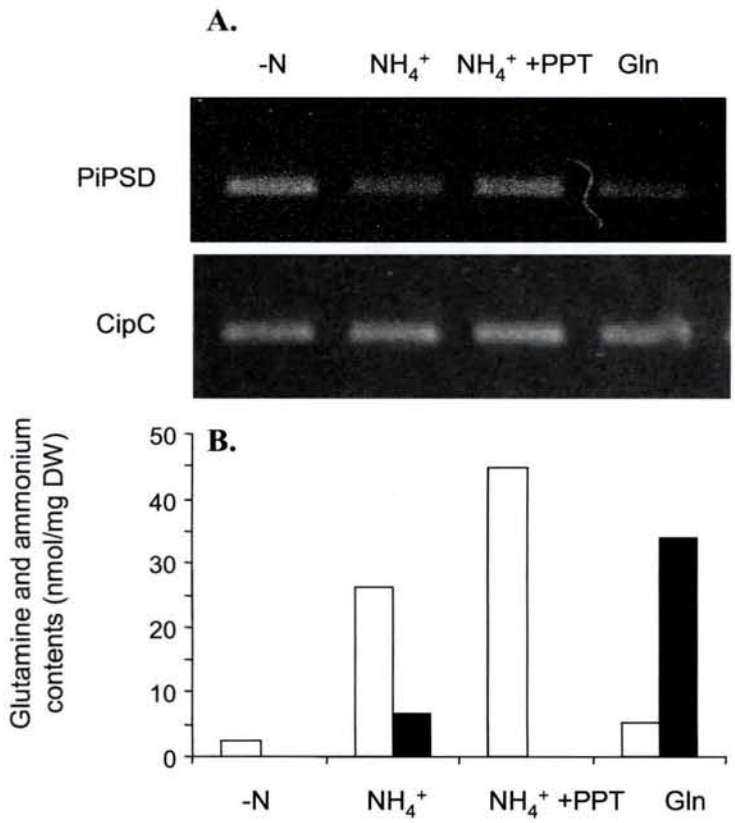


Figure 4 : Correlation between PiPSD mRNA levels and intracellular glutamine and ammonium, after 12 h of various nitrogen treatments.
Fungal colonies were grown 10 days on cellophane-covered agar medium and transferred to a N-deficient liquid medium for 6 days. Colonies were further transferred for 12 h onto a –N, 1mM NH_4^+, 1 mM NH_4^+ + 2.5 mM phosphinothrincin (PPT), or 1 mM glutamine (Gln) medium before analyzes. PiPSD gene expression was determined by RT-PCR and CIPC gene expression was used as a control (A). Glutamine content (black bars) was quantified by GC-MS and NH_4^+ content (white bars) was determined according to (B).

ammonium, while the use of NH_4^+ + PPT, by blocking glutamine synthetase activity, enriched cells in ammonium instead of glutamine. Finally, the glutamine treatment resulted in a strong accumulation of glutamine inside the cells. PiPSD gene was upregulated in –N and PPT conditions (Fig. 4A) where no gln was accumulated, compared to the ammonium and gln treatments. We could thus conclude that gln but not ammonium is responsible for the down-regulation of PiPSD, following the Nitrogen Catabolic Repression (NCR), previously described for many genes involved in nitrogen metabolism (31).

Promoter analysis of PiPSD gene was investigated. A partial 1141 bp fragment of PiPSD promoter was obtained by genome walking. Tfscan, Genome motif and Alibaba2.1 softwares predict several GCN4 motifs at positions –76, -196, -296 and – 888 bp. The motif located at position –296 is strongly predicted by all softwares tested. This emphases the suitability of this sequence portion in the recognition process between DNA GCN4 motif and GCN4 protein, a transcriptional activator involved in the NCR (32). Moreover, contrary to the yeast PSD1, no UAS_{INO} consensus sequence has been detected in PiPSD promoter, suggesting that it is not under the control of inositol, as suggested for the yeast PSD2 (21).

Discussion

PiPSD clearly belong to a new type of PSD (type 3 PSD), not yet characterized in any other organisms. It is rather homologous to PSD2 but does not possess the specific C2 domain. This difference could explain the fact that PiPSD is unable to restore the ethanolamine auxotrophy of the *S. cerevisiae* psd1Δpsd2Δ strain. This domain is dispensable for catalysis but essential for enzyme function in intact cells in *S. cerevisiae*. Indeed, C2 domain participates in interorganelle PtdSer transport to the locus of PSD2, most likely in cooperation with other membrane-associated proteins (13,33). A yeast Psd2(C2Δ) variant was unable to support growth on either solid or liquid medium in the absence of ethanolamine. Moreover, the

targeting and sorting sequences of PiPSD may not adequately convey it to the correct site in yeast, failing in the restoration of Etn auxotrophy phenotype in complementation tests. This phenomen was observed for PSD1 from *Lycopersicon esculentum* (LePSD1), where the phenotype was restored only after replacing targeting and sorting sequences of LePSD1 by those of yeast PSD1 (16).

The phylogenetic analysis shows that other fungi exhibit the PSD3 type additionally to PSD1 and/or PSD2, such as *G. zeae*, *N. crassa*, *A. nidulans, P. chrysosporum*. In contrast, the PSD3 type is not present in sequenced plant genomes (*A. thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*).

Eukaryotic PSDs are pyruvoyl enzymes that also undergo endoproteolytic processing to generate pyruvoyl prosthetic groups (7). Thus, beside the mitochondrial targeting sequence and the Golgi retention sequence present in PSD1 and PSD2 respectively, the LGST and GGST motifs, which correspond to the site of proenzyme processing, are well conserved structural elements (3). PiPSD does not exhibit general motifs for targeting proteins to the mitochondria or Golgi. However, a GGSS motif, related to the site of proenzyme processing, was detected in PiPSD sequence. Site-directed mutagenesis of the VGSS active site of the *P. falciparum* enzyme, revealed the crucial role of these residues in enzyme processing and activity (4). In the present study, we have identify an additional sequence portion highly conserved between organisms and recognized to be specific of the PSD family by the PHI-PSI BLAST search algorithm. This led us to propose a global signature of PSD family ($LapxdYHrfHxP(x)_2g(x)_9G$).

Phospholipid synthesis in yeast is regulated by a common mechanism depending on the transcriptional control of the positive regulators, products of INO2 and INO4 genes and a negative regulator, product of the OPII gene (19,20). The INO2 and INO4 gene products contain a basic helix-loop-helix DNA binding motif which recognizes the canonical UAS_{INO}

site : CANNTG. This repeated sequence (consensus 5'-CATGTGAAAT-3'), first detected in the INOI gene (34), has been detected in the promoters of all co-regulated genes of *S. cerevisiae* (35). We did not detect any sequences homologous to UAS_{INO} in *Pi*PSD promoter, suggesting that this mechanism of regulation described in *S. cerevisiae* does not occur for this PSD gene in *P. involutus* or that the regulatory sequences are too divergent to be detected. Rather, we have localized GCN4 binding sequences. Gcn4p is a transcriptional activator of gene expression. It enables the yeast cell to stimulate the expression of at least 40 different genes (36). Gcn4p is a member of the basic leucine zipper family and binds directly as a homodimer to a conserved regulatory region of its target genes. This DNA sequence required for the specific binding of Gcn4p is well defined and consists of the symmetric nucleotide motif TGA(C/G)TCA (36). The rate of Gcn4p synthesis itself is regulated by the availability of amino acids. We found that PiPSD gene is negatively regulated by glutamine following the Nitrogen Catabolic Repression. The presence of GCN4 binding sites in its promoter suggests that, in the case of glutamine starvation conditions, Gcn4p synthesis is induced and bind the PiPSD promoter to activate gene transcription. One therefore needs to elucidate why an enzyme involved in phospholipid biosynthesis is regulated by the same way than the proteins involved in nitrogen metabolism. A link between these two metabolic pathways has been established concerning the expression of INO1, the structural gene for inositol-1-phosphate synthase (37). The authors found a repression of INO1 in response to nitrogen limitation and suggested that this sensitivity to nitrogen limitation is controlled by UAS_{INO}, the same element that controls gene repression in response to inositol. In this case, the availability of basic nutrient such as nitrogen, could regulate cell growth and thus membrane biogenesis, leading to the requirement of phospholipids. On the contrary, PiPSD gene is up-regulated under condition of nitrogen limitation. The same pattern has been described for the gene coding a phospholipase in the symbiotic fungus *Tuber borchii* (38). In fungi, nutrient starvation is a

prime environmental cue that, through the overexpression of surface proteins, leads to changes in invasiveness, nutrient foraging or cell-cell interaction capacity as well as important morphogenetic transitions (39). A well described example of this kind of response is the induction of pseudohyphal growth in nitrogen-starved *S. cerevisiae* cells (40). In the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*, an ammonium transporter (Amt1) is able to complement the pseudohyphal growth defect in a yeast mutant (27). This result suggests that, through this ammonium transporter, fungi can sense the environment and induce, via signal transduction cascades, a switch of the fungal growth mode and consequently drastic changes in membrane formation and remodling (41). It is of particular interest since ectomycorrhiza formation is induced under nitrogen deficiency and required drastic changes in membrane morphology to allow the colonisation of plant roots (1). Moreover, changes in lipid composition can modify several membrane associated processes ; e.g., the apparent affinity constants of transport of various amino acids are increased in cells enriched with PtdEtn or PtCho (42). We have previously shown that the EST corresponding to PiPSD was up-regulated in the mycelium in close contact with the root compared to the mycelium spreading as extramatrical hyphae (2). The involvement of PSD at the symbiotic interface could thus participate in the insertion of new transporters involved in exchange processes between the two partners, particularly in poor nitrogen condition, as found in forest soils.

Another hypothesis on the significance of the activity of PSD in ectomycorrhizal fungi, is the probable transfer of phospholipids as carbon source from the plant to the fungus. Indeed, it was demonstrated that *Pinus sylvestris* produced large amount of neutral lipids when associated with *Pisolithus tinctorius,* and that the extramatrical mycelium of the fungus showed increased lipid content over time (43). Accordingly, plant nonspecific lipid transfer proteins (nsLTPs) have been characterized as small proteins allowing phospholipid transfer between the plant plasma membrane (44). We could hypothetized that PtdSer may be a carbon

compound transferred to the fungus, which is able to metabolized it into PtdEtn through PSD activity, and then to produce PtdCho, an essential component for fungal growth.

A better understanding of processes involved in membrane modifications in ectomycorrhizal fungi, could bring additional data on the hardly known processes involved in nutrient transfer between the two partners at the interface of the symbiotic association.

Acknowlegments

We thank Nicolas Rouhier and Christophe Jacob for technical help and scientific advices, Barbara Montanini and Damien Blaudez for helpful discussions.

References

1. Smith, S., and Read, D. (1997) *Academic Press, San Diego*
2. Morel, M., Jacob, C., Kohler, A., Johansson, T., Martin, F., Chalot, M., and Brun, A. (2005) *Appl Environ Microbiol* **71**, 382-391
3. Voelker, D. R. (1997) *Biochim Biophys Acta* **1348**, 236-244
4. Baunaure, F., Eldin, P., Cathiard, A. M., and Vial, H. (2004) *Mol Microbiol* **51**, 33-46
5. Paltauf, F., Kohlwein, S. D., and Henry, S. A. (1992) *The molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY*, 415-500
6. White, D. A. (1973) *G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson (Eds), Form and Function of Phospholipids, Elsevier Scientific, Amsterdam*, 441-482
7. Dowhan, W. (1997) *Methods Enzymol* **280**, 81-88
8. Birner, R., Burgermeister, M., Schneiter, R., and Daum, G. (2001) *Mol Biol Cell* **12**, 997-1007
9. Robl, I., Grass, R., Tanner, W., and Opekarova, M. (2001) *Yeast* **18**, 251-260
10. Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D. H., and Thumm, M. (1998) *Embo J* **17**, 3597-3607
11. Storey, M. K., Clay, K. L., Kutateladze, T., Murphy, R. C., Overduin, M., and Voelker, D. R. (2001) *J Biol Chem* **276**, 48539-48548
12. Trotter, P. J., and Voelker, D. R. (1995) *J Biol Chem* **270**, 6062-6070
13. Kitamura, H., Wu, W. I., and Voelker, D. R. (2002) *J Biol Chem* **277**, 33720-33726
14. Nishizuka, Y. (1988) *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* **51**, 1321-1326
15. Vance, J. E., and Vance, D. E. (2004) *Biochem Cell Biol* **82**, 113-128
16. Rontein, D., Wu, W. I., Voelker, D. R., and Hanson, A. D. (2003) *Plant Physiol* **132**, 1678-1687
17. Lamping, E., Kohlwein, S. D., Henry, S. A., and Paltauf, F. (1991) *J Bacteriol* **173**, 6432-6437
18. Caraman, G. M., and Henry, S. A. (1989) *Annual Revue of Biochemistry* **58**, 635-669
19. Ambroziak, J., and Henry, S. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 15344-15349

20. White, M. J., Hirsch, J. P., and Henry, S. A. (1991) *Journal of Biological Chemistry* **266**, 863-872
21. Griac, P. (1997) *J Bacteriol* **179**, 5843-5848
22. Trotter, P. J., Pedretti, J., Yates, R., and Voelker, D. R. (1995) *J Biol Chem* **270**, 6071-6080
23. Brun, A., Chalot, M., Finlay, R., and SÖderstrÖm, B. (1995) *New Phytologist* **129**, 487-493
24. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*
25. Bradford, M. (1976) *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254
26. Mawhinney, T., Robinett, R., Atalay, A., and Madson, M. (1986) *Journal of Chromatography*, 231-242
27. Javelle, A., Morel, M., Rodriguez-Pastrana, B. R., Botton, B., Andre, B., Marini, A. M., Brun, A., and Chalot, M. (2003) *Mol Microbiol* **47**, 411-430
28. Conway, E. J. (1962)
29. Botton, B., and Chalot, M. (1991) *Methods in microbiology* **23**, 203-251
30. Grabe, N. (2002) *In Silico Biol* **2**, S1-15
31. Marzluf, G. A. (1997) *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 17-32
32. Mitchell, A. P., and Magasanik, B. (1984) *Molecular and cellular biology* **4**, 2767-2773
33. Wu, W. I., and Voelker, D. R. (2004) *J Biol Chem* **279**, 6635-6642
34. Lopes, J. M., and Henry, S. A. (1991) *Nucleic Acids Res* **19**, 3987-3994
35. Greenberg, M. L., and Lopes, J. M. (1996) *Microbiol Rev* **60**, 1-20
36. Albrecht, G., Mosch, H. U., Hoffmann, B., Reusser, U., and Braus, G. H. (1998) *J Biol Chem* **273**, 12696-12702
37. Griac, P., and Henry, S. A. (1999) *Nucleic Acids Res* **27**, 2043-2050
38. Soragni, E., Bolchi, A., Balestrini, R., Gambaretto, C., Percudani, R., Bonfante, P., and Ottonello, S. (2001) *Embo J* **20**, 5079-5090
39. Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., and Heitman, J. (2000) *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785
40. Madhani, H. D., and Fink, G. R. (1998) *Trends Cell Biol* **8**, 348-353
41. Javelle, A., Andre, B., Marini, A. M., and Chalot, M. (2003) *Trends Microbiol* **11**, 53-55
42. Triverdi, A. S., Khare, S., Singhal, G. S., and Prasad, R. (1982) *Biochim Biophys Acta* **692**, 202-209
43. Laczko, E., Boller, T., and Wiemken, V. (2004) *PLANT-CELL-AND-ENVIRONMENT* **27**, 27-40
44. Cheng, C. S., Samuel, D., Liu, Y. J., Shyu, J. C., Lai, S. M., Lin, K. F., and Lyu, P. C. (2004) *Biochemistry* **43**, 13628-13636
45. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882
46. Page, R. D. M. (1996) *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358

4. Caractérisation de deux protéines spécifiques des champignons chez *Paxillus involutus* et les ectomycorhizes.

Publication n°4 – en préparation

Résumé : Nous avons caractérisé deux gènes chez *Paxillus involutus*, qui codent des protéines homologues à une protéine précédemment détectée chez *Emericella nidulans* et nommée CipC (concanamycin induced proteins). CipC1 et CipC2 semblent avoir des rôles différents chez *P. involutus*. L'expression du gène codant CipC1 est sous le contrôle de l'activité glutamine synthétase (GS) et pourrait alors indirectement être dépendante du métabolisme azoté. Le gène et de la protéine CipC2 sont surexprimés dans l'organe symbiotique formé entre *P. involutus* et *Betula pendula.* CipC2 pourrait jouer un rôle dans la différentiation des hyphes permettant la colonisation de la racine par le champignon.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Title: Characterization of two fungal specific proteins in the ectomycorrhizal fungus *P. involutus* and ectomycorrhizas.

Running title: Characterization of *Paxillus involutus* CipC1 and CipC2

Key words: Paxillus involutus, ectomycorrhizas, CipC, fungi

Mélanie Morel, Nicolas Rouhier, Michel Chalot* and Annick Brun

IFR 110 Genomics, Ecophysiology and Functional Ecology. UMR INRA-Université Henri Poincaré 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

*Corresponding author: Michel Chalot

Université Henri Poincaré - Nancy I

UMR INRA 1136 Interactions Arbres Micro-organismes

BP 239

54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France

Phone : +33 3-83 68 42 38

Fax : +33 3-83 68 42 92

E-mail : Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Abstract

We have characterized two genes in *Paxillus involutus*, coding for putative proteins previously named CipCs (concanamycin induced proteins) in *Emericella nidulans*. CipC1 and CipC2 seem to have distinct role in the fungus. CipC1 gene expression is under the control of GS activity and thus indirectly under the control of nitrogen metabolism. CipC2 gene and protein expressions are up-regulated in the symbiotic organ formed by *P. involutus* and *Betula pendula* and might be involved in filamentous differentiation.

1. Introduction

Ectomycorrhizas (ECM) are symbiotic associations between soil fungi and the fine roots of woody plants. ECM fungi include at least 5000 species, essentially basidiomycetes, and they form symbiotic relationships with diverse host species including conifers and multiple families of angiosperms [1]. The fungal symbiont helps the growth of the plant partner mainly by improving nutrient uptake, while the fungal partner is dependent on the carbohydrates provided by the plant [2]. The exchange of nutrients occurs in a specific symbiotic tissue that is formed between the fungal hyphae and the host roots, named Hartig net. The fungal hyphae surrounding the root form a mantle, which is connected to the extramatrical hyphae that explores soil and translocates nutrients from soil substrate to the plant root.

It is well known that developmental and functional events leading to the formation of the ECM tissue are accompanied by changes in gene expression and protein synthesis. Accordingly, a number of symbiosis-related genes and proteins have been identified in different ECM systems [3-6]. The symbiotic association modifies various functions in both partners, ranging from plant and fungal development, carbon metabolism, cellular transport to defense and stress responses [4].

In a previous study, we have isolated a cDNA, which was 21-fold up-regulated in the mycelium in close contact with the root (i.e. Hartig Net and mantle) compared to

extramatrical hyphae in the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* and *Betula pendula* [7]. Its sequence is homologous to the CipC protein (Concanamycin induced protein C) of *Emericella nidulans* [8]. However, the function of this protein is not known. Melin et al. (2002) found that it was up-regulated by concanamycin and could be involved in the hyper-branching phenotype developed by the fungus in contact with the antibiotic. The involvement of such a protein in filamentous differentiation could be of particular importance in the root colonization process by ectomycorrhizal fungi. In order to get further insights into CipC function in ectomycorrhizal associations, we present in this report the regulation of CipC genes and protein in *P. involutus* and in ectomycorrhizas.

2. Materials and methods

2.1. Organisms and culture media

The ectomycorrhizal fungus, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. (ATCC 200175) strain, was originally isolated from a fruitbody associated with 15-to 30-year-old *Betula pendula* trees growing on coal waste in Midlothian, Scotland. It was grown on cellophane-covered agar medium containing modified Melin-Norkrans medium (MMN). The MMN medium contained (mg l^{-1}): KH_2PO_4, 500; $(NH_4)_2HPO_4$, 250; $CaCl_2$, 50; NaCl, 25; $MgSO_4$ 7 (H_2O), 15; thiamine hydrochloride, 0.1; and $FeCl_3$ 6(H_2O), 1. Glucose concentration was 10 g l^{-1}. For the different N treatments, MMN medium without N(-N treatment), or supplemented with 1 mM NH_4^+ (+N) were used instead of $(NH_4)_2HPO_4$. Additionally to NH_4^+, 2.5 mM L-phosphinotricin (PPT) which inhibits glutamine synthetase (GS) was also used to prevent glutamine synthesis. Ectomycorrhizas between *P. involutus* and *B. pendula* were synthetized axenically as described in [9].

The *Escherichia coli* strain used was DH5α. Classical procedures for manipulating *E. coli* cells and DNA were essentially based on [10].

2.2. Determination of intracellular glutamine and ammonium

Amino acids and ammonium were extracted twice with 70% (V/V) cold ethanol. Amino acids were purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column and analyzed by GC-MS and ammonium determination is based on the colorimetric Berthelot reaction, as described in [11].

2.3. RNA isolation

Fungal colonies were fixed in liquid nitrogen and total RNA isolation was performed using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to [11]. RNase-free DNase treatment (Qiagen) was applied according to the manufacturer to avoid genomic DNA contamination.

2.4. Glutamine synthetase assay

Glutamine synthetase assay was determined by a modification of the transferase assay of [12] according to [13]. Protein content was determined by a modification of the Bradford method [14], using BSA as a standard.

2.5. cDNA isolation of CipC1 and CipC2

A full length cDNA of 351 bp was obtained from a suppressive subtractive library previously constructed [7] and cloned into the pGEM-T easy vector (Promega) (accession number CN072156). This cDNA corresponds to CipC2 submit later on [4] (accession number AAT91245) of *P. involutus*. A full length CipC1 (accession number AAT91246) cDNA of 324 bp was amplified from a cDNA synthetized from 1 µg total RNA of *P. involutus* using the Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL), a $RNaseH^-$ derivative of moloney murine leukemia virus, according to the manufacturer's protocol. The following primers: CipC1 start (5' ATGGGTTGGTTCAACGACGAT 3') and CipC1 stop (5' TCACTGGTAGTCCTGCCCAGA) were used, and CipC1 cDNA was cloned into the pGEM-T easy vector (Promega).

2.6. RT-PCR experiments

Reverse transcription (RT) reactions were performed from 300 ng of total RNA using the enzyme Omniscript (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RT reactions were performed at 37°C for 60 min. Two microliters of RT products were amplified by PCR using the following primers: CipC2 start (5' ATGCCCCACCACGAT 3'), CipC2 stop (5' TCAGTAGCGATCTTT 3'), CipC1 start and CipC1 stop, in the following conditions : 95°C for 1 min followed by 15 to 27 cycles at 95°C for 5s, respectively for CipC1 and CipC2, 60°C for 5s, and 72°C for 6 min using an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, France).

2.7. Heterologous expression of CipC2 in E. coli

The CipC2 ORF was amplified by PCR with the following primers : (5' CCCCCCATGGCTCCCCACCACGATAACTCG 3' ; *Nco*I site underlined) and (5' CCCCGGATCCTTAGTAGCGATGTTTATGGT 3' ; *BamH*I site underlined). The PCR product was ligated in frame into the pET3d vector to give pET3d-CipC2. *Escherichia coli* strain BL21(DE3) was cotransformed with the helper plasmid pSBET and the recombinant plasmid pET3d-CipC2 [15].

Culture of 5 L of an ampicillin- and kanamycin-resistant clone was grown up to exponential phase and induced with 100 μM isopropyl ß-d-thiogalactoside for 4 h. The cells were then harvested by centrifugation at 4,400*g* and suspended in buffer A (30 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA and 200 mM NaCl). Bacteria were lysed by sonication for 5 min and centrifuged 30 min at 23,500 *g*. The soluble part was successively precipitated up to 40% (w/v) and 80% of ammonium sulfate saturation. The fraction which precipitated between 0 and 40% of ammonium sulfate saturation was successively subjected to an ACA 44 gel filtration chromatography equilibrated with buffer A. After dialysis against buffer B (buffer A without NaCl), the fraction of interest was applied to a DEAE (diethyl aminoethyl) sepharose column

equilibrated with buffer B. The recombinant CipC2 passed through the column and was finally dialyzed and concentrated against buffer B. The homogeneity of the proteins was checked on 15% (w/v) SDS-PAGE.

2.8. Western blot analysis

Proteins from *P. involutus*, ectomycorrhizas and *Betula pendula* roots (30 μg) were separated on 14% (w/v) SDS-PAGE following the procedure of Laemmli (1970) and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane during the night in the presence of transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, and 20% [v/v] methanol). The membrane was blocked at room temperature during 4 h with the blocking buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 5% [w/v] milk powder; and 0.05% [v/v] tween 20). The membrane was then incubated with a rabbit serum containing anti-CipC2 antibodies (diluted 1000 times) in 10 mL of blocking buffer during at least 2h. The membrane was then extensively washed before reaction with secondary antibodies (1h) provided in the Immune Star Goat Anti Rabbit Detection Kit from Bio-Rad. The bioluminescence reaction was done according to the instructions of the manufacturer.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of CipC sequences

CipC2 was previously isolated in *P. involutus* from a substractive and suppressive hybridization library (SSH) enriched for nitrogen regulated genes [7]. Another cDNA coding for a protein homologous to *E. nidulans* CipC was found in the EST database of *P. involutus* [16] and named CipC1. CipC1 and CipC2 code for small proteins of 108 and 117 amino acids, and exhibit predicted molecular masses of 12.15 kDa and 13.25 kDa respectively. Their amino acid sequences display 50% of identity between each other. A phylogenetic

analysis showed that the CipC1 and CipC2 genes of different *P. involutus* strains were separated in two well-resolved clades with bootstrap support values of 95 and 97, respectively [16]. The authors suggested that the duplication of the ancestral CipC gene has occured recently, after the divergence of the Paxillus species from its ancestor within the bolete clade, as inferred from the phylogeny of ribosomal DNA sequences [1].

The ProtFun 2.2 software (http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/) predicted that these proteins were not enzymes nor excreted proteins. They could belong to a group of growth factors and could be involved in translation processes. No specific motif was determined but several phosphorylation sites were predicted according to ProtFun software. Moreover, both proteins are predicted to be nuclear according to PSORTII software (http://www.psort.org). These latest predictions are in accordance with a putative role of growth factor for these two proteins. Indeed, growth factors are generally polypeptides of low mass molecular (6-30 kDa), which control growth and cellular functions by binding specific high affinity receptors. Activation of gene transcription is thus mediated by a cascade of transmembrane signals involving phosphorylation modifications.

Figure 1 shows amino acid sequences alignement of CipC1 and CipC2 and the closest homologous sequences found in NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) and MycorWeb (http://mycor.nancy.inra.fr) databases. The alignement shows very divergent N-terminal and C-terminal sequences, while the central portion seems to be more conserved, with four amino acids fully conserved (Fig. 1). Interestingly, no sequences have been detected in other sequenced organisms. CipC proteins seem to be specific of fungal species, with some exceptions. Indeed, BLAST analyses on the *S. cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe or Pichia sp.* genomes revealed that no homologues of CipC exists. However, the results show a very weak homology of *P. involutus* CipC1 with mucin proteins in *S. cerevisiae*. Mucin family members are at the head of the MAP-kinase dependent filamentous growth signaling

Figure 1 : Alignment of sequences homologous to CipC protein. Sequenced were found in Genbank and Mycorweb databases. Accession numbers are given in brackets. Strictly conserved amino acid residues are boxed in black and highly conserved amino acid residues are boxed in gray.

pathway, by activating a complex regulation cascade involving many regulatory proteins [17]. These proteins are particularly studied in mammalian cells because of their putative role in inducing metastasis in human cancer by modify cell growth mode [18].

Additional experiments are thus needed to determine if CipC proteins could have a role in the filamentous growth signaling pathway.

3.2. Transcriptional regulation of CipC1 and CipC2 genes

The expression of both CipC1 and CipC2 genes were analyzed by RT-PCR in relation with the intracellular nitrogen status of *P. involutus*. The mycelium was grown either on a nitrogen-starved medium, 1 mM ammonium supplemented medium or 1 mM ammonium plus 2.5 mM phosphinothrincin (PPT), a specific glutamine synthetase inhibitor. Although RT was done in the same conditions for the two genes, CipC1 amplification products were detected after 18 PCR cycles, while those for CipC2 were detected only after 24 cycles (Fig. 2A). This suggests that CipC1 transcripts are more abundant than CipC2 in *P. involutus*. No difference in CipC2 transcript level was detected, suggesting that CipC2 is constitutively expressed independently of the nitrogen condition tested. Ammonium and ammonium plus PPT treatments lead to changes in CipC1 expression. Indeed, the CipC1 gene was highly expressed in the ammonium treatment but poorly expressed in ammonium plus PPT (Fig. 2A). Glutamine and ammonium contents, as well as glutamine synthetase activity have been detected in the same nitrogen conditions (Fig. 2B, C and D). The N-starved condition resulted in a poor glutamine and ammonium contents ; ammonium treatment led to intracellular accumulation of glutamine and ammonium, while PPT treatment, by blocking GS activity, prevented glutamine synthesis and resulted in ammonium accumulation. On the contrary, GS was active in both –N and ammonium treatments. The expression pattern of CipC1 gene was neither correlated with intracellular glutamine nor with ammonium, which are known to be

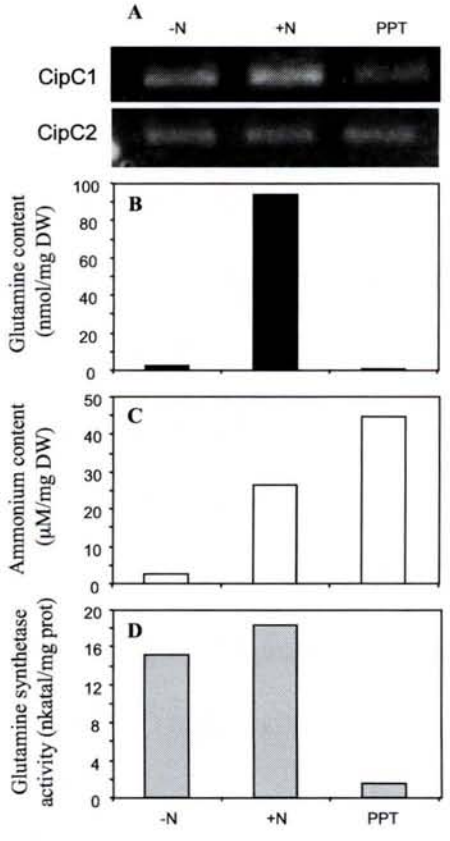


Figure 2 : Correlation between CipC mRNA levels, intracellular glutamine and ammonium contents, and glutamine synthetase activity.
Fungal colonies were grown for 10 days on cellophane-covered agar medium and transferred onto a N-deficient liquid medium for 6 days. Colonies were further transferred for 12 h onto a –N, 1mM NH_4^+ (+N), 1 mM NH_4^+ + 2.5 mM phosphinothricin (PPT) medium before analyses. CipC transcript levels (A), glutamine (B) and ammonium (C) contents and GS activity (D) were determined as described in Materiel and Methods section.

compounds involved in the regulation of many genes following the Nitrogen Catabolic Repression [19]. Rather, CipC1 gene seems to be expressed according to GS activity. It was previously demonstrated in *Gibberella fujikuroi*, that independently of the glutamine content, a functional GS is essential for CipC gene expression [20]. The authors suggest that GS might be capable of regulating CipC gene expression through protein-protein interactions. Similarly, GS is involved in the regulation of the transcription factor TnrA in *Bacillus subtilis*, in relation with nitrogen availability [21]. In *P. involutus*, PPT, by binding GS, could prevent the enzyme to interact with other proteins such as transcription factors, resulting in the downregulation of CipC1. This putative role of CipC1 in regulation cascades suggests that this protein could be a putative regulator, whose expression is linked to nitrogen metabolism, through GS activity.

3.3. Expression of CipC2 protein in ectomycorrhiza

The recombinant CipC2 was produced as a soluble protein in *E. coli*. It was eluted as a monomer in gel filtration (data not shown). The purified protein is shown in Fig. 3A. An unidentified protein with a lower molecular weight was copurified with CipC2 and could correspond either to a degradation product of CipC2 or to an *E. coli* contaminant.

Polyclonal antibodies raised against the purified CipC2 protein recognized a polypeptide around 13 kDa in *P. involutus*, that co-migrated with purified CipC2 protein (Fig. 3B). The CipC2 abundance was compared between *P. involutus*/*B. pendula* ectomycorrhizas, *P. involutus* in pure culture and *B. pendula* roots. No signal was detected for *B. pendula* roots, indicating that anti-CipC2 antibodies do not bind aspecifically onto plant proteins (Fig. 3B). Based on known concentrations of recombinant CipC2, the amount of CipC2 in ectomycorrhizas and *P. involutus* in pure culture was estimated to be 78.2 ng and 100.7 ng respectively for 30 μg of total proteins loaded, representing 0.26% and 0.33% of the total

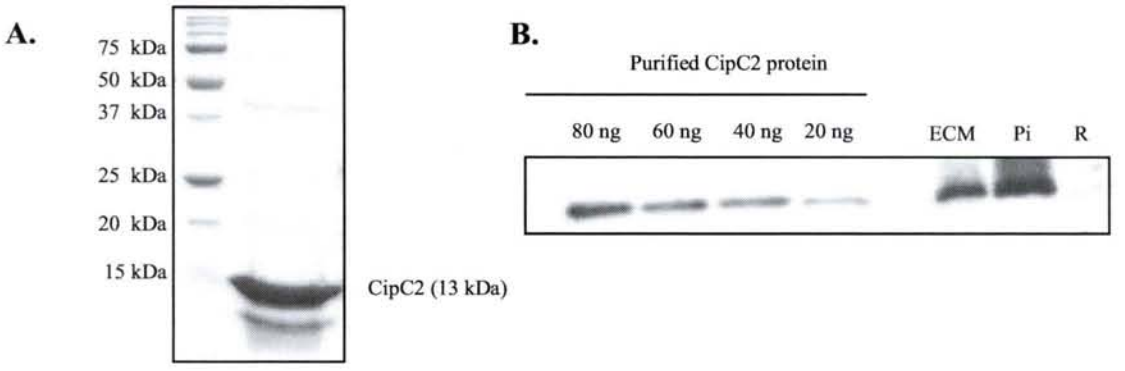


Figure 3 : Analysis of CipC2 protein expression.
Purified recombinant CipC2 protein analysed by SDS-PAGE gel (A). Expression pattern of CipC2 protein analysed by Western blotting in *P. involutus*/*B. pendula* ectomycorrhizas (ECM), *P. involutus* (Pi) in pure culture and *B. pendula* roots (R)(B). Various known concentrations of purified recombinant CipC were also loaded onto the gel to allow signals quantification.

proteins respectively. However, in ectomycorrhizas, fungal tissues represented about 60% of the mature symbiotic organ [22]. Consequently, the amount of CipC2 in ectomycorrhizas was estimated to be 130.3 ng (0.43% of the total proteins). The content of CipC2 is thus slightly higher (1.3-fold) in ectomycorrhizas compared to the fungus in pure culture. This result is in accordance with previous results obtained from RT-PCR experiments, which showed that CipC2 gene was not regulated in ectomycorrhiza synthesized in axenic conditions, compared to *P. involutus* in pure culture (data not shown). However, we have found in a previous study that CipC2 gene showed an up-regulation of 21-fold in ectomycorrhizas compared to extramatrical mycelium in an intact ectomycorrhizal system in microcosm. Since transcript levels are correlated with protein content, we can suppose that CipC2 protein content is highly enhanced in the ectomycorrhizas of the connected system in microcosm. Unfortunatly, protein expression analysis in the extramatrical mycelium could be difficult because of the small amount of extracted proteins.

Based on the previous observation of [8] in *E. nidulans*, the up-regulation of CipC2 in ectomycorrhizas could be related to a cascade of gene regulation, leading to a filamentous differentiation of the fungus. Accordingly, in *S. cerevisiae*, this dimorphic transition requires the cooperation of two different signalling pathways, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade and a cAMP-dependent pathway [23]. This morphological change is thought to be necessary in a range of human and plant fungal pathogens, for example filamentous defect strains of the human pathogen *Candida albicans* [24] or of plant pathogen *Ustilago maydis* [25] being avirulent. In the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*, it was propose that the high affinity ammonium transporters sense the environment and induce, via signal transduction cascades, a switch of the fungal growth mode allowing plant root colonization [26].

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Concluding remarks

In this preliminary study, we have identified two proteins CipC1 and CipC2 of *P. involutus*, which seem to be restricted to fungi. Although they are both predicted to be involved in regulatory processes, their expression patterns suggest that they have distinct role in *P. involutus*. CipC1 gene expression is under the control of GS activity and thus indirectly under the control of nitrogen metabolism. CipC2 gene and protein expressions are up-regulated in the symbiotic organ and might be involved in filamentous differentiation. It was previously shown in yeast and ectomycorrhizal fungi that hyphal proliferation is dependent on the nitrogen availability [26,27]. Further investigations are needed to precise the role of each protein in hyphal hyperbranching in relation with the nitrogen status and the link they have between each other. This will be of particular interest to elucidate the intriguing questions concerning the regulatory pathways leading to the establishment and functionning of the ectomycorrhizal organ.

References

[1] Hibbett, D.S., Gilbert, L.B. and Donoghue, M.J. (2000) Nature 407, 506-8.
[2] Smith, S. and Read, D. (1997) Academic Press, San Diego.
[3] Voiblet, C., Duplessis, S., Encelot, N. and Martin, F. (2001) Plant J 25, 181-91.
[4] Johansson, T.L.Q., A. Soderstrom, B. Erlandsson, R. Lundeberg, J. Uhlén, M. Tunlid, A. (2004) Molecular Plant-Microbe Interactions 17, 202-215.
[5] Duplessis, S., Courty, P.E., Tagu, D. and Martin, F. (2005) New Phytologist 165, 599-611.
[6] Hilbert, J.L. and Martin, F. (1988) New Phytologist 110, 339-346.
[7] Morel, M., Jacob, C., Kohler, A., Johansson, T., Martin, F., Chalot, M. and Brun, A. (2005) Appl Environ Microbiol 71, 382-91.
[8] Melin, P., Schnurer, J. and Wagner, E.G. (2002) Mol Genet Genomics 267, 695-702.
[9] Brun, A., Chalot, M., Finlay, R. and SÖderstrÖm, B. (1995) New Phytologist 129, 487-493.
[10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.A. (1989).
[11] Javelle, A., Morel, M., Rodriguez-Pastrana, B.R., Botton, B., Andre, B., Marini, A.M., Brun, A. and Chalot, M. (2003) Mol Microbiol 47, 411-30.
[12] Shiparo, B.M. and Stadtman, E.R. (1970) Methods in enzymology. Ed Tabord H, Tabord CW. Academic Press, New York, London. 17A, 910-922.
[13] Brun, A., Chalot, M., Botton, B. and Martin, F. (1992) Plant Physiol 99, 938-944.

[15] Schenk, P.M., Baumann, S., Mattes, R. and Steinbiss, H.H. (1995) Biotechniques 19, 196-8, 200.
[16] Le Quere, A., Schutzendubel, A., Rajashekar, B., Canback, B., Hedh, J., Erland, S., Johansson, T. and Tunlid, A. (2004) Mol Ecol 13, 3809-19.
[17] Cullen, P.J. et al. (2004) Genes Dev 18, 1695-708.
[18] Clevers, H. (2004) Dev Cell 7, 150-1.
[19] Marzluf, G.A. (1997) Microbiol Mol Biol Rev 61, 17-32.
[20] Teichert, S., Schonig, B., Richter, S. and Tudzynski, B. (2004) Mol Microbiol 53, 1661-75.
[21] Wray, L.V., Jr., Zalieckas, J.M. and Fisher, S.H. (2001) Cell 107, 427-35.
[22] Blaudez, D., Chalot, M., Dizengremel, P. and Botton, B. (1998) New Phytologist 138, 543-552.
[23] Lengeler, K.B. et al. (2000) Microbiol Mol Biol Rev 64, 746-85.
[24] Banuett, F. (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88, 3922-6.
[25] Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G.R. (1997) Cell 90, 939-49.
[26] Javelle, A., Andre, B., Marini, A.M. and Chalot, M. (2003) Trends Microbiol 11, 53-5.
[27] Lorenz, M.C. and Heitman, J. (1997) Embo J 16, 7008-18.

5. Caractérisation moléculaire, fonction et régulation des transporteurs d'ammonium et des enzymes de l'assimilation Gs et Gdh à NADP chez *Hebeloma cylindrosporum*.

Publication n°5 - Molecular Microbiology 2004

Résumé : Les hyphes extramatricielles jouent un rôle principal dans la nutrition azotée des arbres, ils sont de fait considérés comme la structure absorbante de la symbiose ectomycorhizienne.

Nous avons cloné et caractérisé *AMT1*, *GLNA* et *GDHA* les gènes codant respectivement un troisième transporteur d'ammonium, la glutamine synthétase et la glutamate deshydrogénase Nadp-dépendante d'*Hebeloma cylindrosporum*. Amt1 complémente le défaut de croissance pseudohyphale d'un mutant mep2 de *Saccharomyces cerevisiae*. C'est la première évidence qu'un membre de la famille de Mep/Amt complémente ce défaut de changement dimorphique. La représentation de Dixon de l'inhibition du transport de la méthylamine par l'ammonium indique qu'Amt1 a une affinité beaucoup plus élevée que les deux membres de la famille d'Amt/Mep précédemment caractérisés (Amt2 et Amt3) chez *H. cylindrosporum*. Nous avons identifié les pool(s) intracellulaires d'azote responsables de la modulation de l'expression d'*AMT1*, d'*AMT2*, d'*AMT3*, de *GDHA* et de *GLNA*. En réponse à un apport d'ammonium ou de Gln, la transcription de *AMT1*, *AMT2* et *GDHA* est réprimée, ces gènes sont donc soumis à la répression catabolique azotée chez *H. cylindrosporum*. Nos résultats ont démontré que la Gln est l'effecteur pour la répression de *AMT1* et *AMT2*, tandis que la répression pour *GDHA* est commandée par l'ammonium intracellulaire. L'activité de transport d'ammonium peut être négativement commandée par l'ammonium intracellulaire lui-même. *AMT3* et *GLNA* sont fortement exprimés mais pas fortement régulés.

Molecular Microbiology (2003) **47**(2), 411–430

Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*

Arnaud Javelle,[1†] Mélanie Morel,[1] Blanca-Rosa Rodríguez-Pastrana,[2] Bernard Botton,[1] Bruno André,[3] Anne-Marie Marini,[3] Annick Brun[1] and Michel Chalot[1*]

[1]*Université Henri Poincaré – Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques, UMR INRA/UHP 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.*

[2]*Laboratoire de Biotechnologie, Centre de Recherche des Sciences Biologiques, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México.*

[3]*Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université Libre de Bruxelles, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires, Gosselies, Belgium.*

Summary

External hyphae, which play a key role in nitrogen nutrition of trees, are considered as the absorbing structures of the ectomycorrhizal symbiosis. Here, we have cloned and characterized *Hebeloma cylindrosporum AMT1*, *GLNA* and *GDHA* genes, which encode a third ammonium transporter, a glutamine synthetase and an NADP-dependent glutamate dehydrogenase respectively. Amt1 can fully restore the pseudohyphal growth defect of a *Saccharomyces cerevisiae mep2* mutant, and this is the first evidence that a heterologous member of the Mep/Amt family complements this dimorphic change defect. Dixon plots of the inhibition of methylamine uptake by ammonium indicate that Amt1 has a much higher affinity than the two previously characterized members (Amt2 and Amt3) of the Amt/Mep family in *H. cylindrosporum*. We also identified the intracellular nitrogen pool(s) responsible for the modulation of expression of *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA*. In response to exogenously supplied ammonium or glutamine, *AMT1*, *AMT2* and *GDHA* were downregulated and, therefore, these genes are subjected to nitrogen repression in *H. cylindrosporum*. Exogenously supplied nitrate failed to induce a downregulation of the five mRNAs after transfer of mycelia from a N-starved condition. Our results demonstrate that glutamine is the main effector for *AMT1* and *AMT2* repression, whereas *GDHA* repression is controlled by intracellular ammonium, independently of the intracellular glutamine or glutamate concentration. Ammonium transport activity may be controlled by intracellular NH_4^+. *AMT3* and *GLNA* are highly expressed but not highly regulated. A model for ammonium assimilation in *H. cylindrosporum* is presented.

Accepted 9 October, 2002. *For correspondence. E-mail Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr; Tel. (+33) 3 83 68 42 38; Fax (+33) 3 83 68 42 92. †Present address: Molecular Microbiology Department, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK.

© 2003 Blackwell Publishing Ltd

Introduction

Nitrogen (N) plays a critical role in microorganism biochemistry, being needed for the synthesis of many compounds, including amino acids, purines, pyrimidines, some carbohydrates and lipids, enzyme cofactors and proteins, all of which are essential for growth processes. Ammonium, either taken up directly from the external medium or derived from amino acids, is often a preferred source of N for microorganisms (ter Schure *et al.*, 2000) and, therefore, efforts have been made over the last decades to understand its transport and metabolism better.

The first evidence that a specific ammonium transport system acts in fungi came from the work of Hackette *et al.* (1970) in *Penicillium chrysogenum*. In further studies, using the ammonium analogue tracer [^{14}C]-methylammonium, Roon *et al.* (1975) measured an uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, which resulted in a 1000-fold accumulation. In a further study, Dubois and Grenson (1979) showed that the uptake of ammonium/methylamine in *S. cerevisiae* is mediated by at least two functionally distinct systems, but this study was hampered by the lack of molecular characterization of the transport systems. Ammonium uptake by *S. cerevisiae* involves at least three permeases, Mep1, Mep2 and Mep3 (Marini

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

et al., 1994; 1997), which belong to a multigenic family, the so-called Mep/Amt family (Marini *et al.*, 1994; Ninnemann *et al.*, 1994). The presence of at least two ammonium transporters with different affinities, MeaA and MepA, has been reported for *Aspergillus nidulans* (Monahan *et al.*, 2002a), and genome database screening has also identified three Amt/Mep systems in *Schizosaccharomyces pombe* and four in *Neurospora crassa* (quoted by Monahan *et al.*, 2002a). The ability of these proteins to act as ammonium transporters has been challenged (Soupene *et al.*, 2001; 2002), but recent electrophysiological studies have demonstrated that one member of the Mep/Amt family mediates potential-driven uptake and retrieval of the charged form (Ludewig *et al.*, 2002).

Once inside the cell, NH_4^+ can be incorporated into the key nitrogen donors glutamate and glutamine for biosynthetic reactions. The NADP-linked glutamate dehydrogenase (NADP-GDH; EC 1.4.1.4) catalyses the reductive amination of 2-oxoglutarate to form glutamate. Glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2) incorporates ammonium into the carboxyl of glutamate to form glutamine. In turn, the glutamate and glutamine formed serve as donors in transamination and amido nitrogen transfer reactions. Glutamate is an essential amino N donor for many transaminases, and glutamine amide nitrogen is used to synthesize many essential metabolites, such as nucleic acids, amino sugars, histidine, tyrosine, asparagine and various cofactors. *GLNA*, the gene encoding GS, and *GDHA*, the gene encoding the NADP-GDH, have been cloned from various fungi. Ammonium and the products of its assimilation appear to repress key metabolic routes of nitrogen assimilation in most fungi (Wiame *et al.*, 1985; Mora, 1990; Baars *et al.*, 1995; Kersten *et al.*, 1997; Marzluf, 1997; Cardoza *et al.*, 1998).

However, N is commonly considered as a limiting nutrient, and microorganisms have developed a variety of adaptations that enable them to respond to their internal nutritional status as well as to the external availability of ammonium. In fungi, a strategy is the induction by nitrogen starvation of filamentation to improve substrate exploration, and thus their nutrient-scavenging capacity (Lengeler *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae*, pseudohyphal growth is induced by nitrogen starvation (Gimeno *et al.*, 1992), and it has been proposed that the Mep2 protein acts as a sensor of the transduction pathway of pseudohyphal differentiation (Lorenz and Heitman, 1998). *S. cerevisiae* Gpr1, a Gα-coupled seven-transmembrane domain receptor, acts as a sensor of the glucose status for the pseudohyphal differentiation transduction pathways (Lorenz *et al.*, 2000).

A conceptually similar strategy for plants is the mycorrhizal association, in which expanding mycorrhizal mycelium that grows outwards from the mantle into the surrounding soil is a very efficient nitrogen scavenger owing to its capacity to explore a larger soil volume than roots alone (Smith and Read, 1997; Chalot and Brun, 1998; Chalot *et al.*, 2002). Based on both ^{15}N labelling and mass balance data, it was demonstrated recently that hyphal NH_4^+ acquisition contributes 45% of total plant N uptake under N deficiency (Jentschke *et al.*, 2001). The two processes involved in ammonium assimilation, namely transport and metabolism, have been studied in various ectomycorrhizal models. Using [^{14}C]-methylamine as an analogue of ammonium, the kinetics and energetics of NH_4^+ transport were studied in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Javelle *et al.*, 1999), and ammonium transporters were first cloned in *Hebeloma cylindrosporum* (*AMT2* and *AMT3*) (Javelle *et al.*, 2001) and *Tuber borchii* (*AMT1*) (Montanini *et al.*, 2002). GDH and GS activities were detected in a range of ectomycorrhizal fungi (Ahmad and Hellebust, 1991; Brun *et al.*, 1992). NADP-GDH was characterized from the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* (Lorillou *et al.*, 1996) and *T. borchii* (Vallorani *et al.*, 2002). However, the two processes were studied independently in different ectomycorrhizal models, and the data obtained up to now give only a fragmentary view of ammonium assimilation and its regulation in ectomycorrhizal fungi.

Here, we report the cloning and characterization of *H. cylindrosporum AMT1*, *GLNA* and *GDHA* genes, which are predicted to encode a third ammonium transporter, a GS and a NADP-GDH respectively. Unlike the previously characterized ammonium transporters from *H. cylindrosporum*, which had only a limited capacity to complement the pseudohyphal growth defect in a homozygous triple Mep mutant (Javelle *et al.*, 2001), Amt1 can restore pseudohyphal differentiation fully in *S. cerevisiae*. To date, ammonium transporters complementing this function have not been identified. We also identified the intracellular N pool(s) responsible for the modulation of expression of ammonium transporters and ammonium-assimilating enzymes.

Results

Sequences and phylogenetic analysis of Amt1

The complementation of the *S. cerevisiae* triple *mep* mutant with an *H. cylindrosporum* expression library allowed the isolation of 136 positive *S. cerevisiae* clones on a selective medium. An exhaustive polymerase chain reaction (PCR) analysis, using specific primers for *AMT2* or *AMT3*, revealed that five and 126 *S. cerevisiae* clones contained the *AMT2* or *AMT3* cDNA respectively. The plasmids of the five remaining clones were isolated and sequenced, and we found that the five cDNAs encoded a third AMT, which was named *AMT1*. These data indicate that *H. cylindrosporum* contains at least three Amts, a

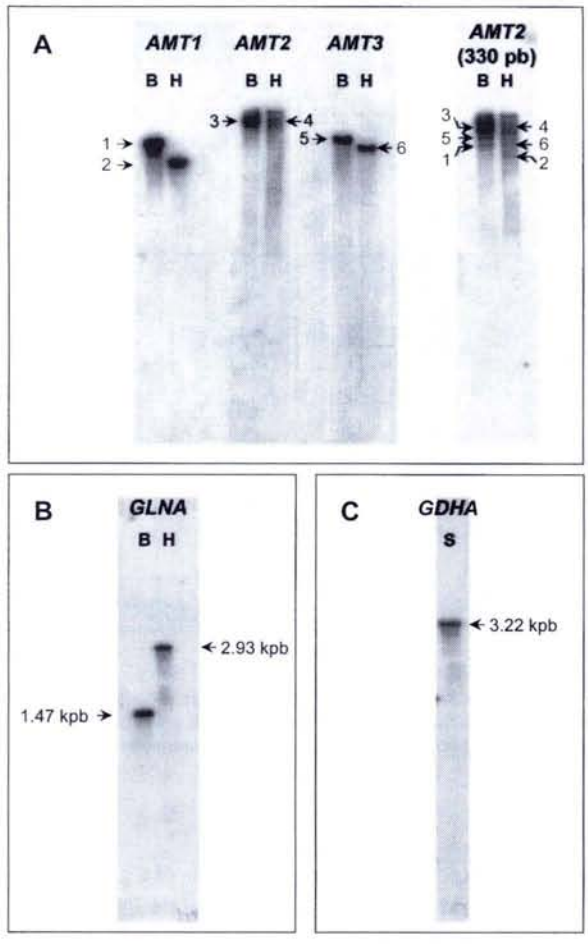


Fig. 1. Southern blot analysis of genomic DNA from *H. cylindrosporum*.
A. Full-length cDNA *AMT1*, *AMT2*, *AMT3* or a 330 bp fragment from the conserved region of *AMT2* were used as probes. Restriction enzymes used were *Bam*HI (B) or *Hin*dIII (H). The corresponding sizes of each signal are as follows: 1, 4.3 kbp; 2, 3.8 kbp; 3, 5.1 kbp; 4, 5.0 kbp; 5, 4.4 kbp; 6, 4.3 kbp.
B. Full-length cDNA *GLNA* was used as a probe. Restriction enzymes used were *Bam*HI (B) or *Hin*dIII (H).
C. Full-length cDNA *GDHA* was used as a probe. Restriction enzyme used was *Sma*I (S).

hypothesis that was tested further by comparative Southern blot analysis (Fig. 1A). Genomic DNA from *H. cylindrosporum* was digested with *Bam*HI or *Hin*dIII, hybridized at 42°C with one of the three full-length AMT probes (which does not contain *Bam*HI or *Hin*dIII sites) and washed under high stringency. In each blot, only a single band was detected, indicating that the three AMTs were present as single copies (Fig. 1A). When blots were prepared in the same conditions, but hybridized at 37°C with the 330 bp probe from the conserved region of *AMT2* under low stringency, three bands were observed (Fig. 1A). This conserved region showed 72.3% and 54.9% identity (nucleotides) with the *AMT1* and *AMT3* homologous regions respectively. The sizes of these single bands correspond to those found with individual full-length AMT probes (Fig. 1A).

The *AMT1* cDNA encodes a 477-amino-acid protein (50.9 kDa). Analysis of predicted sequences from cDNA showed 67.8% and 46.7% identity with Amt2 and Amt3 respectively. The hydropathy profile of Amt1, generated with the Kyte and Doolittle, (1982) algorithm, consists of 11 hydrophobic domains of sufficient length to be considered as potential membrane-spanning domains. Several other algorithms, including TMPRED (Hofmann and Stoffel, 1992), HMMTOP (Tusnády and Simon 2001) and TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998), predicted that the central hydrophobic region of Amt1 contains 11 transmembrane (TM) segments (Fig. 2). Moreover, TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998) software predicted extracellular N-terminal and intracellular C-terminus tails according to the 'positive inside rule'. We concluded that Amt1 consists of a central hydrophobic core made up of 11 TM, with a long loop separating the two transmembrane domains II and III (Fig. 2).

Kinetics of methylamine and ammonium uptake by Amt1 expressed in an S. cerevisiae *mutant deficient in ammonium uptake*

As found for Amt2 and Amt3 (Javelle *et al.*, 2001), Amt1 was able to complement the growth defect of the *S. cerevisiae* strain 31019b, *mep1Δmep2Δmep3Δ*, in the presence of <1 mM ammonium as sole nitrogen source, thus indicating that *AMT1* cDNA encodes a functional NH_4^+ transporter. Kinetic parameters were determined using [^{14}C]-methylamine (concentration range from 0.15 to 20 mM) as a tracer measured for a short uptake time (2 min) in the transformed *S. cerevisiae* strain 31019b (Table 1) and compared with those obtained for Amt2 and Amt3 (Javelle *et al.*, 2001). *S. cerevisiae* was unable to metabolize methylamine into methylglutamine, avoiding interference between metabolism and transport in uptake experiments (Soupene *et al.*, 2001), which can be carried out over short periods during which efflux is considered to be negligible. These results show that Amt1 has a

Table 1. Kinetic uptake parameters of methylamine by the *H. cylindrosporum* ammonium transporters Amt1, Amt2 and Amt3 expressed in the *S. cerevisiae* mutant 31019b.

	Amt1	Amt2	Amt3
K_m (μM)	89 (91)	58 (54)	260 (290)
V_{max} (nmol min^{-1} mg^{-1} protein)	90 (101)	60 (71)	60 (71)
K_i (μM)	<0.1	0.10–0.17	12–14

Values were estimated from Eadie–Hofstee plots; kinetic parameters derived from the Lineweaver–Burk plots are given in parentheses. Initial rates of [^{14}C]-methylamine uptake were measured as described previously (Marini *et al.*, 1994). For the inhibition assays, ammonium was added simultaneously with [^{14}C]-methylamine.

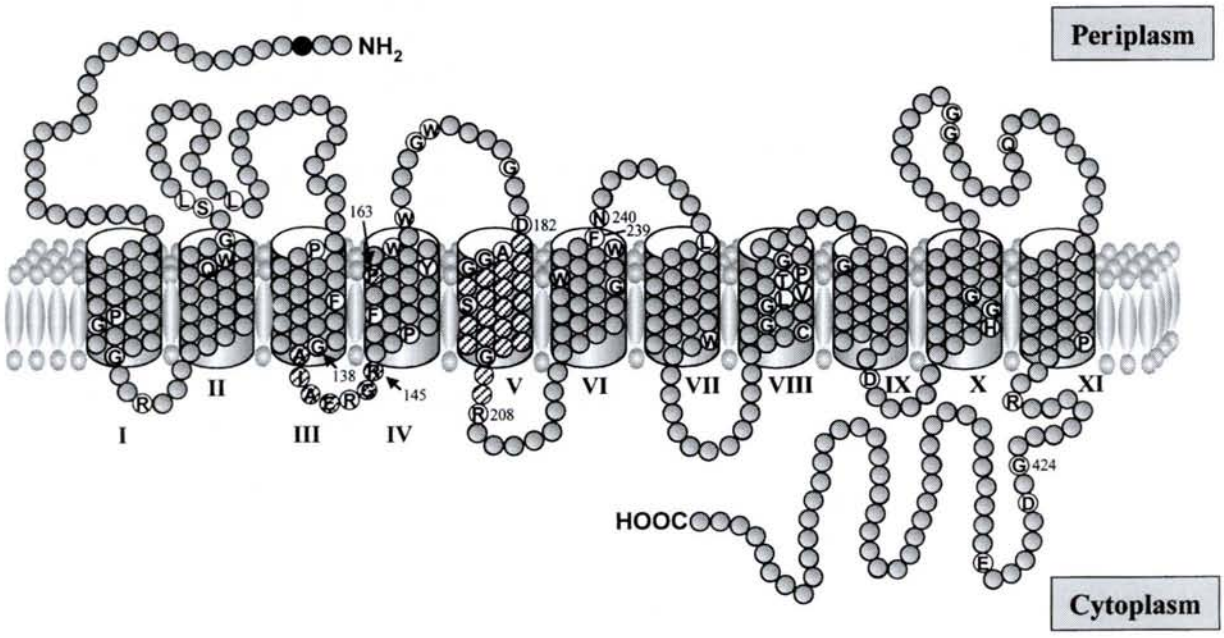


Fig. 2. Proposed topological model of *H. cylindrosporum* Amt1 according to the prediction of the TMHMM algorithm. Conserved residues between Amts are shown in black in a white box. The putative glycosylation site (asparagine 3), conserved between Amt1 and Amt2, is shown in a black box. The hatched box corresponds to the ammonium transporter signature (Pfam domain PF00909). Transmembrane helices are labelled with roman numbers. Residues and fragments in white in a hatched box, marked by an arrow, concern a specific sequence as explained in the text.

higher capacity but a lower affinity than Amt2 for methylamine (Table 1). Because methylamine affinity does not necessarily reflect ammonium affinity, competition experiments were carried out with ammonium. Dixon plots of the inhibition of methylamine uptake by ammonium in triple *Mep*Δ mutant cells transformed with pDR195-*AMT1* showed that ammonium ions competitively inhibited [^{14}C]-methylamine uptake activity (not shown).

Expression of Amts in a triple mep mutant restored ammonium retention within S. cerevisiae *cells*

Feeding experiments involving excretion phenomena showed that *AMT2* and *AMT3* from *H. cylindrosporum* played a role in ammonium retention in *S. cerevisiae* (Javelle *et al.*, 2001). We tested the ability of the triple *mep*Δ strain transformed with pDR195-*AMT1* to feed an arginine-permease-less strain [*gap1-1 can1-1*] in arginine-containing media (0.05%) as the sole nitrogen source. When wild-type donor cells were used, no feeding of the [*gap1-1 can1-1*] receptor cells was detected after a 3 day incubation period (not shown). In contrast, the triple *mep*Δ strain transformed with plasmid pDR195 was able to feed the receptor cells, indicating that it excreted a nitrogen source into the medium that could be taken up by cells lacking the general amino acid permease Gap1 and the specific arginine permease Can1. When the donor cells expressed a single Amt transporter, growth of the receptor cells was reduced (not shown). These data suggest that, during growth on arginine-containing media, cells excrete ammonium ions that are taken back up when they express a high-affinity Amt.

Amts and pseudohyphal growth in S. cerevisiae

Previous results indicated that neither Amt2 nor Amt3 was able to complement the pseudohyphal growth defect of an *S. cerevisiae* strain lacking the *MEP2* gene in a 4 day experiment (Javelle *et al.*, 2001). We repeated the experiment with the diploid strain ZAM6 (MATa/α *ura3/ura3 LEU2 leu-2 mep1Δ/mep1Δ mep2Δ::LEU2/mep2 Δ::LEU2*) transformed with pDR195-AMT1 (Fig. 3B), pDR195-AMT2 (Fig. 3C), pDR195-AMT3 (Fig. 3D) or pDR195 (Fig. 3E) plasmid and grown at 29°C for 10 days on YNB medium containing 0.1 mM ammonium as sole N source and compared with growth of the diploid wild-type strain (Σ1278/3962c) (Fig. 3A). Amt1 and Amt2, although of lower efficiency, were able to complement the pseudohyphal growth defect of the ZAM6 mutant, whereas Amt3 was unable to do so.

Sequence and phylogenetic analysis of GS and GDH

Genomic DNA from *H. cylindrosporum* was digested with *Bam*HI and *Hin*dIII and hybridized at 42°C with a *GLNA*

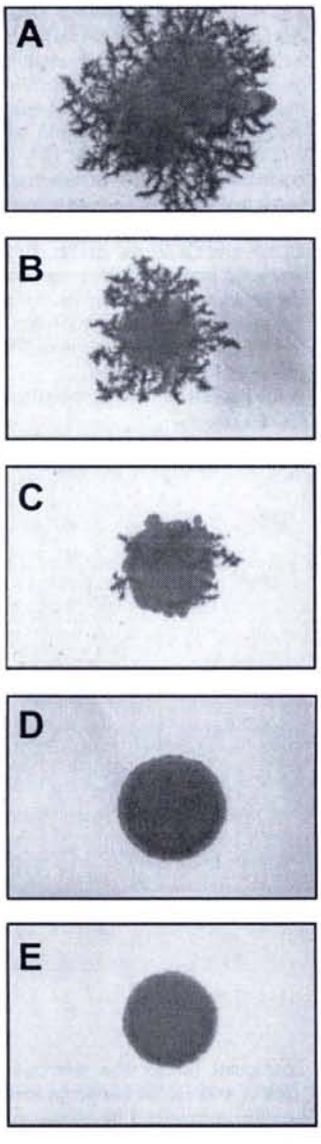


Fig. 3. Amt1 and Amt2 complement the pseudohyphal growth defect of homozygous diploid *mep1*Δ *mep2*Δ (ZAM6) cells. Diploid wild-type strains and ZAM6 cells, transformed with plasmid pDR195, were tested on YNB-N medium containing 100 μM NH_4^+ and grown for 10 days at 29°C.
A. Σ1278/3962c (diploid wild type strain)
B. ZAM6 + pDR195-AMT1.
C. ZAM6 + pDR195-AMT2.
D. ZAM6 + pDR195-AMT3.
E. ZAM6 + pDR195.

probe (which does not contain a BamHI or *Hin*dIII site) (Fig. 1B) or with *Sma*I and hybridized at 42°C with a *GDHA* probe (which does not contain a *Sma*I site) (Fig. 1C) and washed under high stringency. In each blot, only a single band was detected, indicating that the two genes were present as single copies. The *GLNA* and *GDHA* cDNAs are predicted to encode a 354-amino-acid protein (39.2 kDa) and a 450-amino-acid protein (48.3 kDa) respectively. Analysis of GS shows 90.7% identity with *Agaricus bisporus* GS and 87% with *Amanita muscaria* GS. GDH has 84.9% identity with *L. bicolor* GDH and 83.1% with *A. bisporus* GDH. For GS, the residues aspartate 58 and glutamate 296, highly conserved in comparison with aspartate 50 and glutamate 327 from bacteria, are involved in the active site of the enzyme (Alibhai and Villafranca, 1994; Liaw *et al.*, 1995).

Regulation of AMT, GLNA *and* GDHA *genes*

The expression levels of the three ammonium transporter (*AMT1*, *AMT2*, *AMT3*) genes and the two ammonium-assimilating enzyme (*GLNA* and *GDHA*) genes were studied by Northern blot analysis (Fig. 4A). Single mRNAs were of about 1.4 kb, 1.7 kb, 1.8 kb, 1.9 kb and 1.2 kb was detected for *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* respectively. Transferring *H. cylindrosporum* from a 3.78 mM ammonium to a -N medium resulted in 31-, 16.4- and 12.3-fold increases in *AMT1*, *AMT2* and *GDHA* transcript levels, respectively, whereas *GLNA* and *AMT3* transcript levels increased by only 4.9- and 3.9-fold respectively (Fig. 4A). In a time course experiment, the increases in *AMT2* and *AMT3* transcript levels were found to be maximal after 12 h of N starvation (Javelle *et al.*, 2001). A 10-fold decrease in the amino acid pool (Fig. 4B), a 3.1-fold increase in methylamine uptake, three- and 2.5-fold increases in GDH and GS specific activities, respectively, were observed in the same conditions. Similarly, N starvation induced a fourfold increase in the methylamine uptake after a 3 day incubation period in *P. involutus* (Javelle *et al.*, 1999).

Feeding the mycelium with 1 or 10 mM ammonium resulted in a decrease in the *AMT1* and, to a lesser extent, *AMT2* transcript levels until 12 h (Fig. 4A). When compared with the -N treatment, at 1 mM ammonium, methylamine transport decreased by 2.3- and 2.1-fold after 6 and 12 h, respectively, which correlates with the decrease in *AMT1* and *AMT2* mRNA levels. The *AMT1* and *AMT2* mRNA levelled up 24 h after supplying 1 mM ammonium (Fig. 4A). This conflicts with methylamine transport, which decreased by threefold between 12 and 24 h resupply with 1 mM ammonium. This apparent discrepancy might be explained by a delay between mRNA accumulation and Amt synthesis or Amt membrane targeting. The rapid decrease in the *GDHA* transcript level observed 3 h after supplying 1 mM ammonium was followed by an increase until 24 h (Fig. 4A). This was correlated with the GDH activity, which increased from 511 nkat g^{-1} fresh weight (FW) (3 h) to 1078 nkat g^{-1} FW (24 h). After the addition of 0.1, 1 or 10 mM ammonium, *AMT3* and *GLNA* transcript levels remained almost unchanged (Fig. 4A). Under high internal N status, *AMT3* and *GLNA* would ensure a basal level of ammonium uptake and metabolism respectively.

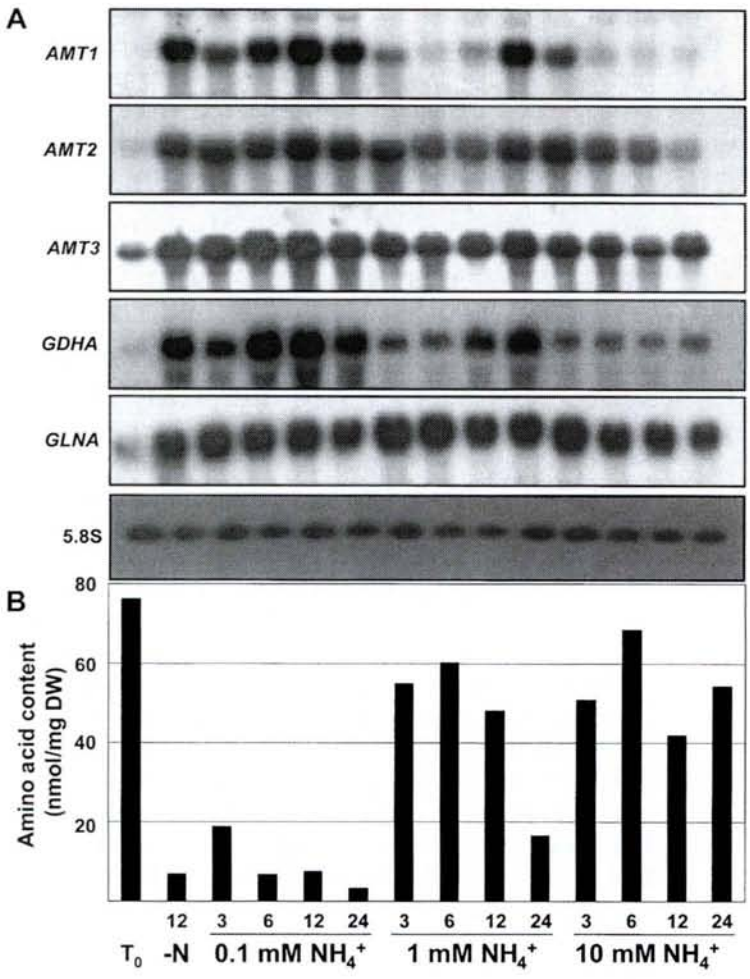


Fig. 4. Correlation between *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* mRNA and intracellular amino acid contents. Fungal colonies were grown for 10 days on cellophane-covered agar medium containing 3.78 mM ammonium as sole nitrogen source (T0) and transferred to a N-free liquid medium for 12 h (–N). Some colonies were further transferred to a 0.1, 1 or 10 mM ammonium-containing medium.
A. Northern analysis of *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* transcripts. Total RNAs were extracted from 100 mg of mycelium, and 20 μg per lane were separated on 1.5% agarose-formaldehyde gel and hybridized to the [α-^{32}P]-dCTP cDNA probes or 5.8S rRNA probe as loading control.
B. Intracellular amino acid contents. Values are means ($n = 4$).

At 0.1 mM ammonium, intracellular amino acid pools were poorly restored, whereas they were almost restored to their initial level 6 h after supplying 1 or 10 mM ammonium (Fig. 4B). After 24 h feeding with 1 mM ammonium, the intracellular amino acid pools declined, indicating that the mycelium rapidly consumed this N source to enter into a N starvation state. This would explain the further increase in *AMT1*, *AMT2* and *GDHA* transcript levels. When fed with 0.1 mM ammonium, the mycelium remained in a N-starved condition, which induce high mRNA levels (Fig. 4A). Conversely, when fed with 10 mM ammonium, the low mRNA levels confirmed that the mycelium was under N-sufficient conditions.

In order to identify the effector(s) for nitrogen regulation in *H. cylindrosporum*, the correlation coefficients *r* for the relationship between *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* transcript levels and N-compound amounts were calculated when the fungus was transferred from a N-free medium to a 1 mM ammonium medium for various lengths of time (Table 2). Alanine, asparagine, glutamate, glutamine and NH_4^+ and the total amino acid pools gave

Table 2. Correlation coefficient (*r*) for the relationships between *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* transcript levels and amino acid concentrations 24 h after supplying 1 mM NH_4^+.

	AMT1	*AMT2*	*AMT3*	*GDHA*	*GLNA*
Alanine	–0.98**	–0.82*	–0.76	–0.92**	–0.23
Glycine	–0.50	–0.74	–0.65	–0.62	–0.80
Valine	–0.67	–0.40	–0.33	–0.41	0.39
Leucine	–0.44	–0.63	–0.46	–0.50	–0.80
Isoleucine	–0.69	–0.68	–0.51	–0.63	–0.17
Serine	–0.72	–0.70	–0.59	–0.76	–0.58
Phenylalanine	–0.44	–0.40	–0.20	–0.36	–0.38
Aspartate	–0.46	–0.66	–0.53	–0.56	–0.84
Glutamate	–0.91**	–0.83*	–0.73	–0.87*	–0.44
Asparagine	–0.68	–0.81*	–0.66	–0.70	–0.77
Lysine	–0.40	–0.70	–0.68	–0.57	–0.79
Glutamine	–0.91**	–0.81*	–0.55	–0.81*	0.16
Tyrosine	–0.41	–0.50	–0.31	–0.42	–0.64
Ammonium	–0.66	–0.33	–0.54	–0.83*	0.11
Total amino acids	–0.85*	–0.81*	–0.72	–0.86*	–0.53

Fungal colonies were grown on 3.78 mM ammonium-containing medium and transferred for 12 h to a N-free medium. Some colonies were further transferred to a 1 mM ammonium-containing medium for 3, 6, 12 or 24 h. Regressions were based upon measurements at six time intervals within a 36 h period (including T0 and –N treatment) and were calculated using MS-Excel software. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$.

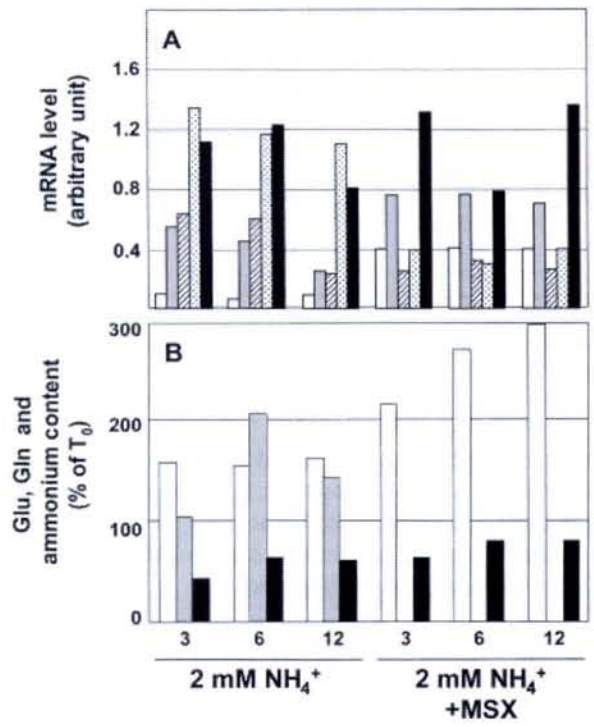


Fig. 5. Relationship between *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* mRNA levels, intracellular glutamate, glutamine and NH_4^+ contents. Fungal colonies were grown on cellophane-covered agar medium for 10 days and transferred to a N-free liquid medium for 12 h. Some colonies were further transferred to a 2 mM ammonium-containing medium with or without 1 mM MSX.

A. *AMT1* (white box), *AMT2* (grey box), *AMT3* (hatched box), *GDHA* (dotted box) and *GLNA* (black box) mRNA levels. Total RNAs were extracted from 100 mg of mycelium, and 20 μg per lane were separated on 1.5% agarose-formaldehyde gel and hybridized to the [α-^{32}P]-dCTP cDNA probes. Autoradiographs were normalized by reprobing the same Northern blots with a 5.8S rRNA probe as loading control and analysed by densitometric scanning using the Molecular Analyst computer software QUANTITY ONE (Bio-Rad). Arbitrary units correspond to the ratio (signal mRNA-background signal)/(signal 5.8S rRNA-background signal). Ratios of *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* for treatment –N (12 h) were 1.85, 1.35, 1.10, 1.24 and 1.29 respectively.

B. Intracellular NH_4^+ (white box), glutamine (grey box) and glutamate (black box) contents. Values are means ($n = 4$). Glutamine content at T0 = 3.0 nmol mg^{-1} DW; glutamate content at T0 = 28.5 nmol mg^{-1} DW; NH_4^+ content at T0 = 15.2 nmol mg^{-1} DW.

statistically significant *r*-values for *AMT1*, *AMT2* and *GDHA*, whereas no significant correlation was observed for *AMT3* or *GLNA* (Table 2).

To discriminate between the effects of different N compounds regulating nitrogen metabolism in *H. cylindrosporum*, the same experiment was performed except that 1 mM methionine sulphoximine (MSX) was added to the incubation medium containing 2 mM ammonium (Fig. 5). In these conditions, MSX, by inhibiting GS activity (Chalot *et al.*, 1995), induced an increase in the ammonium level and complete depletion of glutamine, whereas glutamate remained at a steady state (Fig. 5B). This was accompanied by six- and threefold increases in *AMT1* and *AMT2* transcript levels respectively. The *AMT3* transcript level decreased up to twofold when the fungus was incubated with MSX for 6 h (Fig. 5A). MSX had no marked effect on *GLNA* mRNA levels (Fig. 5A). The correlation coefficients calculated in these conditions revealed that *AMT1* and, to a lesser extent, *AMT2* were downregulated by glutamine but not by glutamate (Table 3). Although the *AMT1* and *AMT2* transcript levels increased under MSX treatment, a threefold decrease in methylamine uptake was observed, compared with a medium lacking MSX. However, the reduced value for methylamine uptake under MSX treatment was also associated with a reduced level of *AMT3* transcript. We may therefore suggest that, under 2 mM ammonium feeding, at least for short incubation periods, the highest contribution to ammonium uptake results from Amt3. Further, we might conclude that *AMT3* is not under the control of intracellular glutamine, as its transcript level decreased when intracellular glutamine was at undetectable levels. Alternatively, as a correlation was found (Table 3) between methylamine uptake, which decreased, and the ammonium content, which increased under MSX treatment (Fig. 5B), NH_4^+ itself, which accumulated under MSX treatment, may be responsible for downregulating NH_4^+ transport.

The *GDHA* transcript level decreased threefold when the fungus was incubated for 12 h with MSX (Fig. 5A), in which glutamine was almost undetectable and NH_4^+ high, which indicates that glutamine itself is not responsible for *GDHA* repression. In this experiment, glutamate content remained at a steady level and, therefore, it cannot act as a transcriptional repressor for *GDHA*. It was concluded that ammonium induces *GDHA* repression independently of the intracellular glutamine or glutamate concentration and, therefore, that metabolism of ammonium to glutamate or glutamine is not required to trigger nitrogen repression of *GDHA* in *H. cylindrosporum*. The steady level of glutamate observed in the presence of the GS inhibitor MSX (Fig. 5), compared with that from mycelia without MSX, indicates that glutamate is presumably being synthesized by NADP-GDH, not by glutamate synthase.

We also investigated the effect of an inorganic (NO_3^-) and an organic (glutamine) N source on the *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* transcript levels (Fig. 6). Transcript levels for *AMT1*, *AMT2* and *AMT3* remained at their highest levels on 2 mM NO_3^- (Fig. 6A), where the intracellular glutamine level was reduced to >2 nmol mg^{-1} dry weight (DW) (Fig. 6B). Transcript levels for Amts (Fig. 6A) correlated with transport activity (Fig. 6C) up to 24 h of NO_3^- supply. The significant decrease in methylamine uptake observed on NO_3^--fed mycelium after 48 h incubation (Fig. 6C) conflicted with the *AMT* transcript levels (Fig. 6A). NH_4^+ itself cannot be responsible for the down-

© 2003 Blackwell Publishing Ltd,

Table 3. Correlation coefficient (r) for the relationships between *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* transcript levels, amino acid concentrations and methylamine uptake 12 h after supplying 2 mM NH_4^+ with or without 1 mM MSX.

N compound	*AMT1*	*AMT2*	*AMT3*	*GDHA*	*GLNA*	MA uptake
Alanine	−0.07	−0.05	−0.47	−0.01	−0.46	−0.80
Aspartate	0.28	0.53	−0.26	−0.25	0.22	−0.74
Glutamate	0.13	0.38	−0.56	−0.66	−0.28	−0.58
Asparagine	−0.81*	−0.89*	0.46	0.71	−0.20	−0.20
Glutamine	−0.96**	−0.86*	0.61	0.78	−0.13	0.90**
Ammonium	0.76	0.77	−0.54	−0.83*	0.14	−0.96**
Total amino acid	−0.06	−0.23	−0.24	−0.24	−0.41	−0.15

Fungal colonies were grown on 3.78 mM ammonium-containing medium and transferred for 12 h to a N-free medium. Some colonies were further transferred to a 2 mM ammonium-containing medium for 3, 6 or 12 h with or without 1 mM MSX. Regressions were based upon measurements at five time intervals within a 24 h period (including T0 and –N treatment) and were calculated using MS-Excel software. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$.

regulation of methylamine transport, as it did not accumulate under NO_3^- treatment (Fig. 6B). This indicates that the lack of intracellular amino acids in NO_3^--fed mycelia may induce a decrease in the protein synthesis rate in general and in the Amt synthesis rate in particular.

GDH activity was at its highest level (1124 nkat g^{-1} FW) 24 h after supplying 2 mM NO_3^-, which correlates with the high *GDHA* mRNA level (Fig. 6A). GDH activity dropped to 651 nkat g^{-1} FW, whereas the *GDHA* mRNA level remained high 48 h after supplying 2 mM NO_3^-, which may confirm a general decrease in protein synthesis. Immunological studies using antibodies designed against individual Amt and GDH together with measurements of *de novo* synthesis should allow confirmation of this hypothesis.

Transcript levels for *AMT1*, *AMT2* and *AMT3* decreased strongly after 24 h feeding with 2 mM glutamine (Fig. 6A), when the intracellular glutamine level reached 7 nmol mg^{-1} DW (Fig. 6B). The decrease in methylamine uptake observed on glutamine-fed mycelium (Fig. 6C) is correlated with the decrease in *AMT* transcript levels (Fig. 6A). In the present series of experiments, this is the first observation that the *AMT3* transcript level was downregulated, which indicates that a high level of intracellular glutamine and/or ammonium is required for its downregulation. However, the fact that *AMT3* was downregulated when glutamine was provided exogenously remains intriguing. Interestingly, 24 h after supplying 2 mM glutamine, *AMT* mRNAs (Fig. 6A) and methylamine transport activity (Fig. 6C) were almost undetectable.

The rapid decrease in the *GDHA* transcript level observed 6 h after supplying 2 mM glutamine was followed by an increase until 48 h (Fig. 6A). This was correlated with the GDH activity, which decreased from 411 nkat g^{-1} FW (–N treatment) to 130 nkat g^{-1} FW (time 6 h) and increased further to 651 nkat g^{-1} FW (48 h). Although *GLNA* transcript level decreased slightly in glutamine-fed mycelium (Fig. 6A), the activity remained stable (not shown). The intracellular glutamine pool dropped 48 h after supplying 2 mM glutamine, indicating that the mycelium rapidly consumed the exogenously supplied glutamine to enter into a N-starvation state (Fig. 6B). This might explain the late increase in the *AMT1*, *AMT3* and *GDHA* transcript levels (Fig. 6A).

Discussion

Sequence and phylogenetic analysis of Amts, GS and GDH

Results indicate that *H. cylindrosporum* possesses a third member of the Amt/Mep family. The Amt1 topology, with a core of 11 TM segments (Fig. 2), has already been found for the majority of the Mep/Amt proteins (Marini and André, 2000; Thomas *et al.*, 2000). The most highly conserved regions between fungal Mep/Amt were the transmembrane helices, and one of these (helix V) included the ammonium transporter signature (PROSITE accession number PS01219) D[FYWS]AG[GSC]{2}[IV]{3}[SAG]{2}{2}[SAG][LIVMF]{3}[LIVMFYWA]{2}[GK]R{2}. The sequences differed mainly at their C-termini and extracellular loops, except in the loop between TM VI and VII, which is highly conserved. The motif 239-[FNGGS]-243 between TM VI and VII (Fig. 2) was conserved in all Basidiomycetes and Ascomycetes except for *A. nidulans*, *S. pombe* and *S. cerevisiae*. The residues D182 (between TM IV and V) and N240 (between TM VI and VII) (Fig. 2) are highly conserved in bacteria, *S. cerevisiae* and plants. An aspartic acid residue has been implicated in binding ammonium ions in *Escherichia coli* GS (Alibhai and Villafranca, 1994; Liaw *et al.*, 1995). By extension, Thomas *et al.* (2000) suggested that residue D182 is a potential candidate for an initial ammonium binding site within the AmtB protein. This might be aided by the formation of a binding pocket by the highly polar conserved N residue at a similar position (240) on the periplasmic face of helix VI (Fig. 2). The sequence 138-GAIAERGR-145 (Fig. 2) is highly conserved among Amt1, Amt2 and Amt3 and displays similarity to the motif G-[X](3)-[DE]-

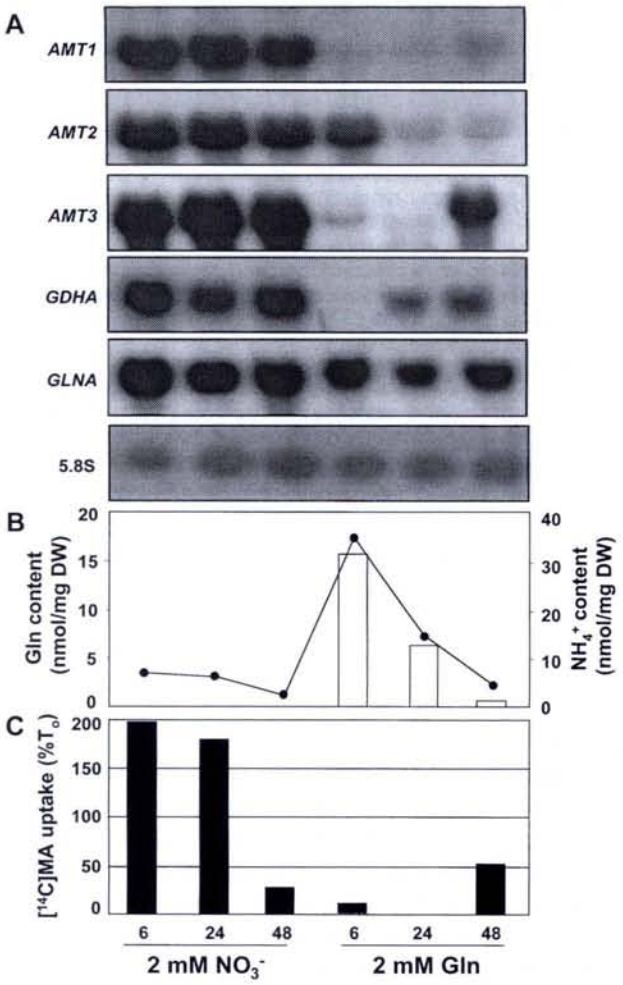
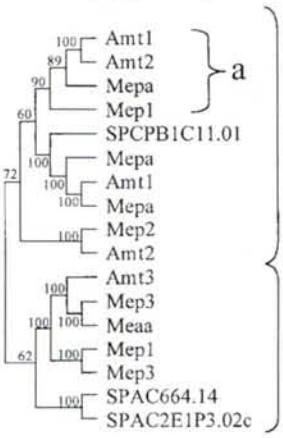


Fig. 6. Relationship between *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* mRNA levels, intracellular glutamine and NH_4^+ contents and methylamine uptake. Fungal colonies were grown on cellophane-covered agar medium for 10 days and transferred to a N-free liquid medium for 12 h. Some colonies were further transferred to a 2 mM NO_3^- or 2 mM glutamine-containing medium.
A. Northern analysis of *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* transcripts. Total RNAs were extracted and hybridized as described in the legend to Fig. 4. Northern analysis for T0 and –N (12 h) treatments is similar to those from Fig. 4.
B. Intracellular glutamine (white box) and NH_4^+ contents (line). Values are means ($n = 4$). Glutamine content at T0 = 3.0 nmol mg^{-1} DW; NH_4^+ content at T0 = 15.2 nmol mg^{-1} DW.
C. [^{14}C]-methylamine uptake in standard assay conditions. Values are means ($n = 6$). [^{14}C]-methylamine uptake at T0 = 46.9 c.p.m. mg^{-1} DW.

[RK]-X-G-[R/K]-[R/K]. This motif is duplicated and located in the cytoplasmic loops 2 and 4 of membrane proteins belonging to the major facilitator superfamily (MFS), which includes the lactose permease of *E. coli* (Jessen-Marshall *et al.*, 1995; Cain *et al.*, 2000). Detailed studies of this motif in LacY permease from *E. coli* suggest that the basic residues in this conserved motif play a role in protein insertion and/or stability, and that the negative charge plays a role in conformational changes (Pazdernik *et al.*, 2000). Based on these studies, further mutational analysis was done in the MeaA ammonium transporter from *A. nidulans*, which contains this motif in position 161-GAVAERGR-168 (Monahan *et al.*, 2002a,b). The authors suggested that this motif may be important for the translocation of ammonium across the membrane, as may the conserved P186 residue (P163 in Amt1; Fig. 2) (Monahan *et al.*, 2002b). The residue G424 in the intracellular C-tail (Fig. 2) is highly conserved in the Mep/Amt family. A G413 to D413 substitution within the intracellular C-tail of the Mep1 in *S. cerevisiae* and the resulting mutant protein *trans*-inhibits Mep3, suggesting that Mep1 and Mep3 permeases may form heterocomplexes similar to the Rh proteins (Marini *et al.*, 2000a,b). Based on this result, the mutation G447 to A was introduced in the MeaA of *A. nidulans*. This mutant protein was found to *trans*-inhibit the activity of endogenous MeaA and the other *A. nidulans* ammonium transporter, MepA (Monahan *et al.*, 2002b). The authors suggested that this heterointeraction may serve to modulate the transport activity of Mep/Amt transporters. It is notable that the C-terminal region of the *E. coli* AmtB could potentially constitute an interaction site with the regulatory PII protein GlnK (Coutts *et al.*, 2002). In agreement with its proposed topology, Amt1 contained a putative N-glycosylation site in the N extension of protein at residue N3 (Fig. 2). A glycosylation site was identified at residue N4 of the *S. cerevisiae* Mep2, demonstrating that the N-terminus of this protein has an extracytosolic location (Marini and André, 2000).

As deduced from the phylogenetic analysis (Fig. 7), two main subclasses are discernible in the fungal Mep/Amt cluster. Interestingly, HcAmt1, HcAmt2, ScMep2, UmMep1 and CaAmt2 belong to subclass I corresponding to the high-affinity ammonium transporter and sensor family (TC 2.A.49.3.2), whereas HcAmt3, ScMep1 and ScMep3 belong to subclass II, corresponding to the low-affinity ammonium transporter family (TC 2.A.49.3.1) (Fig. 7), according to the TC classification (Saier, 2000; available at http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/). The close phylogenetic relationship between Amt1 and Amt2, which have a higher affinity than Amt3, contrasts with the dichotomy found in *S. cerevisiae*, in which only one of the three Meps belongs to the high-affinity ammonium transporter and sensor family. Interestingly, group Ia (Fig. 7) includes homologous sequences isolated from Basidiomycetes, which have in common a putative glycosylation site at residue N3. *S. cerevisiae* Mep2 is N4 glycosylated at a single site, and the mutation N4Q causes only a slight reduction in the affinity for its substrate. However, it was proposed that glycosylation might confer a specific function to the Mep2 protein (Marini and André, 2000).

The phylogenetic analysis reveals that GDH sequences



Proteins/ORF		Organism	Accession n°	aa	MW	ID	Ngs
Amt1	a	*H. cylindrosporum*	AY094982	477	50.9	43.8	N3
Amt2	a	*H. cylindrosporum*	AAK82416	471	50.3	40.5	N3
Mepa	a	*M. violaceum*	AAD40955	493	53.5	40.4	N3
Mep1	a	*U. maydis*	AAL08424	528	57.0	40.0	N3
SPCPB1C11.01	I	*S. pombe*	CAC36934	497	53.4	44.1	no
Mepa	I	*N. crassa*	CAD21326.1	481	51.3	45.9	N9
Amt1	I	*T. borchii*	AAL11032	483	51.9	45.7	N16
Mepa	I	*A. nidulans*	AAL3118	478	51.1	46.0	N9
Mep2	I	*S. cerevisiae*	P41948	499	53.4	**100**	N4
Amt2	I	*C. albicans*	Contig 6.2476	480	51.9	59.6	N4
Amt3	I	*H. cylindrosporum*	AAK82417	492	52.4	36.3	no
Mep3	I	*N. crassa*	Contig 3.17	510	55.9	39.5	N13
Meaa	I	*A. nidulans*	AAL73117	544	59.2	39.0	N17
Mep1	II	*S. cerevisiae*	P40260	492	54.2	37.2	no
Mep3	II	*S. cerevisiae*	P53390	489	53.7	36.0	no
SPAC664.14	II	*S. pombe*	CAB65815	512	55.6	41.9	no
SPAC2E1P3.02c	II	*S. pombe*	CAB83006	517	51.0	33.7	N14

Fig. 7. Phylogenetic relationships among fungal Mep/Amt transporters. Complete amino acid sequences were aligned with CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), and the trees were constructed by the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) using MEGA 2.1. The p-distance was estimated between all pairs of sequences using the pairwise deletion option. Numbers on branches indicate the bootstrap estimated from 500 replicates (as a percentage). Nodes with bootstrap values below 50% were collapsed to a polytomy to indicate the lack of resolution. Protein name or open reading frame (ORF), organism, GenBank accession number, sequence length (aa) and molecular weight (MW) are indicated. Sequence identity (ID) using *S. cerevisiae* Mep2 sequence as a reference (100%) and the position of a NH_2 terminal putative glycosylation site (Ngs) are indicated. *A. nidulans*, *Aspergillus nidulans*; *C. albicans*, *Candida albicans*; *M. violaceum*, *Microbotryum violaceum*; *N. crassa*, *Neurospora crassa*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe*; *T. borchii*, *Tuber borchii*. *U. maydis*, *Ustilago maydis*.

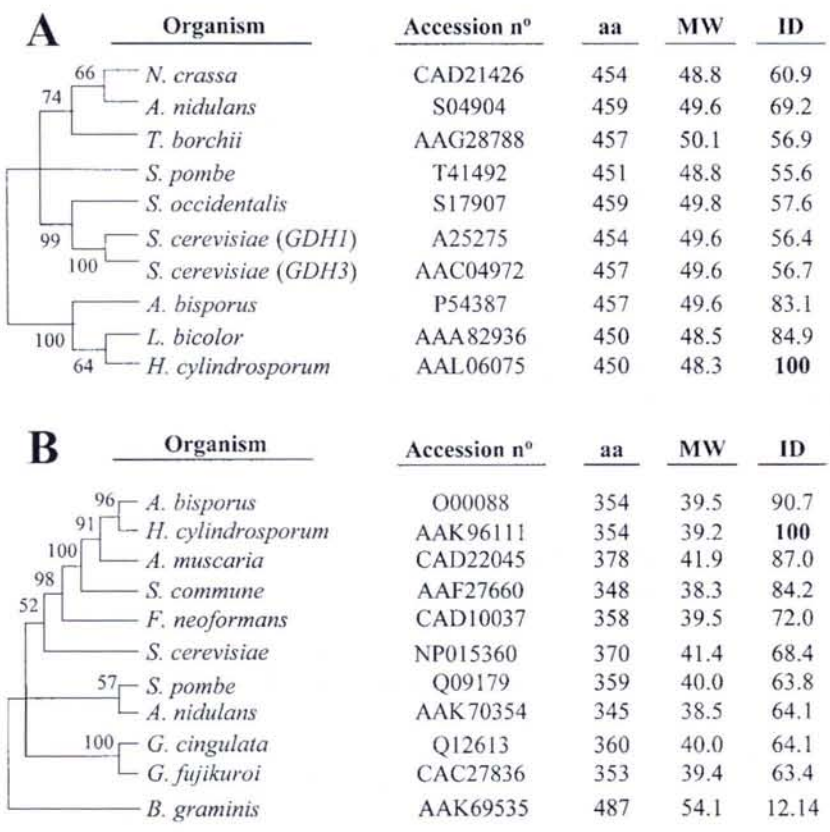
clustered according to their phylogenies (Fig. 8A). *S. cerevisiae* is the only fungus described so far for which NADP-GDH activity is encoded by two genes, namely *GDH1* and *GDH3* (Fig. 8A) (Avendaño *et al.*, 1997). Analysis of relative levels of these proteins revealed that their expression is differentially regulated and depends on the nature of the carbon source. Moreover, the physiological study of mutants lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3* suggested that these genes play non-redundant physiological roles. These data indicate that the co-ordinated regulation of *GDH1*- and *GDH3*-encoded enzymes results in glutamate biosynthesis and balanced utilization of α-ketoglutarate under fermentative and respiratory conditions (DeLuna *et al.*, 2001). The phylogenetic analysis reveals that GS sequences also clustered according to their phylogenies, except for the *S. cerevisiae* GS (Fig. 8B). The complete genome sequencing of *S. cerevisiae* revealed that GS is encoded by a unique gene and, to our knowledge, the situation is similar in other fungi shown in Fig. 8B. GS is the unique pathway for providing the cells with glutamine, and mutational analysis currently being carried out in our laboratory should confirm this fact in *H. cylindrosporum*.

Functions of Amts

Kinetic analysis and the very low K_i values found for Amt1 (Table 1) indicate that Amt1 is a very high-affinity ammonium transporter. Feeding tests indicate that Amt1 could play a role in ammonium retention, as already demonstrated for *S. cerevisiae* Mep1, Mep2 and *H. cylindrosporum* Amt2 and Amt3 (Marini *et al.*, 1997; Javelle *et al.*, 2001).

In addition to these functions, this is the first evidence that heterologous members of the Mep/Amt family complement the dimorphic change defect. It is worthwhile noting that only the two *H. cylindrosporum* Amts, which belong to subclass I 'high ammonium affinity transporters and sensor' (Fig. 7), complement the pseudohyphal growth defect of the ZAM6 mutant (Fig. 3). It has been hypothesized that Mep2 from *S. cerevisiae* can act as a nitrogen sensor in the transduction pathway of pseudohyphal differentiation in contrast to Mep1 and Mep3. Mep2 may act in a signalling pathway upstream of Gpa2, Ras2 and cAMP by direct interaction with other downstream effectors, independently of the MAP kinase cascade (Lorenz and Heitman, 1998). The authors have constructed a series of Mep1–Mep2 hybrids and expressed these proteins under the Mep2 promoter in the *mep1Δmep2Δmep3Δ* homozygous diploid to check the ability of these hybrids to complement the pseudohyphal growth defect of this strain. They concluded that the first intracellular loop plus the adjacent membrane-spanning segment (K59-E146) is sufficient, but not strictly necessary, for the signalling function of Mep2 (Lorenz and Heitman, 1998).

However, the authors have based their work on a topology of 10 predicted TM domains for Mep2, with intracellular N- and C-tails. More recent work has revealed an extracytosolic N-terminus for *S. cerevisiae* Mep2, thus establishing that it consists of a central hydrophobic core made of 11 TM (Marini and André, 2000). Thomas *et al.* (2000) further confirmed that the majority of the Mep/Amt



A

Organism	Accession n°	aa	MW	ID
N. crassa	CAD21426	454	48.8	60.9
A. nidulans	S04904	459	49.6	69.2
T. borchii	AAG28788	457	50.1	56.9
S. pombe	T41492	451	48.8	55.6
S. occidentalis	S17907	459	49.8	57.6
S. cerevisiae (GDH1)	A25275	454	49.6	56.4
S. cerevisiae (GDH3)	AAC04972	457	49.6	56.7
A. bisporus	P54387	457	49.6	83.1
L. bicolor	AAA82936	450	48.5	84.9
H. cylindrosporum	AAL06075	450	48.3	**100**

B

Organism	Accession n°	aa	MW	ID
A. bisporus	O00088	354	39.5	90.7
H. cylindrosporum	AAK96111	354	39.2	**100**
A. muscaria	CAD22045	378	41.9	87.0
S. commune	AAF27660	348	38.3	84.2
F. neoformans	CAD10037	358	39.5	72.0
S. cerevisiae	NP015360	370	41.4	68.4
S. pombe	Q09179	359	40.0	63.8
A. nidulans	AAK70354	345	38.5	64.1
G. cingulata	Q12613	360	40.0	64.1
G. fujikuroi	CAC27836	353	39.4	63.4
B. graminis	AAK69535	487	54.1	12.14

Fig. 8. Phylogenetic relationships among fungal GDH and GS. Complete amino acid sequences were aligned as described in the legend to Fig. 7. Organism, GenBank accession number, sequence length (aa) and molecular weight (MW) are indicated.
A. NADP-dependent glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4). Sequence identity (ID) is indicated using *H. cylindrosporum* GDH sequence as a reference (100%).
B. Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2). Sequence identity (ID) is indicated using *H. cylindrosporum* GS sequence as a reference (100%). *A. bisporus, Agaricus bisporus*; *A. muscaria, Amanita muscaria*; *A. nidulans, Aspergillus nidulans*; *B. graminis, Blumeria graminis*; *F. neoformans, Filobasidiella neoformans*; *G. fujikuroi, Gibberella fujikuroi, G. cingulata, Glomerella cingulata*; *L. bicolor, Laccaria bicolor*; *N. crassa, Neurospora crassa*; *S. cerevisiae, Saccharomyces cerevisiae*; *S. pombe, Schizosaccharomyces pombe*; *S. commune, Schizophyllum commune*; *S. occidentalis, Schwanniomyces occidentalis*; *T. borchii, Tuber borchii*.

proteins contain 11 membrane-spanning helices, with the N-terminal on the exterior face and the C-terminus on the interior face of the membrane. Based on this topology, the Mep2 segment K59-E146 (87 amino acids) rather corresponds to the first extracellular loop, flanked by TM2 and TM3 segments (Fig. 9). Therefore, a direct interaction between this Mep2 region and the downstream cytoplasmic effectors is highly improbable.

Based on data generated by the TMHMM algorithm, the topologies we proposed for the three Amts from *H. cylindrosporum* are in agreement with a core of 11 TM segments (Fig. 2). In order to determine whether the first intracellular loop of Amt1, Amt2 or Mep2 (Table 4, Fig. 9), as imposed by the 11-TM topology, could be involved in the signalling function, we performed the sequence alignment of segment M1-E146 of Mep2 with the corresponding regions of the three Amts. The sequence of the first intracellular loop is highly conserved among the four proteins, and no residue could be assigned to the sensing function of Amt1, Amt2 or Mep2 (Fig. 9). We conclude that the first intracellular loop is unlikely to participate in the sensing function and that other regions are necessary.

A duplication event in *H. cylindrosporum*, which led to segregation between the Amt1/2 and Amt3 proteins, predated a recent duplication event between Amt1 and Amt2, which may be deduced from their close phylogenetic rela-

Table 4. First intracellular loop boundaries[a] for Amt1, Amt2, Amt3 and Mep2 predicted by seven algorithms.

Algorithm	Amt1	Amt2	Amt3	Mep2	References
TMPRED	55–59	55–59	38–45	57–62	Hofmann and Stoffel (1992)
TOPPRED	**50**–58	**49–63**	**34**–41	**53**–61	von Heijne (1992)
TMHMM	54–59	52–57	38–43	57–62	Sonnhammer *et al.* (1998)
PRED-TMR2	**50**–58	51–61	35–41	54–**64**	Pasquier and Hamodrakas (1999)
HMMTOP	54–**63**	53–60	38–**45**	57–**64**	Tusnády and Simon (2001)
SOSUI	53–60	51–62	36–44	55–63	Hirokawa *et al.* (1998)
TMAP	52–56	52–56	37–41	56–60	Persson and Argos (1994)
Range	**50–63**	**49–63**	**34–45**	**53–64**	

a. The numbers represent the amino acid position.
Boundaries chosen (range) for the topology model (Fig. 9) are shown in bold.

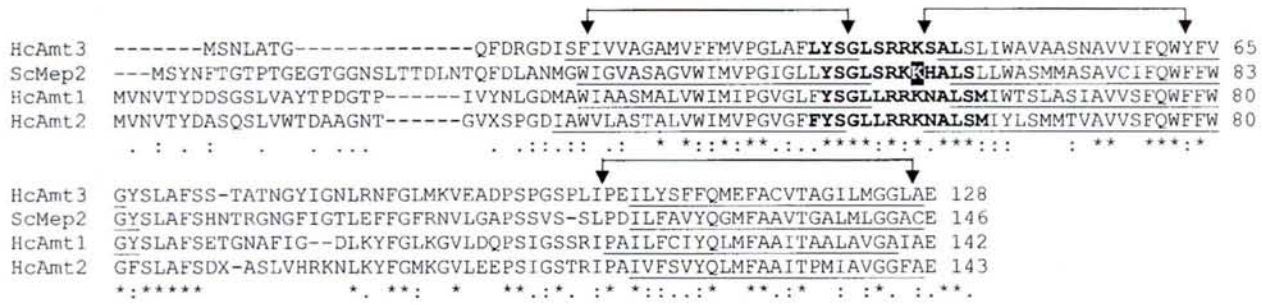


Fig. 9. Sequence alignment of the first 146 amino acid residues of Mep2 and the corresponding segment of Amt1, Amt2 and Amt3. Amino acid sequences were aligned with CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). The transmembrane (TM) segments predicted by (i) the TMHMM algorithm (Sonnhammer *et al.*, 1998) are underlined and (ii) the TMAP algorithm (Persson and Argos, 1994) on the alignment are marked by arrows. Amino acid residues of the first intracellular loops, predicted by seven different algorithms (Table 4), are in bold. The residue K59 from Mep2 is in white in a black box.

tionship. This segregation may explain the fact that Amt1 and Amt2 complement the pseudohyphal growth defect of the ZAM6 strain, whereas Amt3 was unable to do so. Whether Amt1 and/or Amt2 can function as sensors in *H. cylindrosporum* is not known, but a hypothesis has recently being drawn up (Javelle *et al.*, 2003).

Many members of the fungal kingdom have been shown to be able to switch between two morphological forms, a cellular *S. cerevisiae* and a multicellular invasive filamentous form, when grown on a nitrogen-poor medium (Gimeno *et al.*, 1992; Madhani and Fink, 1998). The ability to undergo this dimorphic transition is thought to be necessary in a range of human and plant fungal pathogens. Filamentous defect strains of the human pathogen *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* or of the plant pathogen *Ustilago maydis* are avirulent (Medoff *et al.*, 1986; Banuett, 1991; Lo *et al.*, 1997). No receptors of environmental signals have been identified specifically in *C. albicans* or *U. maydis*, although nutrient starvation is one of the conditions inducing filamentous growth in these fungi. Genome sequencing efforts have identified Mep homologues in *C. albicans* (Amt2) and *U. maydis* (MepA), but no data about their function are available yet. Whether the high-affinity ammonium transporters from *H. cylindrosporum* can act as sensors awaits further research.

Regulation of Amts, GDH and GS

The expression of *AMT1* and *AMT2* only in ammonium-limiting conditions (Fig. 4) is consistent with a role for the high-affinity ammonium transporter in scavenging low concentrations of ammonium, whereas the low-affinity ammonium transporter Amt3 (Table 1) would be required for growth in ammonium-sufficient conditions. Similar conclusions were drawn for MepA and MeaA of *A. nidulans* (Monahan *et al.*, 2002a). The control of *AMT1* and *AMT2* mRNA levels by glutamine, which was deduced from experiments with MSX (Fig. 5) and with glutamine as sole nitrogen source (Fig. 6), is similar to that observed in *S. cerevisiae* (Roon *et al.*, 1974; Slaughter *et al.*, 1990). More recently, it has been established that high intracellular glutamine repressed *AMT1* in *Arabidopsis thaliana* (Rawat *et al.*, 1999). The control of *AMT1* and *AMT2* mRNA levels by the intracellular level of glutamine in *H. cylindrosporum* certainly requires complex regulatory mechanisms similar to those observed in other fungi. In *S. cerevisiae*, nitrogen catabolic repression (NCR) is the mechanism designed to prevent or reduce the unnecessary diversion of the cell's synthetic capacity to the formation of enzymes and permeases for the utilization of compounds that are non-preferred N sources when a preferred N source is available (Magasanik and Kaiser, 2002). For instance, the expression of nitrogen-regulated genes requires their activation by one or two of the positive GATA transcription factors, Gln3 (Mitchell and Magasanik, 1984) and Nil1 (Gat1) (Stanbrough *et al.*, 1995; Coffman *et al.*, 1996). The GATA proteins are conserved among eukaryotes and share a highly conserved DNA-binding domain that promotes recognition of 5′-GAT(A/T)A-3′ core sequences (for a review, see Marzluf, 1997). Several GATA-like factors were isolated in other fungi: Nit2 in *N. crassa* (Fu and Marzluf, 1987), AreA in *A. nidulans* (Kudla *et al.*, 1990), Nre in *P. chrysogenum* (Haas *et al.*, 1995) and Nut1 in *Magnaporthe grisea* (Froeliger and Carpenter, 1996). Experiments in our laboratory are currently focusing on the isolation of these transcription factors in *H. cylindrosporum*.

Gln3 in *S. cerevisiae* is constitutive and present in the cytoplasm in a phosphorylated form, associated with Ure2. The dephosphorylation of phosphorylated Gln3 appears to be essential for its translocation from the cytoplasm to the nucleus, as the agent responsible for this translocation through the nuclear pore, the karyopherin

Srp1, is capable of binding non-phosphorylated Gln3 (Carvalho *et al.*, 2001). The cytosolic glutamine appears to be the agent responsible for the ability of Ure2 to bind phosphorylated Gln3. According to this view, a fall in cytosolic glutamine decreases the affinity of Ure2 for Gln3 (Coschigano and Magasanik, 1991) and results in the conformational change in the Gln3–Ure2 complex, which leads to the release of the phosphorylated Gln3. Gln3 is further dephosphorylated in the cytoplasm allowing its binding to Srp1 and its translocation to the nucleus. In contrast to *GLN3*, which is expressed constitutively regardless of the nitrogen source, *NIL1* gene is subjected to nitrogen regulation and requires Gln3 or Nil1 for its expression (Coffman *et al.*, 1996; Rowen *et al.*, 1997). The signal blocking activation of gene expression by Nil1 is an increase in the cytosolic concentration of glutamate. In conclusion, the role of transcription factor Gln3 is the activation of gene expression in response to a deficiency of glutamine, and the role of Nil1 is the activation of gene expression in response to a deficiency of glutamate (Coffman *et al.*, 1996; Stanbrough and Magasanik, 1996). In *S. cerevisiae*, *MEP1*, *MEP2* and *MEP3* promoter regions contain several 5′-GAT(A/T)A-3′ core sequences. Gln3 and Nil1 can promote high-level expression of *MEP2*, but the contribution of each factor depends on nitrogen sources available. In the case of *MEP1* and *MEP3*, Gln3 appears to be the main activator, but a Nil1-dependent mechanism maintains expression of both genes at a relatively low level (Marini *et al.*, 1997).

Similarly, it was found that extracellular glutamine and/or asparagine repressed NH_4^+ uptake in *A. nidulans* (Pateman *et al.*, 1974), *Stemphylium botryosum* (Breiman and Barash, 1980) and *P. chrysogenum* (Hackette *et al.*, 1970), whereas this was not the case in *A. bisporus* (Kersten *et al.*, 1999) and *P. involutus* (Javelle *et al.*, 1999). In addition, we deduced from experiments in which *H. cylindrosporum* was incubated with MSX that ammonium influx is inhibited by intracellular ammonium, which agrees with other findings from *A. bisporus* (Kersten *et al.*, 1999) and *A. thaliana* (Rawat *et al.*, 1999). The ability of Mep/Amt to act as ammonium transporters has been challenged, and it has been hypothesized that Mep protein mediates diffusion of the uncharged species NH_3 across the cytoplasmic membrane by acidic trapping in the vacuole (Soupene *et al.*, 2001; 2002). According to this view, an accumulation of NH_3 would neutralize the vacuole and/or other acidic compartments, and this would contribute to a decrease in NH_3 absorption rate. However, recent electrophysiological studies have demonstrated that one member of the Mep/Amt family mediates potential-driven uptake and retrieval of the charged form (Ludewig *et al.*, 2002).

Northern analysis suggests that the *H. cylindrosporum GDHA* gene, which encodes a NADP-GDH, is repressed upon the addition of ammonium to the culture (Fig. 4A). Similar results were found for *A. bisporus* (Schaap *et al.*, 1996) and *Aspergillus awamori* (Cardoza *et al.*, 1998). The *GDHA* transcript level was inversely correlated with NH_4^+ content, indicating that *GDHA* transcription is controlled by intracellular NH_4^+ (Table 3). The situation is more complex in *S. cerevisiae*, in which two NADP-GDH isoforms are encoded by *GDH1* and *GDH3* genes (Moye *et al.*, 1985; Avendaño *et al.*, 1997). Expression of *GDH1* was decreased with increasing residual ammonium concentration in the growth medium (ter Schure *et al.*, 1995). The *GDH1* promoter contains several GATAA sequences, and it has been demonstrated that their transcription is Gln3 dependent (Daugherty *et al.*, 1993). However, metabolism of ammonium to glutamine is not required to trigger the NCR, ammonium causing the repression of *GDH1* independently of its conversion to glutamine (ter Schure *et al.*, 1998), which agrees with the present findings. Not much is known about the regulation of *GDH3* in response to nitrogen source. Similarly, N starvation induced a depletion in the intracellular glutamine and ammonium in *L. bicolor*, which correlates with an increase in GDH polypeptide levels (Lorillou *et al.*, 1996). The decrease in *GDHA* transcript level in glutamine-fed mycelium (Fig. 6A), which correlated with a decrease in the GDH activity, was similar to that observed in *A. bisporus* (Kersten *et al.*, 1997). In *A. nidulans*, it has been established that glutamine is the key effector of nitrogen metabolite repression; additionally, ammonium and its immediate product glutamate may also act directly to signal nitrogen sufficiency (Margelis *et al.*, 2001). In *H. cylindrosporum*, ammonium induces *GDHA* repression independently of the intracellular glutamine or glutamate concentration and, therefore, metabolism of ammonium to glutamate or glutamine is not required to trigger nitrogen repression of *GDHA*.

After transfer of *H. cylindrosporum* from a N-starved condition, exogenously supplied nitrate failed to induce a downregulation of the *AMT1*, *AMT2* and *GDHA* mRNA levels, as observed on ammonium or glutamine. Although *H. cylindrosporum* is able to use NO_3^- as a sole nitrogen source (Jargeat *et al.*, 2000; Plassard *et al.*, 2000), it takes up NO_3^- at a 10-fold lower rate than NH_4^+ (Plassard *et al.*, 1991). Interestingly, the *NAR1* gene from *H. cylindrosporum*, which codes for a functional nitrate reductase, was repressed by ammonium, but its transcript remained at a high level on low N concentration or on high nitrate concentration (Jargeat *et al.*, 2000). Similarly, the *NRT2* gene, which codes for a nitrate transporter (R. Marmeisse, unpublished results), was highly expressed under N deficiency or nitrate feeding, whereas exogenously supplied ammonium downregulated *NRT2* mRNA (A. Javelle, unpublished results). However, whether nitrate was poorly taken up by the mycelia or whether the protein product

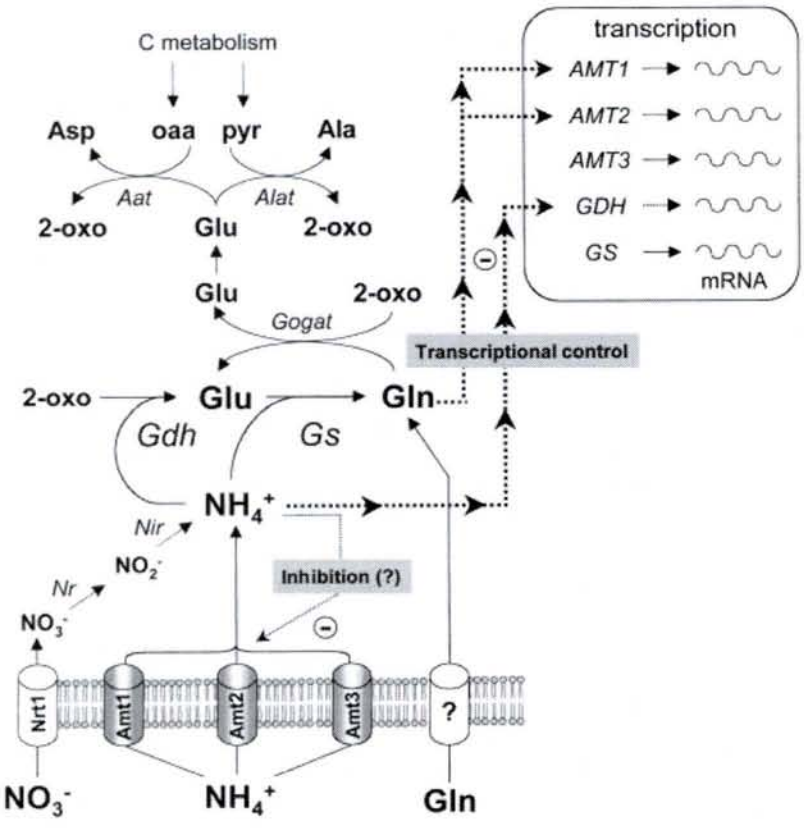


Fig. 10. A model describing the regulation of NH_4^+ transport and assimilation in *H. cylindrosporum*. Under low ammonium status, *AMT1*, *AMT2*, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* are transcribed, which results in elevated ammonium uptake and metabolism capacities. Under ammonium excess, *AMT1*, *AMT2* and *GDHA* are efficiently repressed, which results in reduced ammonium assimilatory capacities. Under these conditions, *AMT3* and *GLNA* would ensure the maintenance of a basal level of ammonium assimilation. *AMT1* and *AMT2* transcript levels are controlled through the effect of intracellular glutamine, whereas the *GDHA* mRNA level is controlled by ammonium (bold dotted lines). Ammonium uptake activity may be controlled by intracellular NH_4^+ through direct effect (dotted lines). 2-oxo, 2-oxoglutarate; oaa, oxaloacetate acid; pyr, pyruvate; GOGAT, glutamate synthase; Aat, aspartate aminotransferase; Alat, alanine aminotransferase; NR, nitrate reductase; NiR, nitrite reductase; Nrt2, nitrate transporter.

of NAR1 is rate limiting in the utilization of NO_3^-, as suggested by Jargeat *et al.* (2000), awaits further experiments.

In contrast, the *H. cylindrosporum GLNA* gene is highly expressed but not highly regulated (Fig. 4A). Similarly, in *A. nidulans*, the *GLNA* gene was not highly regulated (Margelis *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae*, *GLN1* transcription is controlled by three regulatory systems (ter Schure *et al.*, 2000). One system responds exclusively to glutamine level and depends on the positively acting Gln3 product (Minehart and Magasanik, 1992; ter Schure *et al.*, 1998). Regulation of GS from *A. bisporus* occurs by repression of enzyme synthesis (Kersten *et al.*, 1997), and ammonium has been proposed to act as a direct effector at the molecular level (Baars *et al.*, 1995). However, it remains to be established whether such control exists in *H. cylindrosporum*.

A model summarizing the main findings of the current experiments is provided in Fig. 10. *H. cylindrosporum* is able to use different nitrogen sources such as NH_4^+, NO_3^- or glutamine. In addition to ammonium-assimilating genes characterized in the present paper, the genes encoding a nitrate transporter (*NRT2*), a nitrate reductase (*NAR1*) and a nitrite reductase (*NIR1*) have been cloned (Jargeat *et al.*, 2000; R. Marmeisse, personal communication) (Fig. 10). HcAap1, a general amino acid permease, was recently isolated from *H. cylindrosporum* by functional complementation of an *S. cerevisiae* strain deficient in amino acid transporters (Wipf *et al.*, 2002). In response to a good nitrogen source such as ammonium (Fig. 4A) or glutamine (Fig. 6A), *AMT1*, *AMT2* and *GDHA* transcription is repressed and, therefore, these genes are submitted to nitrogen repression in *H. cylindrosporum*. Our results demonstrated that glutamine is the main effector for the repression of *AMT1* and *AMT2*, whereas the repression for *GDHA* is controlled by intracellular ammonium, independently of the intracellular glutamine or glutamate concentration. Ammonium transport activity may be controlled by intracellular NH_4^+ through a direct (e.g. allosteric or post-translational) effect (Fig. 10). *AMT3* and *GLNA* are highly expressed but not highly regulated. Some data suggest that external hyphae can be considered as the ammonium-absorbing structure of ectomycorrhizal roots (Javelle *et al.*, 1999; Jentschke *et al.*, 2001). The present results confirmed that the extraradical mycelium is able to take up and rapidly metabolize ammonium ions. Our data also demonstrate that *H. cylindrosporum* possesses sensing and regulatory mechanisms, which allow fungal cells to adapt rapidly to changing environmental conditions. Under low ammonium status, *AMT1*,

AMT2, *AMT3*, *GDHA* and *GLNA* are transcribed, which results in elevated ammonium uptake and metabolism capacities. Under ammonium excess, *AMT1*, *AMT2* and *GDHA* are efficiently repressed, either by ammonium itself or by its assimilation product glutamine, which results in reduced ammonium assimilatory capacities. Under these conditions, *AMT3* and *GLNA* would ensure the maintenance of a basal level of ammonium assimilation. As pointed out by ter Schure *et al.* (1998), the specific repression of gene expression by ammonium implies a sensing mechanism for ammonium concentration. Putative N sensors have been identified in *S. cerevisiae* (Lorenz and Heitman, 1998) and, as hypothesized above, Amt1 from *H. cylindrosporum* might be involved in a sensing pathway. However, the N sensing and regulatory mechanisms involved in *H. cylindrosporum* remain to be established.

Experimental procedures

Organisms and culture media

The *H. cylindrosporum* monokaryotic strain (h1) was obtained from the *in vitro* fruiting dikaryon HC1 (Debaud and Gay, 1987). It was grown on cellophane-covered agar medium (pH 5.5) containing (mg l^{-1}): $CaCl_2$ (50), $MgSO_4$ (150), KH_2PO_4 (250), NaH_2PO_4 (4.5), Na_2HPO_4 (160) $(NH_4)_2SO_4$ 250 and thiamine hydrochloride (0.04). Carbon was supplied as 2.5 g l^{-1} glucose. The *E. coli* strains used were DH5α and JM109. Classical procedures for manipulating *E. coli* cells and DNA were essentially based on the methods of Sambrook *et al.* (1989).

The *S. cerevisiae* strains used in this study were all isogenic with the wild-type Σ1278b Matα (Béchet *et al.*, 1970) except for the mutations mentioned. Cells were grown in a minimal buffered (pH 6.1) medium with 3% glucose (Jacobs *et al.*, 1980). Nitrogen sources used were proline (0.1%), arginine (0.1%) and $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM unless other concentrations are specified. Pseudohyphal growth tests were performed as described previously (Gimeno *et al.*, 1992). Transformants were tested in YNB-N medium (yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate) containing 100 μM NH_4^+ and grown for 10 days at 29°C.

Nutrient shift protocol

Fungal colonies were grown on cellophane-covered agar medium containing 3.78 mM ammonium as sole N source for 10 days (T0 treatment) and transferred to a N-free liquid medium for 12 h (–N treatment). Based on our previous work on *AMT2* and *AMT3* (Javelle *et al.*, 2001), a N starvation time of 12 h was also applied to *AMT1*, *GDHA* and *GLNA*. Some colonies were also transferred to a liquid medium containing various nitrogen sources, as detailed in the figure legends. The composition and the pH (5.5) of the liquid medium were exactly the same of that of the solid medium (as explained above) except for the agar. A control shift performed from solid medium to the same liquid medium indicated that mRNA remained at the same (low) level of expression. When needed, MSX was added simultaneously to the medium together with ammonium sulphate.

Cloning of the AMT1 *gene*

The *S. cerevisiae* strain 31019b (*mep1Δ mep2Δ mep3Δ ura3*; Marini *et al.*, 1997) was transformed with an *H. cylindrosporum* expression library in the *S. cerevisiae* expression vector pFL61, according to the methods of Ito *et al.* (1983). The expression library was constructed by Dr F. Gaymard (INRA Montpellier) and supplied by R. Lambilliotte (INRA Montpellier). Transformants were selected on a minimal medium without uracil supplemented with 1 mM NH_4^+ as sole nitrogen source. DNA was isolated from these transformants and used to transfom *E. coli* strain JM109. Plasmid DNA was isolated and reintroduced into the *S. cerevisiae* strain 31019b to demonstrate that the ability to grow was dependent on the presence of the *H. cylindrosporum* cDNA. The resulting cDNA, *AMT1*, was subcloned further into pGEM-T Easy vector (Promega), sequenced and the sequence submitted to the GenBank nucleotide database under accession number AY094982. *AMT1* was subcloned into *Not*I-linearized vector pDR195 for functional expression in *S. cerevisiae*, as described previously (Javelle *et al.*, 2001).

Cloning of the GLNA *gene*

A consensus sequence cDNA was generated by aligning published sequences from *A. bisporus*, *S. cerevisiae*, *Schizophyllum commune* and *S. pombe*. Two degenerated primers were designed from highly conserved regions: primer 1 (5′-GGIATHGARCARGARTAYAC-3′) and primer 2 (5′-CCAIA RITGTCICCCAT-3′) (I = inosine, H = A, C or T, R = A or G, Y = C or T). Polymerase chain reaction (PCR) was performed on first-strand cDNA synthesized from 1 μg of total RNA (Qiagen) from *H. cylindrosporum* using the SuperScript II reverse transcriptase (Gibco BRL), an RNase H^- derivative of Moloney murine leukaemia virus, according to the manufacturer's protocol. A 270 bp fragment with 70% homology to the *A. bisporus* protein was obtained and used to design the following primers: HcGS1 (5′-GGT-GCT-GGT-ACC-GGC-AAG-GTC-TTC-G-3′) and HcGS2 (5′-ATA-CCC-TCA-CAA-GGG-CCG-ACT-TGG-AAC-3′) used to perform 5′ and 3′ random amplification of cDNA ends (RACE) reactions, respectively, using the SMART RACE cDNA kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. The resulting full-length cDNA *GLNA* was cloned into pGEM-T Easy vector (Promega), sequenced and submitted to the GenBank nucleotide database under accession number AAK96111.

Cloning of the GDHA *gene*

A BLAST search has been used to identify the potential coding sequence from a partial genomic fragment (a gift from Dr R. Marmeisse, Université Claude Bernard, Lyon, France) of *H. cylindrosporum GDHA*. The homologous primers HcGDH1 (5′ - GCC - CTC-CTC-GTT-AGC-CAG-AGA-CGC-AAG-G-3′) and HcGDH2 (5′-GCA-GAT-GAT-TGC-CAA-GGC-TTG-TCC-CGA-G-3′) were designed and used to perform 5′ and 3′ RACE reactions as described above. The resulting full-length

S.C.D. - U.H.P.
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

cDNA *GDHA* was cloned into pGEM-T Easy vector (Promega), sequenced and submitted to the GenBank nucleotide database under accession number AAL06075.

DNA and RNA isolation

Fungal colonies were fixed in liquid nitrogen. Genomic DNA extractions were performed with a DNeasy plant mini kit (Qiagen) from ≈100 mg of frozen mycelium according to the manufacturer's instructions. An average of 0.3 μg of total DNA mg^{-1} frozen material was isolated and resuspended in sterile water and stored at –20°C until further use. Total RNA isolation was performed with the RNeasy plant mini kit (Qiagen) from ≈100 mg of frozen mycelium. According to the manufacturer's recommendations, a buffer containing guanidium hydrochloride was used instead of a buffer containing guanidium isothiocyanate to avoid solidification of samples as a result of secondary metabolites in mycelia of filamentous fungi. An average of 1 μg of total RNA mg^{-1} frozen material was isolated and stored in diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water at –70°C until further use. RNA concentrations were determined by measuring the absorbance at 260 nm (one OD unit at 260 nm = 40 μg ml^{-1}). The ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm gives an estimate of RNA purity (samples with ratios <1.8 were discarded). The integrity and size distribution were checked by denaturing agarose gel electrophoresis.

Radioactive probe synthesis

The [α-^{32}P] probes were synthesized using the NonaPrimer kit (Qbiogen) according to the manufacturer's recommendations using 200 ng of purified cDNA. The probe specific radioactivity, determined using a scintillation counter, varied from 10^8 to 10^9 c.p.m. mg^{-1} DNA.

Northern blotting

Samples of total RNAs (20 μg) were separated on 1.5% (w/v) formaldehyde agarose gels, transferred to positive nylon membrane (Qbiogen) by capillary elution according to standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989) and fixed by UV irradiation for 2.5 min. Membranes were then prehybridized for 2 h at 37°C. After the prehybridization step, the radioactive probe [α-^{32}P]-dCTP cDNA (10^6 c.p.m. ml^{-1} hybridization buffer) was denatured and added to the prehybridization buffer. After 24 h, membranes were subjected to three washes in 2× SSC/0.5% SDS at room temperature for 20 min, followed by two washes in 1× SSC/0.1% SDS at 55°C for 30 min. After drying, X-ray films were exposed to membranes. Exposure times used for all hybridizations were 5 days for *AMT*s and 24 h for *GLNA* and *GDHA*. Each Northern blot was subjected to four independent repetitions. Autoradiographs were normalized by reprobing the same Northern blots with a 5.8S rRNA probe as loading control (6 h exposure time) and analysed by densitometric scanning using the Molecular Analyst computer software QUANTITY ONE (Bio-Rad).

Southern blotting

For Southern blotting analysis, 20 μg of total DNA from *H. cylindrosporum* was digested with the enzymes *Bam*HI, *Sma*I and *Hin*dIII and electrophoresed on a 0.8% agarose gel. The DNA was blotted with ^{32}P-labelled probes: (i) at 37°C and washed twice in 1× SSC/0.1% SDS at 55°C for 30 min (low-stringency condition); or (ii) at 42°C and washed twice in 2× SSC/0.5% SDS at 65°C for 30 min (high-stringency condition).

Amino acid and ammonium extraction and analysis

Amino acids and ammonium were extracted twice from 10–20 mg of freeze-dried tissues with 300 μl of 70% (v/v) cold ethanol. Ammonium concentration was determined according to the method of Botton and Chalot (1991). For amino acids, the samples were dried using a Speed Vac concentrator (Savant, Speed Vac Plus) and resuspended in 400 μl of 0.01 M HCl. DL-Norleucine (19.63 μg) was added as an internal standard, and the amino acid fraction was purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column. Purified samples (400 μl) were transferred to microvials, evaporated to dryness under a stream of nitrogen and derivatized according to the method of Mawhinney *et al.* (1986) using 8.3 μl of *N,N*-dimethylformamide and 41.7 μl of MTBSTFA.

The gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed using a Hewlett Packard 5973 MS instrument. The capillary column (30 m, 0.25 mm HP5-MS; Hewlett Packard) was initially held at 110°C. After 3 min, the temperature was increased by 6°C min^{-1} to 260°C. The injector and detector temperatures were 250°C and 230°C respectively. The mass spectrometer was operated in the electrical ionization mode. The monitored peak was $[M\text{-}57]^+$ for all amino acids (Mawhinney *et al.*, 1986). Each extraction and analysis was subjected to six independent repetitions.

[^{14}C]-Methylamine uptake

Initial rates of [^{14}C]-methylamine (Amersham) uptake in *S. cerevisiae* were measured as described previously (Marini *et al.*, 1994). Enteric bacteria convert methylamine to methylglutamine in an ATP-dependent reaction catalysed by glutamine synthetase (Soupene *et al.*, 1998). In contrast, *S. cerevisiae* (Soupene *et al.*, 2001) and the filamentous fungus *P. chrysogenum* (Hackette *et al.*, 1970) accumulate methylamine in the absence of metabolism, and we assume that the situation was similar in mycorrhizal fungi. Initial rates of [^{14}C]-methylamine (Amersham) uptake in *H. cylindrosporum* were measured as described previously (Javelle *et al.*, 1999). For uptake assays in *S. cerevisiae*, the medium was buffered at pH 6.1 and at pH 5.5 for assays in *H. cylindrosporum*.

Acknowledgements

This research was supported through a project of the Conseil Régional de Lorraine (Efficient use of nitrogen in forest ecosystems) co-ordinated by Dr Annick Brun, and by an INRA programme (Genetic control of N and P absorption and assimilation in ectomycorrhizal fungi) co-ordinated by Dr Francis Martin (INRA Champenoux, France). Anne-Marie

Marini is chercheur qualifié du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique. We are very grateful to Dr Roland Marmeisse (Université C. Bernard, Lyon, France) for supplying the *H. cylindrosporum* strain and the genomic GDH sequence, to Dr F. Gaymard and R. Lambilliotte (INRA Montpellier, Montpellier, France) for the gift of the cDNA library, to Sylvain Jeandroz (UMR INRA/UHP 1136, UHP Nancy I) for helping with phylogenetic analysis, and to Catherine Jauniaux and Sanndra Lecomte (IBMM, Gosselies, Belgium) for technical assistance. Many thanks to Christophe Jacob (UHP, Nancy I), Claude Plassard (INRA, Montpellier), Stephan Vissers and Antonio Urrestarazu (IBMM, Gosselies, Belgium) for helpful discussions.

References

Ahmad, I., and Hellebust, J.A. (1991) Enzymology of nitrogen assimilation in mycorrhiza. *Methods Microbiol* **23:** 181–202.

Alibhai, M., and Villafranca, J.J. (1994) Kinetic and mutagenic studies of the role of the active site residues Asp-50 and Glu-327 of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry* **33:** 682–686.

Avendaño, A., Deluna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., and Gonzalez, A. (1997) GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179:** 5594–5597.

Baars, J.J., Op den Camp, H.J., van Hoek, A.H., van der Drift, C., Van Griensven, L.J., Visser, J., *et al.* (1995) Purification and characterization of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Curr Microbiol* **30:** 211–217.

Banuett, F. (1991) Identification of genes governing filamentous growth and tumor induction by the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88:** 3922–3926.

Béchet, J., Grenson, M., and Wiame, J.M. (1970) Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **12:** 31–39.

Botton, B., and Chalot, M. (1991) Techniques for the studies of nitrogen metabolism in ectomycorrhiza. *Methods Microbiol* **23:** 204–244.

Breiman, A., and Barash, I. (1980) Methylamine and ammonia transport in *Stemphylium botryosum*. *J Gen Microbiol* **116:** 201–206.

Brun, A., Chalot, M., Martin, F., and Botton, B. (1992) Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiol* **99:** 938–944.

Cain, S.M., Matzke, E.A., and Brooker, R.J. (2000) The conserved motif in hydrophilic loop 2/3 and loop 8/9 of the lactose permease of *Escherichia coli*. Analysis of suppressor mutations. *J Membr Biol* **176:** 159–168.

Cardoza, R.E., Moralejo, F.J., Gutierrez, S., Casqueiro, J., Fierro, F., and Martin, J.F. (1998) Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the gdhA gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Curr Genet* **34:** 50–59.

Carvalho, J., Bertram, P.G., Wente, S.R., and Zheng, X.F. (2001) Phosphorylation regulates the interaction between Gln3p and the nuclear import factor Srp1p. *J Biol Chem* **276:** 25359–25365.

Chalot, M., and Brun, A. (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol Rev* **22:** 21–44.

Chalot, M., Kytoviita, M.M., Brun, A., Finlay, R.D., and Söderström, B. (1995) Factors affecting amino acid uptake by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycol Res* **99:** 1131–1138.

Chalot, M., Javelle, A., Blaudez, D., Lambilliote, R., Cooke, R., Sentenac, H., *et al.* (2002) An update on nutrient transport in ectomycorrhizas. *Plant Soil* **244:** 165–175.

Coffman, J.A., Rai, R., Cunningham, T., Svetlov, V., and Cooper, T.G. (1996) Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16:** 847–858.

Coschigano, P.W., and Magasanik, B. (1991) The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione S-transferases. *Mol Cell Biol* **11:** 822–832.

Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D., and Merrick, M. (2002) Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* **21:** 536–545.

Daugherty, J.R., Rai, R., el Berry, H.M., and Cooper, T.G. (1993) Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the GLN3 and DAL80 proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **175:** 64–73.

Debaud, J.C., and Gay, G. (1987) In vitro *fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus* Hebeloma cylindrosporum *associated with* Pinus pinaster. *New Phytol* **105:** 429–435.

DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L., and Gonzalez, A. (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* **276:** 43775–43783.

Dubois, E., and Grenson, M. (1979) Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Mol Gen Genet* **175:** 67–76.

Froeliger, E.H., and Carpenter, B.E. (1996) NUT1, a major nitrogen regulatory gene in *Magnaporthe grisea*, is dispensable for pathogenicity. *Mol Gen Genet* **251:** 647–656.

Fu, Y.H., and Marzluf, G.A. (1987) Molecular cloning and analysis of the regulation of nit-3, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **84:** 8243–8247.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68:** 1077–1090.

Haas, H., Bauer, B., Redl, B., Stoffler, G., and Marzluf, G.A. (1995) Molecular cloning and analysis of nre, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet* **27:** 150–158.

Hackette, S.L., Skye, G.E., Burton, C., and Segel, I.H. (1970) Characterization of an ammonium transport system in fila-

mentous fungi with methylammonium-^{14}C as the substrate. *J Biol Chem* **245:** 4241–4250.

von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225:** 487–494.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14:** 378–379.

Hofmann, K., and Stoffel, W. (1992) PROFILEGRAPH: an interactive graphical tool for protein sequence analysis. *Comput Appl Biosci* **8:** 331–337.

Ito, H., Fukuda, Y., Muruta, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153:** 163–168.

Jacobs, P., Jauniaux, J.C., and Grenson, M. (1980) A cis-dominant regulatory mutation linked to the argB-argC gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **139:** 691–704.

Jargeat, P., Gay, G., Debaud, J.C., and Marmeisse, R. (2000) Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum* does not require induction by nitrate. *Mol Gen Genet* **263:** 948–956.

Javelle, A., Chalot, M., Söderström, B., and Botton, B. (1999) Ammonium and methylamine transport by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol Ecol* **30:** 355–366.

Javelle, A., Rodríguez-Pastrana, B.R., Jacob, C., Botton, B., Brun, A., André, B., *et al.* (2001) Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Lett* **505:** 393–398.

Javelle, A., Bruno, A., Marini, A.M., and Chalot, M. (2003) High affinity ammonium transporters could act as nitrogen sensors during mycorrhiza morphogenesis. *Trends Microbiol* (in press).

Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A.J., Schröder, W.H., and Godbold, D.L. (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* **149:** 327–338.

Jessen-Marshall, A.E., Paul, N.J., and Brooker, R.J. (1995) The conserved motif, GXXX(D/E)(R/K)XG[X](R/K)(R/K), in hydrophilic loop 2/3 of the lactose permease. *J Biol Chem* **270:** 16251–16257.

Kersten, M.A., Muller, Y., Op den Camp, H.J., Vogels, G.D., Van Griensven, L.J., Visser, J., *et al.* (1997) Molecular characterization of the glnA gene encoding glutamine synthetase from the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mol Gen Genet* **256:** 179–186.

Kersten, M.A., Arninkhof, M.J., Op den Camp, H.J., Van Griensven, L.J., and van der Drift, C. (1999) Transport of amino acids and ammonium in mycelium of *Agaricus bisporus*. *Biochim Biophys Acta* **1428:** 260–272.

Kudla, B., Caddick, M.X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N.M., Bennett, C.F., Sibley, S., *et al.* (1990) The regulatory gene areA mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J* **9:** 1355–1364.

Kyte, J., and Doolitle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157:** 105–132.

Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., *et al.* (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64:** 746–785.

Liaw, S.H., Kuo, I., and Eisenberg, D. (1995) Discovery of the ammonium substrate site on glutamine synthetase, a third cation binding site. *Protein Sci* **4:** 2358–2365.

Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutant are avirulent. *Cell* **90:** 939–949.

Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17:** 1236–1247.

Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P., *et al.* (2000) The G protein-coupled receptor GPR1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154:** 609–622.

Lorillou, S., Botton, B., and Martin, F. (1996) Nitrogen regulates the biosynthesis of NADP glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytol* **132:** 289–296.

Ludewig, U., von Wiren, N., and Frommer, W.B. (2002) Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J Biol Chem* **277:** 13548–13555.

Madhani, H.D., and Fink, G.R. (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* **8:** 349–353.

Magasanik, B., and Kaiser, C.A. (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae Gene* **290:** 1–18.

Margelis, S., D'Souza, C., Small, A.J., Hynes, M.J., Adams, T.H., and Davis, M.A. (2001) Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **183:** 5826–5833.

Marini, A.M., and André, B. (2000) *In vivo* N-glycosylation of the Mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Mol Microbiol* **38:** 552–564.

Marini, A.M., Vissers, S., Urrestarazu, A., and André, B. (1994) Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **13:** 3456–3463.

Marini, A.M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., and André, B. (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17:** 4282–4293.

Marini, A.M., Matassi, G., Raynal, V., André, B., Cartron, J.P., and Cherif-Zahar, B. (2000a) The human rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Genet* **26:** 341–344.

Marini, A.M., Bruno, A., Frommer, W.B., and Andre, B. (2000b) Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Mol Microbiol* **35:** 378–385.

Marzluf, G.A. (1997) Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu Rev Microbiol* **51:** 73–96.

Mawhinney, T.P., Robinett, R.S., Atalay, A., and Madson,

M.A. (1986) Analysis of amino acids as their tert-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr* **358:** 231–242.

Medoff, G., Sacco, M., Maresca, B., Schlessinger, D., Painter, A., Kobayashi, G.S., *et al.* (1986) Irreversible block of the mycelia-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. *Science* **231:** 476–479.

Minehart, P.L., and Magasanik, B. (1992) Sequence of the GLN1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the upstream region in regulation of glutamine synthetase expression. *J Bacteriol* **174:** 1828–1836.

Mitchell, A.P., and Magasanik, B. (1984) Regulation of glutamine-repressible gene products by the GLN3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4:** 2758–2766.

Monahan, B.J., Fraser, J.A., Hynes, M.J., and Davis, M.A. (2002a) Isolation and characterization of two ammonium permease genes, meaA and mepA, from *Aspergillus nidulans*. *Eukar Cell* **1:** 85–94.

Monahan, B.J., Unkles, S.E., Tsing, I.T., Kinghorn, J.R., Hynes, M.J., and Davis, M.A. (2002b) Mutation and functional analysis of the *Aspergillus nidulans* ammonium permease MeaA and evidence for interaction with itself and MepA. *Fungal Genet Biol* **36:** 35–46.

Montanini, B., Moretto, N., Soragni, E., Percudani, R., and Ottonello, S. (2002) A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal Genet Biol* **36:** 22–34.

Mora, J. (1990) Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* **54:** 293–304.

Moye, W.S., Amuro, N., Rao, J.K., and Zalkin, H. (1985) Nucleotide sequence of yeast GDH1 encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* **260:** 8502–8508.

Ninnemann, O., Jauniaux, J.C., and Frommer, W.B. (1994) Identification of a high affinity ammonium transporter from plants. *EMBO J* **13:** 3464–3471.

Pasquier, C., and Hamodrakas, S.J. (1999) An hierarchical artificial neural network system for the classification of transmembrane proteins. *Protein Eng* **63:** 1–4.

Pateman, J.A., Dunn, E., Kinghorn, J.R., and Forbes, E.C. (1974) The transport of ammonium and methylammonium in wild type and mutant cells of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **133:** 225–236.

Pazdernik, N.J., Matzke, E.A., Jessen-Marshall, A.E., and Brooker, R.J. (2000) Roles of charged residues in the conserved motif, G-X-X-X-D/E-R/K-X-G-[X]-R/K-R/K, of the lactose permease of *Escherichia coli*. *J Membr Biol* **174:** 31–40.

Persson, B., and Argos, P. (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J Mol Biol* **237:** 182–192.

Plassard, C., Scheromm, P., Mousain, D., and Salsac, L. (1991) Assimilation of mineral nitrogen and ion balance in the two partners of ectomycorrhizal symbiosis. *Data Hypothesis Experientia* **47:** 340–349.

Plassard, C., Bonafos, B., and Touraine, B. (2000) Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. *Plant Cell Environ* **23:** 1195–1206.

Rawat, S.R., Silim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., and Glass, A.D. (1999) AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J* **19:** 143–152.

Roon, R.J., Levy, J.S., and Larimore, F. (1974) Negative interactions between amino acid and methylamine/ammonia transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **252:** 3599–3604.

Roon, R., Even, H.L., Dunlop, P., and Larimore, F.L. (1975) Methylamine and ammonia transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **122:** 502–509.

Rowen, D.W., Esiobu, N., and Magasanik, B. (1997) Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179:** 3761–3766.

Saier, M.H., Jr (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64:** 354–411.

Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4:** 406–425.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaap, P.J., Muller, Y., Baars, J.J., Op den Camp, H.J., Sonnenberg, A.S., van Griensven, L.J., *et al.* (1996) Nucleotide sequence and expression of the gene encoding $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) from *Agaricus bisporus*. *Mol General Genet* **250:** 339–347.

ter Schure, E.G., Sillje, H.H., Verkleij, A.J., Boonstra, J., and Verrips, C.T. (1995) The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177:** 6672–6675.

ter Schure, E.G., Sillje, H.H., Vermeulen, E.E., Kalhorn, J.W., Verkleij, A.J., Boonstra, J., *et al.* (1998) Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **144:** 1451–1462.

ter Schure, E.G., van Riel, N.A., and Verrips, C.T. (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **24:** 67–83.

Slaughter, J.C., McKernan, G., and Saita, M. (1990) Intracellular asparagine pool as a factor in control of ammonium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol Res* **8:** 1009–1012.

Smith, S.E., and Read, F.A. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.

Sonnhammer, E.L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **6:** 175–182.

Soupene, E., He, L., Yan, D., and Kustu, S. (1998) Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95:** 7030–7034.

Soupene, E., Ramirez, R.M., and Kustu, S. (2001) Evidence that fungal MEP proteins mediate diffusion of the uncharged species NH(3) across the cytoplasmic membrane. *Mol Cell Biol* **21:** 5733–5741.

Soupene, E., Lee, H., and Kustu, S. (2002) Ammonium/methylammonium transport (Amt) proteins facilitate diffu-

sion of NH_3 bidirectionally. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 3926–3931.

Stanbrough, M., and Magasanik, B. (1996) Two transcription factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of GAP1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178:** 2465–2468.

Stanbrough, M., Rowen, D.W., and Magasanik, B. (1995) Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92:** 9450–9454.

Thomas, G.H., Jonathan, G.L.M., and Merrick, M. (2000) Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol Microbiol* **37:** 331–344.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22:** 4673–4680.

Tusnády, G.E., and Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *J Chem Inf Comput Sci* **41:** 364–368.

Vallorani, L., Polidori, E., Sacconi, C., Agostini, D., Pierleoni, R., Piccoli, G., *et al.* (2002) Biochemical and molecular characterization of NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *New Phytol* **154:** 779–790.

Wiame, J.M., Grenson, M., and Arst, H.N., Jr (1985) Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv Microb Physiol* **26:** 1–88.

Wipf, D., Benjdia, M., Tegeder, M., and Frommer, W.B. (2002) Characterization of a general amino acid permease from *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Lett* **528:** 119–124.

6. La glutamate deshydrogénase à NADP n'est pas une fonction indispensable chez les champignons ectomycorhiziens.

Publication n°6 – Soumise à New Phytologist

Résumé : La contribution de la glutamate deshydrogénase à NADP (NADP-GDH) dans l'assimilation de l'ammonium chez les champignons ectomycorhiziens et les ectomycorhizes est depuis plusieurs années soumise à discussion. Les expériences menées au sein de la présente étude montrent que cette enzyme n'est pas indispensable dans les processus d'assimilation d'ammonium pour différentes souches fongiques.

Les activités de la glutamine synthétase (GS) et la NADP-GDH ont été mesurées dans différentes souches fongiques, cultivées dans des conditions azotées variées. La contribution de la NADP-GDH a été estimée en suivant l'incorporation d'azote ^{15}N fourni sous forme de $(^{15}NH_4)_2SO_4$, en glutamate lorsque la GS a été inhibée par la phosphinothricine.

De plus, des tests d'amplification de la NADP-GDH à partir d'ADNc ou d'ADN génomique ont été effectués pour toutes les souches étudiées, grâce à l'utilisation d'amorces dégénérées.

Deux groupes de champignons ont alors pu être distingués: les GDH^+ incluant *Hebeloma cylindrosporum*, qui possèdent une NADP-GDH fonctionnelle et les GDH^- comme *Paxillus involutus* pour lesquels aucune activité NADP-GDH ni aucun transcrit n'a été détecté, quelque soient les conditions azotées testées.

Tous ces résultats confirment que la fonction NADP-GDH est dispensable chez les champignons ectomycorhiziens, ce qui lui confère un rôle mineur dans l'assimilation de l'ammonium. Nous avons émis l'hypothèse que cette absence de fonction pourrait être une adaptation évolutive en relation avec la niche écologique des champignons, plutôt qu'une régulation transitoire de l'expression du gène en fonction des conditions azotées variables de l'environnement.

The NADP dependent Glutamate dehydrogenase : a dispensable function in ectomycorrhizal fungi

Mélanie Morel[1], Marc Buée[2], Michel Chalot[1]* and Annick Brun[1]

[1]IFR 110, UMR INRA/UHP 1136 Interactions Arbres Micro-organismes, Université Henri Poincaré - Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques BP239, F54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

[2]IFR 110, UMR INRA/UHP 1136 Interactions Arbres Micro-organismes, INRA-Nancy, 54280 Champenoux France

Running title: NADP-Glutamate dehydrogenase dispensability in ECM fungi

* Author for correspondence: Michel Chalot

Université Henri Poincaré - Nancy I

UMR INRA 1136 Interactions Arbres Micro-organismes

BP 239

54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France

Phone : +33 3-83 68 42 38

Fax : +33 3-83 68 42 92

E-mail : Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Summary

There is much controversy on the contribution of NADP-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) in NH_4^+ assimilation in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. Experiments reported here provide information on the dispensability of NADP-GDH in various ectomycorrhizal isolates.

GDH and GS enzyme activities were measured on mycelia grown under various N conditions. The contribution of GDH in ammonium assimilation was further estimated by following ^{15}N incorporation from $(^{15}NH_4)_2SO_4$ into glutamate, when GS was inhibited by phosphinothricin. Finally, gene amplification on cDNA and genomic DNA was performed using degenerated primers.

Two groups of fungi could be distinguished. The GDH^+ fungi include *H. cylindrosporum*-like fungi, which possess a functional NADP-GDH. The GDH^- fungi include *P. involutus*-like fungi for which the NADP-GDH activity as well as the *GDHA* transcripts were not detected, whatever the growth condition.

All the results are consistent with the dispensability of the NADP-GDH function in ECM fungi, suggesting a minor role in ammonium assimilation in ectomycorrhizal fungi. We hypothesize that the lack of a functional NADP-GDH could be an evolutive adaptation in relation with the ecological niche of ECM fungi, rather than a transitional regulation in response to changes in N contents of the extracellular medium.

Keywords: NADP-Glutamate dehydrogenase; Nitrogen regulation; ^{15}N; Functional diversity; Ectomycorrhizal fungi.

Introduction

Two metabolic pathways are involved in the primary incorporation of ammonium into organic compounds. One involves the combined activity of glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2), which aminates glutamate into glutamine, and glutamate synthase (GOGAT, EC 1.4.7.1), which transfers the amino group of glutamine to 2-oxoglutarate to yield two molecules of glutamate. The alternative pathway involves the NADP-linked glutamate dehydrogenase (NADP-GDH, EC 1.4.1.4), which catalyses reversible amination of 2-oxoglutarate to form glutamate (Botton and Dell, 1994). Most organisms possess the two pathways to produce glutamate (Inokuchi *et al.,* 2002; Marzluf, 1997). One therefore needs to elucidate whether this redundance has a biological significance. Glutamine synthetase is the unique enzyme involved in the biosynthesis of glutamine, an essential amino acid playing a central role in the N metabolism in all organisms: GS is therefore an essential protein, whose inactivation leads to a glutamine auxotroph phenotype (Teichert *et al.,* 2004). On the other hand, the necessity for NADP-GDH participation is uncertain because of the concomitant involvement of GOGAT in glutamate formation.

In higher plants, current opinion is divided as to whether GDH plays (i) a role in ammonia assimilation, particularly under high ammonium concentrations ; (ii) a role in glutamate catabolism ; or (iii) a redundant and dispensable role in nitrogen assimilation. (Melo-Oliveira *et al.,* 1996) proposed that GDH plays a minor role, if any, in the reassimilation of photorespiratory ammonia and that GDH functions in ammonia detoxification, because its activity is increased in plants exposed to high levels of ammonia. Additionally, GDH would assimilate ammonium in tobacco source leaves during senescence to compensate for the decrease in ferredoxin-dependent GOGAT (Masclaux-Daubresse *et al.,* 2002). More recently, it was shown in *Medicago truncatula* that, although *in vitro* aminating GDH activity was several times higher than deaminating activity, *in vivo* $^{15}NH_4$ incorporation into amino acids

was completely inhibited by the GS inhibitor methionine sulfoximine (MSX), indicating that GDH was not involved in ammonium assimilation/detoxification (Glevarec *et al.,* 2004). The discrepancy between *in vivo* and *in vitro* results suggests that GDH is regulated *in vivo* by post-translational modifications allowing it to function in the catabolic reaction. Most information on the role and functioning of plant and algae GDH is based on studies on mutants lacking GDH activity (Magalhaes *et al.,* 1990; Melo-Oliveira *et al.,* 1996). Kinetic examination of a *Chlorella sorokiniana* NADP-GDH deletion mutant lacking the unique N-terminal domains of the α- and β-isozymes, demonstrated a regulatory role for these domains in modulating the aminating or deaminating tendencies of both native isozymes (Lawit *et al.,* 2003). GDH null mutants of *Zea mays* exhibit a 40 to 50% lower rate of ^{15}NH4 assimilation into total reduced nitrogen and a lower shoot :root ratio than the wild type suggesting a role of the enzyme in ammonium assimilation (Magalhaes *et al.,* 1990). Similarly, in *Arabidopsis thaliana*, a GDH null mutant displays a growth defect specifically in the presence of exogenously supplied inorganic nitrogen, supporting the notion that GDH plays a role distinct from that of GS in ammonia assimilation (Melo-Oliveira *et al.,* 1996). Conversely, the overexpression of the gdhA gene from *Aspergillus nidulans* in *Lycopersicon esculentum* can modulate nitrogen metabolism in tomato, with resultant increases in levels of some free amino acids, in particular glutamate, in tomato fruits (Kisaka and Kida, 2003). Similarly, the expression of *Chlorella sorokiniana* GDH in tobacco plants increased the growth rate and chlorophyll content, suggesting a better uptake and utilization of ammonium in plants (Huang *et al.,* 2002). Since NADP-GDH activity could be a real advantage for plants, the reason why most plants do not clearly exhibit this function remains unknown.

However, this peculiarity does not seem to be restricted to higher plants. In ectomycorrhizal fungi, tracer experiments and effects of inhibitors on the partitioning of labelled compounds are entirely consistent with the operation of the GS/GOGAT cycle but

not NADP-GDH in *Pisolithus tinctorius* (Kershaw and Stewart 1992), *Lactarius subdulcis* (Martin *et al.,* 1986) and *Paxillus involutus* (Chalot *et al.,* 1994). In other ectomycorrhizal fungi such as *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma* sp., *Laccaria bicolor* and *Tuber borchii*, in addition to GS, NADP-GDH clearly participates in ammonium assimilation (Chalot *et al.,* 1991; Martin *et al.,* 1994; Martin *et al.,* 1988; Vallorani *et al.,* 2002). The apparent higher affinity of GS than NADP-GDH for NH_4^+ in *Laccaria laccata* (24 μM and 5 mM, respectively) (Brun *et al.,* 1992), supports the fact that GS is the main route for NH_4^+ assimilation at low NH_4^+ concentrations, while NADP-GDH acts preferentially in excess NH_4^+ in fungi (Martin, 1991). In *Cenococcum geophilum*, the primary assimilation of NH_4^+ in the rapid growth phase of the fungus is assessed by GS and differs from the assimilation pathway in its stationary phase where NADP-GDH would be more active (Genetet *et al.,* 1984; Martin *et al.,* 1988). NADP-GDH activity increased fivefold in *Debaromyces hansenii* under hyperosmotic conditions whereas it was inhibited by increasing the ionic strength (Alba-Lois *et al.,* 2004). Taken together, these results suggest that a higher NADP-GDH activity might be needed to counteract the inactivation of the enzyme by the strong ionic strength resulting from the accumulated ions. Other studies suggested that NADP-GDH is restricted to specific functions such as sporophore development in *Coprinus lagopus* (Stewart and Moore, 1974). In *S. cerevisiae*, Gdh1p functions in the assimilation of ammonia and utilizes 50-60% of all NADPH that is used for biomass synthesis during growth with ammonia as nitrogen source under anaerobic conditions, and a GDH1-inactivated strain had a significantly reduced NADPH requirement, and therefore, an altered redox metabolism (Bro *et al.,* 2004).

Differential patterns of N assimilation have been observed in ectomycorrhizal symbiotic tissues, suggesting a role of the host plant but also of the associated fungus in the regulation of fungal NADP-GDH (Botton and Dell, 1994). Evidence from enzymatic activities, electrophoresis patterns, immunological assays (Brun *et al.,* 1994; Dell *et al.,* 1989) and ^{15}N

experiments (Chalot *et al.,* 1991) showed that in *Hebeloma/Spruce* ectomycorrhizas, primary N assimilation proceeds essentially via the fungal NADP-GDH pathway, but in *Lactarius*/Beech or *Laccaria*/Eucalypt ectomycorrhizas, NADP-GDH was thought to be down-regulated (Botton and Dell 1994; Dell *et al.,* 1989). This repression has been attributed to the accumulation of amino acids, especially glutamine, in the mantle of ectomycorrhizas (Martin *et al.,* 1992). Indeed, ammonium and its assimilation products such as glutamine, could repress key metabolic routes of nitrogen assimilation in most fungi (Cardoza *et al.,* 1998; Hernandez *et al.,* 1983; Ter Schure *et al.,* 1995; Wiame *et al.,* 1985). More particularly, it was shown that GDHA, the gene encoding NADP-GDH, was under the nitrogen catabolic repression in the ECM fungi *Laccaria bicolor*, *Tuber borchii* and *Hebeloma cylindrosporum* (Javelle *et al.,* 2003; Lorillou *et al.,* 1996; Vallorani *et al.,* 2002).

In this study, we examine the functional diversity of the NADP-GDH in various ectomycorrhizal strains by combining biochemical and molecular approaches. We found that the lack of NADP-GDH function is not due to a transitory regulation by variations of external nitrogen conditions but rather to an evolutive adaptation probably due to the ecological niche of the ectomycorrhizal fungi.

Materials and Methods

Media, strains and culture growth conditions

The ectomycorrhizal basidiomycetes used were *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., *Hebeloma cylindrosporum monokaryotic strain* (h1) obtained from the *in vitro* fruiting dikaryon HC1 (Debaud and Gay, 1987), *Tricholoma populinum* (BLAE), *Scleroderma citrinum* (Foug A), *Amanita muscaria* (MAN), *Thelephora terrestris* (CHA), *Laccaria bicolor* (S238N), *Pisolithus tinctorius* (441), *Boletus edulis* (Hub 0), *Rhizopogon luteolus* (SERRE), *Lactarius subdulcis* (BRI 2), *Suillus bovinus* (LED 1) from the INRA Champenoux (France) collection.

The ascomycetes used were *Cenococcum geophilum* (H 5-3) from the INRA collection and *Tuber borchii* Vittad. (ATCC 95640). The fungi were grown on cellophane covered agar medium containing (mg l^{-1}) : $CaCl_2$ (50), $MgSO_4$ (150), KH_2PO_4 (250), NaH_2PO_4 (4,5), Na_2HPO_4 (160), $(NH_4)_2SO_4$ (250) and thiamine hydrochloride (0.04), referred to as NP medium. Carbon was supplied as 2.5 g glucose per liter. In further experiments, after 10 days of culture on cellophane covered agar medium, most fungi were first transferred to NH_4^+ free medium for 6 days (N starvation period), and then onto a medium containing 1 mM NH_4^+ as $(NH_4)_2SO_4$ or 1 mM glutamate. *L. bicolor* and *R. luteolus* were N-starved for 48 h only, because a 6 day period prevents further N absorption in these two ECM fungi. L-Phosphinothricin (PPT) (a GS specific inhibitor) treatments were carried out by incubating the mycelium in a NH_4^+ free liquid medium with 2.5 mM PPT for 45 min, prior to 1 mM $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (99 % atom excess) feeding.

Sporocarps and ectomycorrhizas were collected in Breuil (France) during the vegetative period. The *Escherichia coli* strains used were DH5α. Classical procedures for manipulating *E. coli* cells and DNA were essentially based on (Sambrook *et al.*, 1989).

Genomic amplification of NADP-GDH

Genomic DNA isolation was performed with the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) from approximately 100 mg of frozen mycelium according to the manufacturer recommendations. A cDNA consensus sequence was deduced by aligning published sequences from *H. cylindrosporum, T. borchii, L. bicolor* and *S. cerevisiae* (accession numbers AY052476, AF309087, U31369, M11297, respectively). Three sets of degenerated primers (Table 1) were designed from highly conserved regions, either specific of ascomycetes (GDHA1/GDHA2) or of basidiomycetes (GDHB1/GDHB2 and GDHC1/GDHC2) sequences. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using genomic

Table 1 Degenerated primers used to amplify NADP-GDH and GS DNA. I=T/G/A/C ; R= G/A ; Y= C/T ; K= G/T ; W= A/T ; V=G/A/C ; H= A/C/T ; N=A/G/C/T

Primers	*Sequences*
GDHA1	5' CCIGARGCIACIGGITA 3'
GDHA2	5' ACYTCRTTYTGIGTIGC 3'
GDHB1	5' GAGGCCACYGGKTWCGG 3'
GDHB2	5' CTGAGCCATYTCVAGACC 3'
GDHC1	5' TCYGACTTTGACCCCAAGGG 3'
GDHC2	5' GCCATCTCVAGACCAGA 3'
SbGDH1	5' CCCTCCACACTTGTTGCCATC 3'
SbGDH2	5' TACCTCGTTCTGGGTGGCACC 3'
SbGS1	5' ACGTCATGAGACTGGCCACAT 3'
SbGS2	ATCTGAGTACGGATCACAATA 3'
GSC1	5' GGIATHGARCARGARTAYAC 3'
GSC2	5' CCIGCICCRTTCARTCNCC 3'

DNA as a template, under the following conditions: 95°C for 1 min, 35 cycles at 95°C for 5 s, 50°C for 45 s, and 72°C for 2 min using an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France). The amplification products were cloned into the pGem-T vector (Promega, Madison, WI) and sequenced using the Beckman CEQ 2000 XL analyser (Beckman Coulter, Roissy, France).

GDH and GS transcript amplification by RT-PCR

Total RNA isolation was performed with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) from approximately 100 mg of frozen mycelium. According to the manufacturer recommendations, a buffer containing guanidium hydrochloride instead of guanidium isothiocyanate was used to avoid solidification of samples due to the secondary metabolites present in mycelia of filamentous fungi. An average of 800 ng total RNA per mg frozen material was isolated. RT products were obtained from 1 µg of total RNA using Omniscript Kit (Qiagen) according to the manufacturer protocol. For each fungus, 1 µl of RT products was used to amplify NADP-GDH and GS transcripts by PCR, using the respective primers: GDH A1/GDH A2, GDH B1/GDH B2 or GDH C1/GDH C2 and GSC1/GSC2 (Table 1) for GDH and GS, respectively, in the amplification conditions described previously. The amplification products were cloned into the pGem-T vector (Promega) and sequenced as described above.

Enzyme and Protein Assays

Enzymatic assays were performed according to (Brun *et al.*, 1992). GS activity was determined by a modification of the transferase assay of (Shiparo and Stadtman, 1970) and NADP-GDH activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm. Protein content was determined by a modification of the Bradford method (1976), using BSA as a standard.

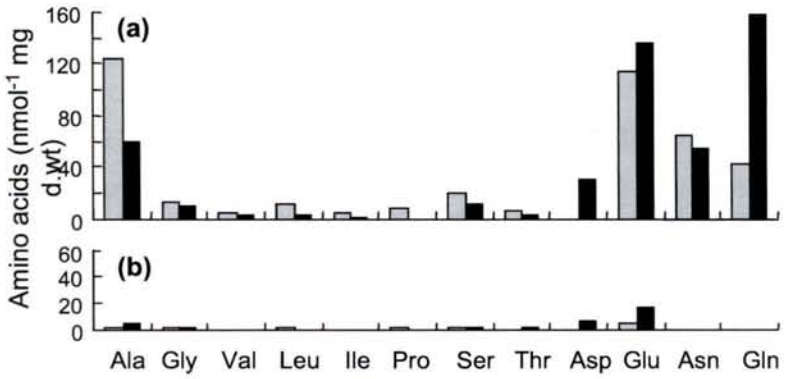


Fig. 1 Amino acid contents of *Paxillus involutus* (black bars) and *Hebeloma cylindrosporum* (grey bars) grown (a) on a standard NP medium and (b) after 6 days of nitrogen starvation. Amino acid content was determined by GC-MS analysis as described in the Materials and Methods section. Results are the means of 3-5 replicates.

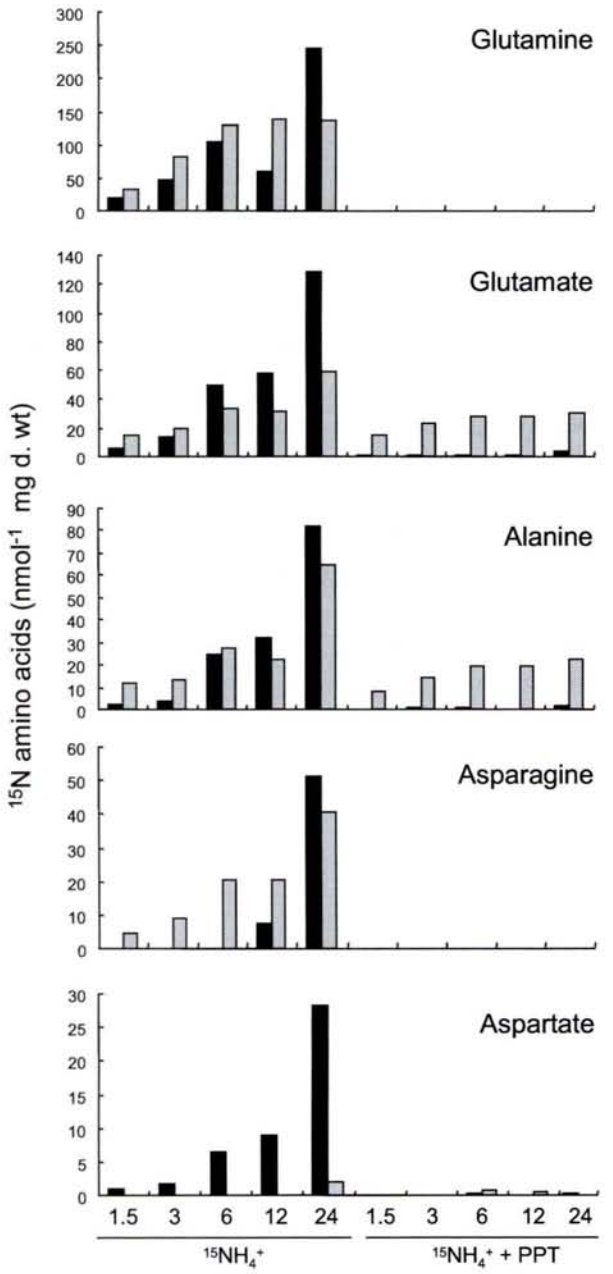


Fig. 2 ^{15}N content in individual amino acid in *Paxillus involutus* (black bars) and *Hebeloma cylindrosporum* (grey bars) after $(^{15}NH_4)_2SO_4$ feeding with or without 2.5 mM phosphinothricin (PPT). The ^{15}N labelling was followed in individual amino acids, from 90 min to 24 h, by GC-MS analysis as described in the Materials and Methods section. Results are the means of 3-5 replicates.

Amino acid extraction and analysis

Amino acids were extracted twice with 70% (V/V) cold ethanol. Amino acids were purified on a Dowex 50WX-8 cation ion exchange column and analyzed by GC-MS as described in (Javelle *et al.*, 2003). For liquid medium samples, 20µl were directly evaporated and derivatized. The monitered peak was $[M-57]^+$ for all amino acids (Mawhinney *et al.*, 1986). The $[m + 1]^+$ and, for asparagine and glutamine, the $[m + 2]^+$ ions corresponding to singly and doubly labelled components were also monitored. The isotopic enrichment calculations followed those given by (Campbell, 1974).

Results

Amino acid pools in *P. involutus* and *H. cylindrosporum*

P. involutus and *H. cylindrosporum* were grown on NH_4^+ supplemented NP medium for 10 days (To) and their amino acid pools were compared after 10 days of growth (Fig. 1A) followed by 6 days of N starvation (-N6) (Fig. 1B). The two fungi showed similar amino acid patterns at To, except that *P. involutus* had more glutamine and glutamate than *H. cylindrosporum* (Fig. 1A). After six days of N starvation, most amino acids in *H. cylindrosporum* were undetectable, while *P. involutus* still contained traces of some amino acids (Fig. 1B). After 24 h of N starvation, the intracellular amino acid pools had already strongly declined in *H. cylindrosporum* (Javelle *et al.*, 2003), indicating that *H. cylindrosporum* enters into a N-starvation state more rapidly than *P. involutus*.

Comparative ^{15}N assimilation between *P. involutus* and *H. cylindrosporum*

P. involutus and H. cylindrosporum were fed with 1 mM $^{15}NH_4^+$ with or without PPT for various lengths of time (Fig. 2). Labelled glutamine, glutamate, aspartate, asparagine and alanine were readily detected in the two fungi. However, *P. involutus* seemed to be more

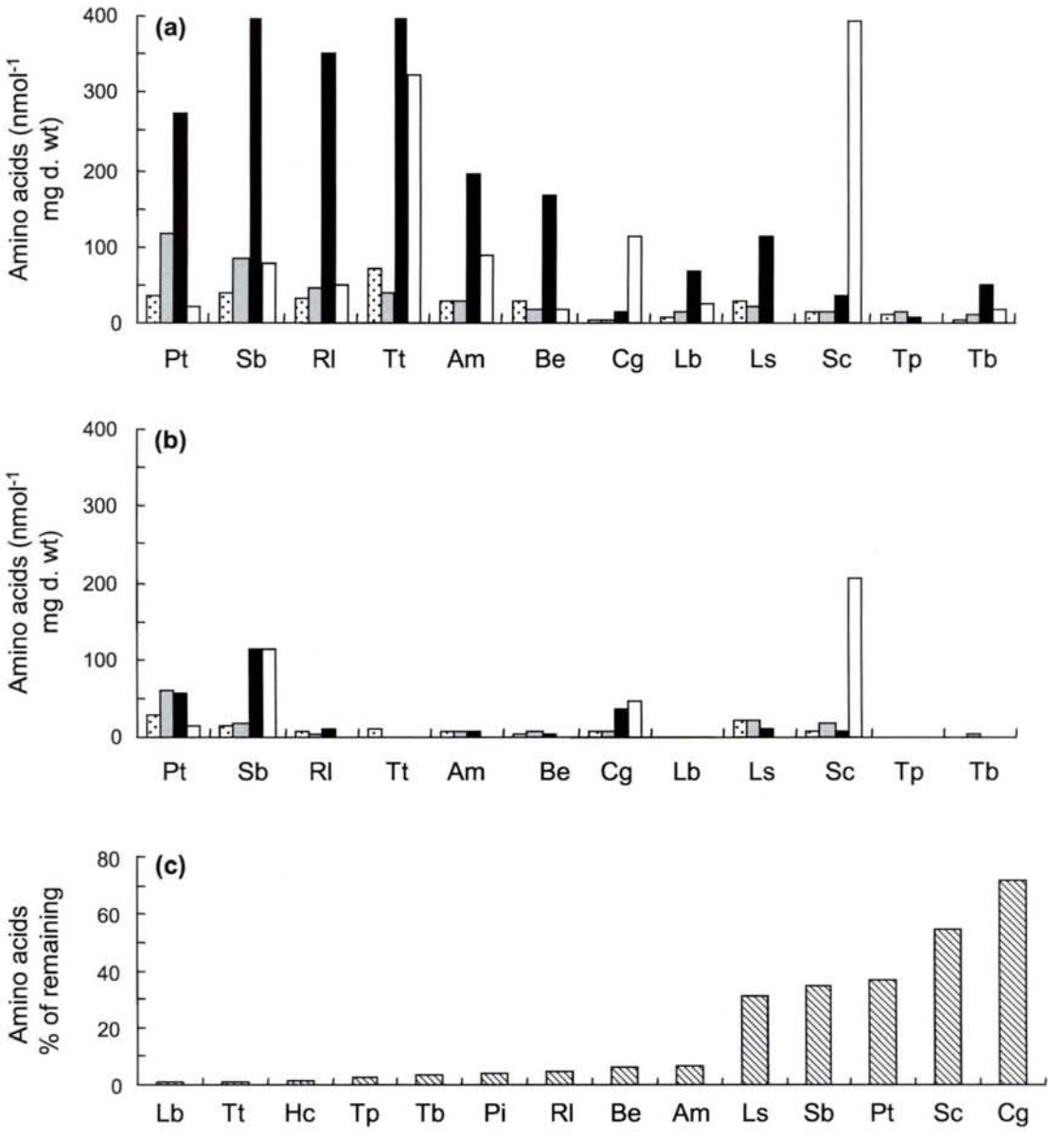


Fig. 3 Alanine (spotted bars), glutamate (grey bars), glutamine (black bars) and asparagine (white bars) content of fungi grown (a) on a standard MMN medium and (b) after 6 days of nitrogen starvation. Pt : *Pisolithus tinctorius* ; Sb : *Suillus bovinus* ; Rl : *Rhizopogon luteolus*, Tt : *Thelephora terrestris* ; Am : *Amanita muscaria* ; Be : *Boletus edulis*, Cg : *Cenococcum geophilum* ; Lb : *Laccaria bicolor*; Ls : *Lactarius subdulcis* ; Sc : *Scleroderma citrinum* ; Tp : *Tricholoma populinum* ; Tb : *Tuber borchii*. Amino acid content was determined by GC-MS analysis as described in the Materials and Methods section. (c) percentage of the remaining total amino acids after 6 days of nitrogen starvation. Results are the means of 3-5 replicates.

active in $^{15}NH_4^+$ incorporation than *H. cylindrosporum*, especially after 24h of ^{15}N feeding. *H. cylindrosporum* did not synthesize aspartate but rather asparagine, while *P. involutus* first synthesized aspartate and transformed it into asparagine only after 12 h of treatment. When 2.5 mM PPT were supplied to fungal colonies, GS activity was undetectable (data not shown) and labelled glutamate was not detected in *P. involutus* whereas *H. cylindrosporum* still produced significant amounts of labelled glutamate and alanine (Fig. 2). Substantial NADP-GDH activities were detected in *H. cylindrosporum* in all treatments, whereas no NADP-GDH activity was detected in *P. involutus* in any N condition tested (Table 2). Conversely, GS activity was readily detected in the two fungi. These results suggest that the formation of glutamate by the NADP-GDH pathway occurred only in *H. cylindrosporum* but not in *P. involutus*. Similar experiments were carried out in other ECM fungal isolates to check whether the lack of NADP-GDH activity was restricted to *P. involutus*.

Amino acid pools in various ectomycorrhizal fungi

Contents of the most abundant amino acids (alanine, glutamate, glutamine and asparagine) were compared at To and –N6 in various ECM isolates (Fig. 3). The ECM fungi tested showed large differences in amino acid contents at To (Fig. 3A). *S. bovinus* and *T. terrestris* produced a large amount of glutamine, which was the major amino acid in all fungi tested except for *C. geophilum* and *S. citrinum* where asparagine was the most abundant amino acid. *C. geophilum*, *L. bicolor*, *L. subdulcis*, *T. populinum*, *T. borchii* present a poor amino acid pattern compared to the other fungi on the medium used. Six days of N starvation decreased the amino acid pools in most fungi (Fig. 3B). However, two groups could be distinguished, according to the impact of the N starvation period on the amino acid pools. *L. subdulcis*, *S. bovinus*, *P. tinctorius*, *S. citrinum* and *C. geophilum* were less affected by the N starvation

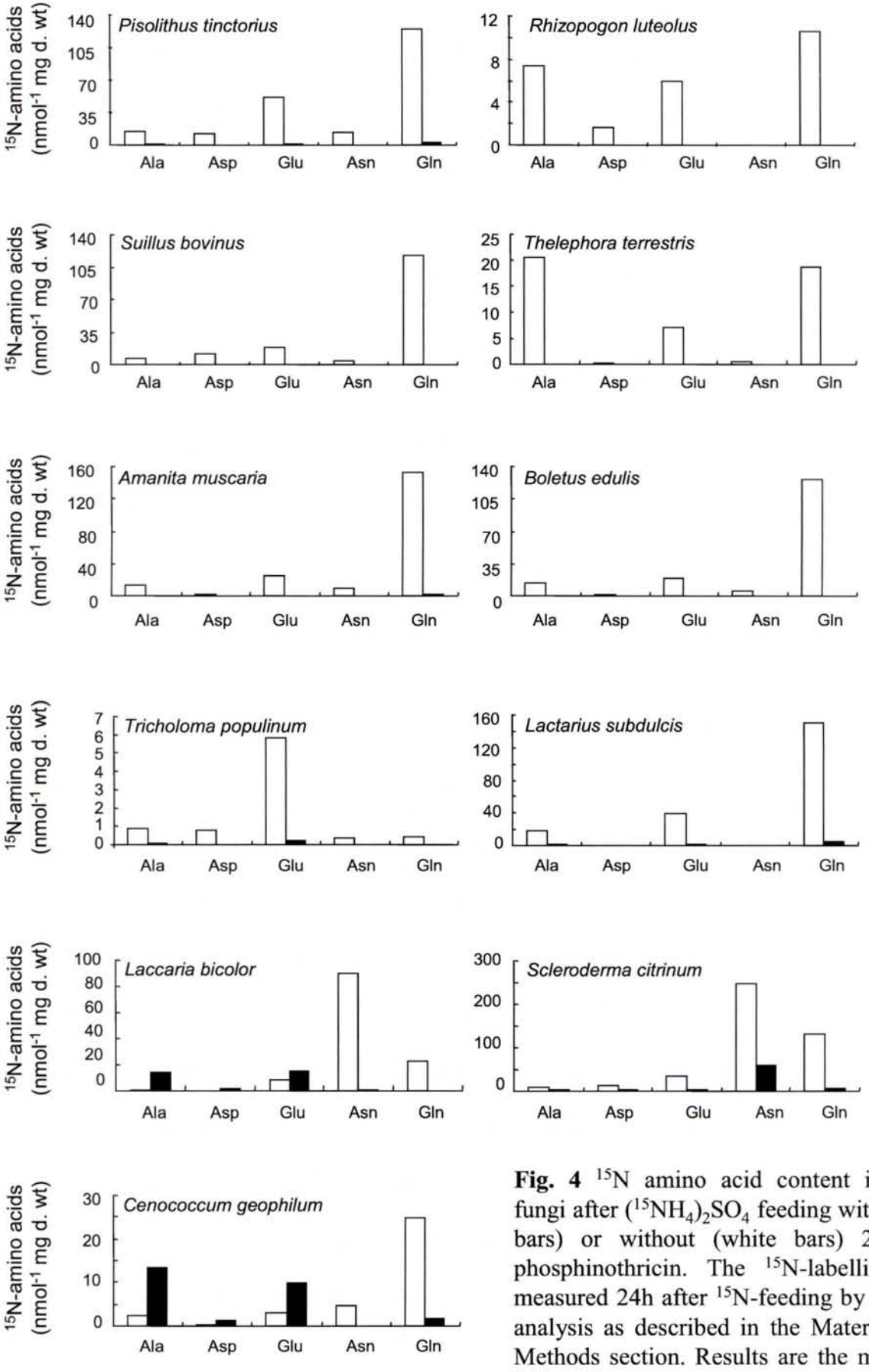


Fig. 4 ^{15}N amino acid content in ECM fungi after $(^{15}NH_4)_2SO_4$ feeding with (black bars) or without (white bars) 2.5 mM phosphinothricin. The ^{15}N-labelling was measured 24h after ^{15}N-feeding by GC-MS analysis as described in the Materials and Methods section. Results are the means of 3-5 replicates.

period and still exhibited between 30 % and 70 % of remaining amino acids after 6 days of starvation while the other fungi exhibited an amino acid pool depletion greater than 90 %.

NADP-GDH and GS involvement in NH_4^+ assimilation in various ectomycorrhizal fungi

Fungal colonies were fed with 1 mM $^{15}NH_4^+$ with or without PPT and harvested after 24 h. Labelled glutamine, glutamate, alanine and aspartate were detected in all fungi tested (Fig. 4), with ^{15}N-glutamine being the major amino acid produced in almost all fungi, suggesting a major involvement of the GS pathway in the primary NH_4^+ assimilation (Fig. 4). Notable exceptions are *T. populinum*, *S. citrinum* and *T. terrestris* where glutamate, asparagine and alanine, respectively were the most abundant ^{15}N-amino acids after 24 h of ^{15}N labelling. When 2.5 mM PPT were supplied, GS activity was undetectable (data not shown) and no labelled amino acids were detected in *P. tinctorius, R. luteolus, S. bovinus, T. terrestris*, *A. muscaria*, *B. edulis* and *T. populinum*. We conclude that the lack of labelled amino acids other than glutamine was due to the lack of NADP-GDH activity under PPT treatment (Fig. 4). Minor amounts of ^{15}N-glutamine (4.9 nmol mg^{-1} d. wt and 4.5 nmol mg^{-1} d. wt respectively) and/or ^{15}N-asparagine were detected in *L. subdulcis* and in *S. citrinum* (Fig. 4), probably due to an incomplete GS inhibition by PPT.

In contrast, large amounts of labelled glutamate and alanine were newly synthesized in *L. bicolor* and *C. geophilum* (Fig. 4). Additionally, some ^{15}N-glutamine was detected in *C. geophilum,* probably due to an incomplete inhibition of GS. Nevertheless, the high levels of ^{15}N-alanine and ^{15}N-glutamate produced, and the previous studies using methionine sulfoximine as another GS inhibitor, indicate that ^{15}N-glutamate formation could not be solely due to the GS/GOGAT pathway (Martin *et al.,* 1988). Thus, the NADP-GDH pathway clearly participated in glutamate formation in *L. bicolor* and *C. geophilum*. *T. borchii* was not

Table 2 NADP-GDH and GS specific activities of fungi grown on N-starved medium (-N), NH_4^+ containing medium (NH_4^+) and NH_4^+ + phosphinothricin medium (PPT) for 24h. Specific activities are expressed in $nkatal^{-1}$ mg protein. The presence (+) or absence (ND) of the corresponding transcript are indicated. ND : not detected.

	NADP-GDH				GS		
	Specific activity			Transcripts	Specific activity		Transcripts
	- N	NH_4^+	PPT		- N	NH_4^+	
Hebeloma cylindrosporum	**0.74**	**0.56**	**0.94**	**+**	**4.12**	**3.96**	**+**
Cenococcum geophilum	0.98	1.13	0.20	+	6.48	6.69	+
Tuber borchii	2.89	4.62	1.60	+	0.54	0.55	+
Laccaria laccata	0.13	0.30	0.14	+	1.15	1.00	+
Paxillus involutus	**ND**	**ND**	**ND**	**ND**	**12.10**	**9.35**	**+**
Amanita muscaria	ND	ND	ND	ND	1.06	0.96	+
Rhizopogon luteolus	ND	ND	ND	ND	2.03	1.88	+
Suillus bovinus	ND	ND	ND	ND	6.83	5.42	+
Tricholoma populinum	ND	ND	ND	ND	5.60	2.45	+
Boletus edulis	ND	ND	ND	ND	0.17	13.24	+
Scleroderma citrinum	ND	ND	ND	ND	3.06	8.03	+
Thelephora terrestris	ND	ND	ND	ND	3.91	4.93	+
Lactarius subdulcis	ND	ND	ND	ND	1.57	5.04	+
Pisolithus tinctorius	ND	ND	ND	ND	0.98	9.07	+

included in this study because it was found to be completely insensitive to the GS inhibitors PPT or MSX (Montanini *et al.*, 2003).

NADP-GDH and GS activities were measured in these fungi under various N conditions (Table 2). NADP-GDH activity was detected in the three fungi *H. cylindrosporum, C. geophilum and L. bicolor*, which is in agreement with $^{15}NH_4^+$ incorporation data (Figs 3 and 4), as well as in *T. borchii*. In our condition, *T. borchii* exhibited the highest NADP-GDH specific activity. Conversely, no NADP-GDH activity was detected in the other fungi whatever the conditions tested, while GS activity was detectable in all fungal isolates and growth condition tested.

NADP-GDH assays in field samples

To show the functionality of NADP-GDH in field samples, NADP-GDH assays were performed on sporocarps and ectomycorrhizas of fungal species, either corresponding to those tested *in vitro* or to other species from the same genus (Table 3). Only *L. bicolor*, *Laccaria amethystina* and *Hebeloma bulbifeum* showed NADP-GDH activity, while GS activity was readily detected in all samples tested. Among ectomycorrhizas collected, NADP-GDH activity was detected only in ectomycorrhizas formed by *L. bicolor/ Pseudotsuga menziesii*, *C. geophilum/P. menziesii*. GS assays were not performed on ectomycorrhizal tissues because GS activity could originate either from the plant or the fungal component.

Molecular detection of NADP-GDH and GS

The expression of the NADP-GDH gene was assessed by RT-PCR using three different sets of degenerated primers in all fungal species (Table 1). Total RNAs, from fungi grown for 24 h in a N-starved condition, were used to produce cDNA. A 380 bp NADP-GDH transcript was detected in *H. cylindrosporum*, *L. laccata*, *C. geophilum* and *T. borchii*, those fungi for which

Table 3 NADP-GDH and GS specific activities of sporocarps and ectomycorrhizas harvested in the field on the site of Breuil (France). Activities are expressed in nkatal^{-1} mg protein. ND : not detected

	NADP-GDH	GS
Sporocarps		
Laccaria laccata	0.20	4.73
Laccaria amethystina	0.06	4.88
Hebeloma bulbiferum	0.15	1.73
Paxillus involutus	ND	0.22
Scleroderma citrinum	ND	6.34
Xerocomus chrysantheron	ND	4.82
Boletus edulis	ND	22.09
Lactarius quietus	ND	5.22
Lactarius subdulcis	ND	1.69
Amanita muscaria	ND	9.14
Amanita citrina	ND	6.81
Thelephora terrestris	ND	2.60
Ectomycorrhizas		
Laccaria laccata/Pseudotsuga menziesii	0.39	-
Cenococcum geophilum/ Pseudotsuga menziesii	0.77	-
Lactarius subdulcis/Fagus	ND	-
Lactarius quietus/Fagus	ND	-
Scleroderma citrinum/Quercus	ND	-
Paxillus involutus/Betula pendula	ND	-

NADP-GDH activity was detected (Table 2). In contrast, no amplification product was obtained for the 10 other fungi. This may indicate that the gene encoding NADP-GDH was not expressed in these fungi at least in the N-starved culture condition used for RNA extraction. Other nutritional conditions (To; $+NH_4^+$) were also tested to ensure that the lack of NADP-GDH transcript was not dependent on the N condition used.

The same set of primers was used to amplify NADP-GDH genes on genomic DNA, in order to overcome a potential transcriptional N regulation. A 380 bp genomic DNA corresponding to a NADP-GDH gene fragment, was amplified for *H. cylindrosporum*, *L. bicolor*, *C. geophilum*, *T. borchii* but also for *S. bovinus*. A set of degenerated primers was designed to amplify the GlnA cDNA fragment from the same mRNA populations. A 360 bp fragment coding for GS was identified in all fungi except for *T. terretris, T. populinum* and *B. edulis* (Table 2). Homologous primers of the *S. bovinus* NADP-GDH gene (SbGDH1 and SbGDH2) were further designed and used to confirm that amplification of the NADP-GDH gene in this fungus, was restricted to genomic DNA, while GS amplification products using the primers SbGS1 and SbGS2 were detected both for cDNA and genomic DNA.

Kinetics of glutamate and NH_4^+ uptake

Kinetics of glutamate and NH_4^+ uptake were measured in all ECM isolates used in the previous experiments, to check whether there could be a relation between N uptake capacities and NADP-GDH occurrence. After 6 days of N starvation, fungal colonies were transferred on 1 mM glutamate medium and glutamate uptake was estimated by glutamate consumption from the culture medium by GC-MS (Fig. 5). All fungal species were able to take up glutamate, although at various rates. *L. bicolor* was the most efficient in taking up glutamate whereas *T. borchii* showed the lowest capacity for glutamate uptake. A similar experiment was carried out with NH_4^+ as substrate, by measuring the disappearance of 1 mM NH_4^+ in the

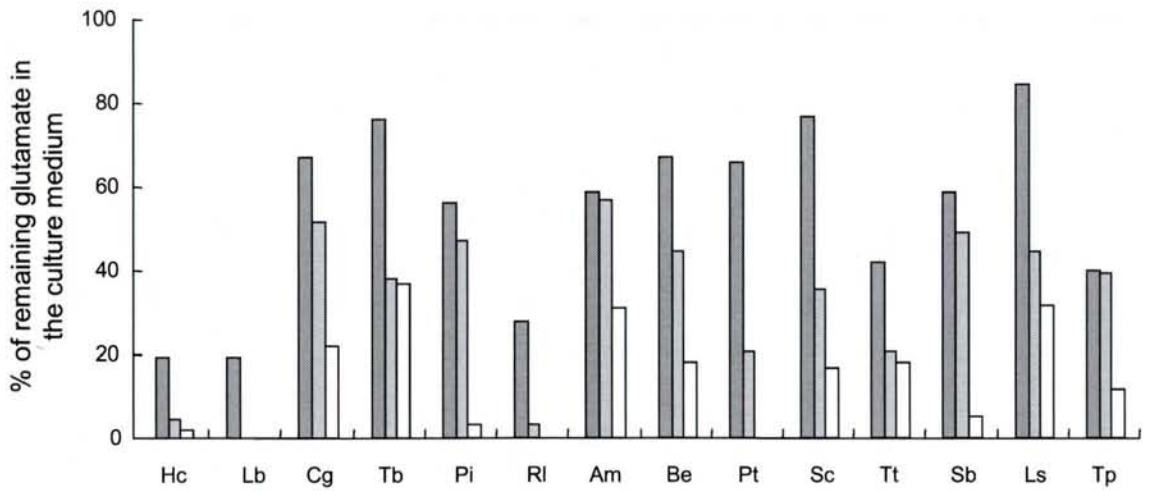


Fig. 5 Glutamate uptake measurement in various ECM fungi. Uptake was measured by the disappearence of 1 mM glutamate in the culture medium by GC-MS analysis. Results are expressed in percentage of remaining glutamate in the culture medium after 0h (black bars), 6h (dark grey bars), 12h (light grey bars) and 24 h (white bars). Hc : *Hebeloma cylindrosporum* ; Lb : *Laccaria bicolor;* Cg : *Cenococcum geophilum;* Tb : *Tuber borchii*; Pi : *Paxillus involutus*; Rl : *Rhizopogon luteolus;* Am : *Amanita muscaria;* Be : *Boletus edulis;* Pt : *Pisolithus tinctorius*; Sc : *Scleroderma citrinum;* Tt : *Thelephora terrestris;* Sb : *Suillus bovinus*; Ls : *Lactarius subdulcis* ; Tp : *Tricholoma populinum.*

culture medium (data not shown). All fungi were readily able to take up NH_4^+ at various rates. For both N sources, there was no obvious trend related to the presence or lack of NADP-GDH activity.

Discussion

There is much controversy on the contribution of NADP-GDH in NH_4^+ assimilation in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas (Table 4). The authors attribute the lack of NADP-GDH detection to regulatory systems dependent on external growth conditions. In the present study, we found by combining biochemical and molecular approaches, that ectomycorrhizal fungi may assimilate NH_4^+ ions without exhibiting any NADP-GDH function and we hypothesize that this peculiarity is an adaptative mechanism rather than a transitory regulation of NADP-GDH.

Two groups of fungi could be distinguished by combining ^{15}N data and enzymatic analyses. Group I (GDH^+ fungi) includes *H. cylindrosporum*-like fungi with both NADP-GDH and GS activities. *C. geophilum* presented high NADP-GDH and GS activities, *T. borchii* possessed a much higher NADP-GDH activity as compared to GS and *L. bicolor* presented low GS and NADP-GDH activities. Group II (GDH^- fungi) includes *P. involutus*-like fungi, i.e. *A. muscaria, R. luteolus, T. populinum, S. bovinus, B. edulis, S. citrinum, T. terrestris, L. subdulcis,* and *P. tinctorius* for which the NADP-GDH function was not detected and the GS solely involved in ammonium assimilation.

The molecular analysis is consistent with the biochemical results. No NADP-GDH transcripts were detected for the *P. involutus*-like fungi, which did not exhibit NADP-GDH function. It has been previously postulated that the fungal GDH could be repressed by the glutamine pool in *L. subdulcis*/birch ectomycorrhizas (Dell *et al.,* 1989; Martin *et al.,* 1986; Plassard *et al.,* 1997). However, in our study, the lack of NADP-GDH activity and transcripts

Table 4 Previous studies carried out on the fungal NADP-GDH protein using various techniques and fungal strains. ND : not detected

Fungus species	GDH	***Methods of detection***	References
Laccaria bicolor	+	Activity	Botton and Dell, 1994
		Immunological tests	Brun *et al.*, 1992, 1993, 1994
			Lorillou *et al.*, 1996
Cenococcum geophilum	+	Activity	Dell *et al.*, 1989
		Immunological tests	Martin *et al.*, 1988
		^{15}N incorporation	Martin *et al*, 1983
Hebeloma crustiliniforme	+	Activity	Dell *et al.*, 1989
		Immunological tests	
Hebeloma cylindrosporum	+	Activity	Chalot *et al.*, 1991
		Gene expression	Javelle *et al.*, 2003
Tuber borchii	+	Activity	Vallorani *et al.*, 2002
		Gene expression	
Suillus bovinus	ND	Activity	Grotjohann *et al.*, 2000
Scleroderma verrucosum	ND	Activity	Botton and Dell, 1994
Lactarius subdulcis	ND	Activity	Martin *et al.*, 1986
Paxillus involutus	ND	Activity	Dell *et al.*, 1989
		Immunological tests	Chalot *et al.*, 1994
Pisolithus tinctorius	ND	Activity	Botton and Dell, 1994
		^{15}N incorporation	Kershaw and Stewart, 1992

was observed for *L. subdulcis* and other fungi, independently of the glutamine concentration. This led us to suggest that the lack of detectable NADP-GDH function in these species was not due to the nitrogen catabolic repression (NCR) as described for *S. cerevisiae* (Riego *et al.*, 2002), *T. borchii* (Vallorani *et al.*, 2002) and *H. cylindrosporum* (Javelle *et al.*, 2003). These studies have described the role of glutamine in NADP-GDH regulation at a transcriptional level where glutamine or NH_4^+ acts directly to signal N sufficiency. In the present study, glutamine-depleted mycelia of "group II" fungi did not exhibit any NADP-GDH activity. Moreover, no correlation could be found between glutamate or NH_4^+ uptake capacity, suggesting that the fungi do not compensate the lack of NADP-GDH activity, by an increased glutamate or NH_4^+ uptake capacity. Additionally, *in situ* analyses of sporocarps or ectomycorrhizas of several species confirm our results obtained with pure culture fungi. This suggests that the presence of a functional NADP-GDH depends solely on the fungal species and that the lack of functional NADP-GDH is not due to a transitional regulation in response to changes in N pools.

According to (Léjohn, 1971), more than 40 species of lower fungi, myxomycetes, phycomycetes and zygomycetes, were found to possess only a NAD-linked GDH. The higher fungi, ascomycetes and basidiomycetes, seem to produce the two distinct forms of the enzyme, the NAD-linked and the NADP-linked GDH. The author concluded that the NADP-GDH function was gained by ascomycetes and basidiomycetes during evolution. We confirmed the presence of an active NADP-GDH in the ECM ascomycetes *C. geophilum* and *T. borchii*, as already demonstrated for the ascomycetes *Debaryomyces hansaneii* (Alba-Lois *et al.*, 2004), *Schizosaccharomyces pombe* (Perysinakis *et al.*, 1994), *Penicillium chrysogenum* (Diez *et al.*, 1999), *Kluyveromyces lactis* (Romero *et al.*, 2000), *Schawanniomyces occidentalis* (De Zoysa *et al.*, 1991), *N. crassa* (Stillman *et al.*, 1995), *S. cerevisiae* (Deluna *et al.*, 2001), and *Aspergillus nidulans* (Hawkins *et al.*, 1989). Concerning

basidiomycetes, we found that some of them exhibited the NADP-GDH function (*H. cylindrosporum*, *L. bicolor*) as stated by (Léjohn, 1971), and as already found for *Pleurotus ostreatus* (Chakraborty *et al.,* 2003), *Schizophyllum commune* (Dennen and Niederpruem 1967), *Coprinus cinereus* (Al-GharawiandMoore, 1977) and *Agaricus bisporus* (Schaap *et al.,* 1996). However, the present work also showed that among the ECM species tested, 10 basidiomycetes did not possess an active NADP-GDH.

Based on the phylogeny of homobasidiomycetes inferred from rDNA sequences by (Hibbett *et al.,* 2000), the ECM species studied fall into one of the three clades of basidiomycetes, namely the euagaric, the bolete and the thelephoroid (Fig. 6). The thelephoroid and bolete clades include only GDH^- fungi, whereas the euagaric clade includes both GDH^- (i.e. *L. subdulcis*) and GDH^+ (i.e. *H. cylindrosporum*) fungi. Based on these observations, we confirm the gain of NADP-GDH function in ascomycetes but we cannot confirm a simple gain of function in basidiomycetes, as proposed by (Léjohn, 1971). We rather suggest that either a loss succeeded to a gain of NADP-GDH function in the GDH^- basidiomycetes or that the NADP-GDH was never gained in the GDH^- basidiomycetes. Whether this lack of NADP-GDH function is concomitant to a lack of GDHA gene needs further consideration. In our study, the lack of transcript was correlated with the lack of amplification products on genomic DNA, except for *S. bovinus*. The plasticity of eucaryotic genome is lower than bacterial genomes but an evolutionary scenario includes a massive gene loss in the fungal clade (Krylov *et al.,* 2003). However, the scenario of NADP-GDH gene loss has to be excluded because of the detection of the NADP-GDH gene in *S. bovinus*. Furthermore, in all fungal genomes sequenced up to now, all contain a NADP-GDH coding gene, including the ascomycetes *Neurospora crassa*, *Podospora anserina*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea* and the Basidiomycetes *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *Coprinus cinereus* and *Phanerochaete chrysosporium*, some of

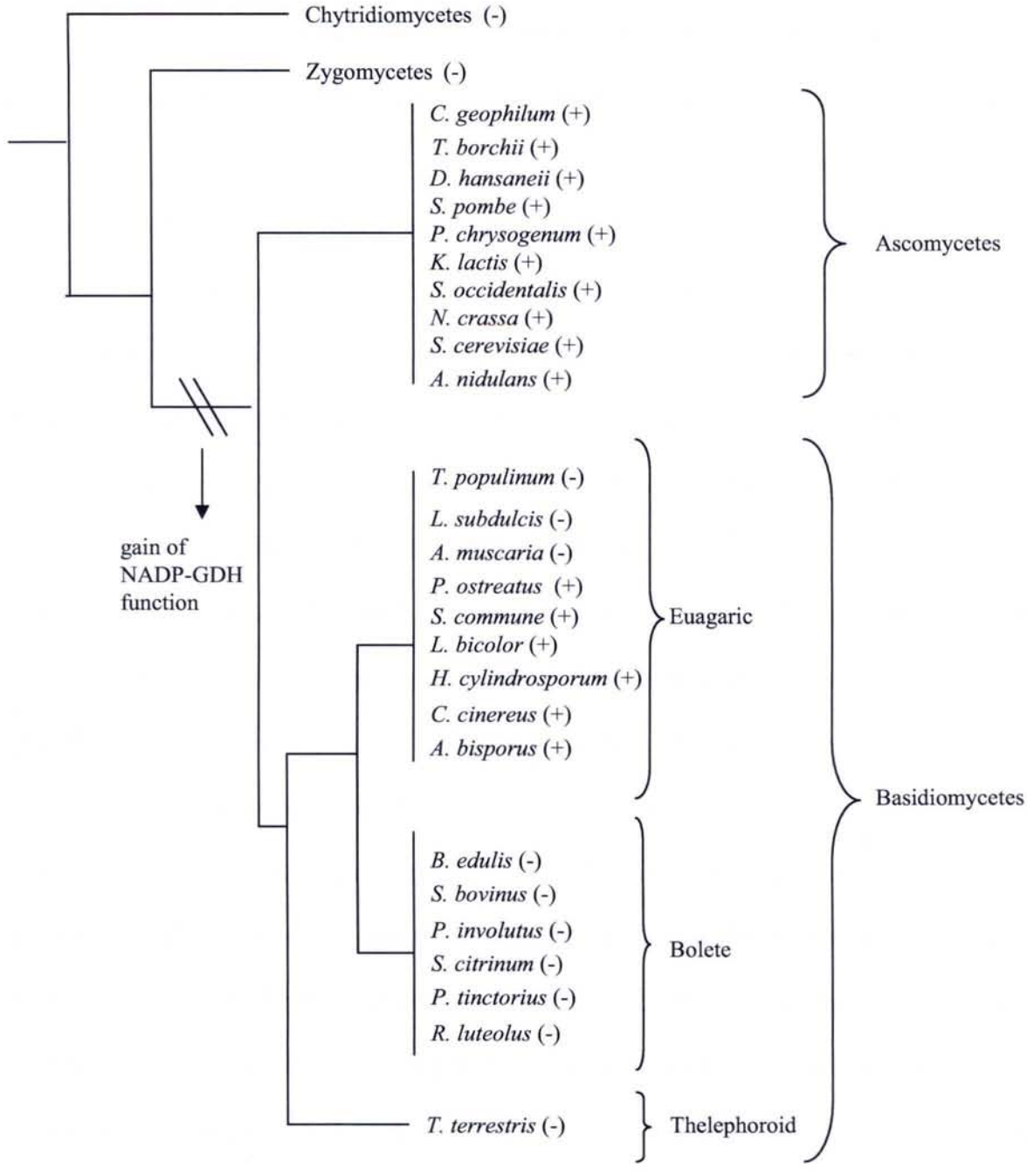


Fig. 6 Diagram of simplified fungal tree according to and showing that the lack of NADP-GDH function could be the consequence of multiple evolutive events. (-) represents the lack and (+) represents the presence of NADP-GDH function. The putative gain of NADP-GDH function is represented by a double bar according to . The fungal species mentioned are those for which a NADP-GDH function was demonstrated, either in the present work, or in previous studies: *Debaryomyces hansaneii* , *Schizosaccharomyces pombe* , *Penicillium chrysogenum* , *Kluyveromyces lactis* , *Schawanniomyces occidentalis* , *Neurospora crassa* , *Saccharomyces cerevisiae* , *Aspergillus nidulans* , *Pleurotus ostreatus* , *Schizophyllum commune* , *Coprinus cinereus* , *Agaricus bisporus* .

which are available (Cardoza *et al.,* 1998; Deluna *et al.,* 2001; Hernandez *et al.,* 1983). Given these facts, we might conclude that the NADP-GDH coding gene is probably present in all fungal genomes but not translated.

The propensity of a function to be lost during evolution seems to be a direct consequence of its biological importance (Krylov *et al.,* 2003). The NADP-GDH function could have been lost because there is little benefit derived from expressing genes constitutively, when they are required for growth under a limited range of conditions. Furthermore, the apparent lower affinity of NADP-GDH than GS for NH_4^+ in ECM fungi (Brun *et al.,* 1992), supports the fact that GS is the main route for NH_4^+ assimilation at low NH_4^+ concentrations, while NADP-GDH acts preferentially in excess NH_4^+ in fungi (Martin, 1991). The NADP-GDH has a vey low affinity for its substrate, ammonium, In forest soils, the GDH^- fungi *P. involutus*, *L. subdulcis, A. muscaria, S. bovinus, P. tinctorius* and *T. terrestris* are considered as humus specific species (El-Badaoui and Botton, 1989; Heinonsalo *et al.,* 2001) whereas the GDH^+ fungi *H. cylindrosporum*, *T. borchii* and *L. laccata* are found preferentially in a mineral horizon, i.e. with a poor humus layer (Arnolds, 1989). Humus is mainly composed of organic nitrogen sources (amino acids, proteins), and it is also known to be rich in carbon compounds such as cellulose and hemicellulose, some polymers of glucose which may constitute between 10 and 50% of the litter mass (Berg and Mcclaugherty, 2003). In organic soils, the presence of NADP-GDH would be dispensable, especially because ECM fungi have the capacity to directly take up amino acids (including glutamate), as previously demonstrated (Abuzinadah and Read, 1986; Chalot *et al.,* 1994). Thus, the loss of NADP-GDH function is probably a consequence of an adaptation to specific environmental conditions.

Aknowledgments

We acknowledge financial support from the "Institut Français de la Biodiversité (IFB)". The research utilized the DNA Sequencing and Functional Genomics Facilities at INRA-Nancy financed by the INRA and Région Lorraine through the "Institut Fédérateur de Recherche N° 110". We thank Christine Delaruelle for sequencing, Sylvain Jeandroz for helpful discussions, Patrice Vion and Barbara Montanini for providing some fungal strains.

References

Abuzinadah RA, Read DJ. 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **103:** 481-493.

Al-Gharawi A, Moore D. 1977. Factors affecting the amount and the activity of the glutamate dehydrogenases of *Coprinus cinereus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **496:** 95-102.

Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdes-Lopez V, Deluna A, Cardenas R. 2004. NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiol*ogy **48:** 68-72.

Arnolds E. 1989. A preliminary red data list of macrofungi in the Netherlands. *Persoonia* **14:** 77-125.

Berg B, Mcclaugherty C. 2003. Plant litter. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 50-52.

Botton B, Dell B. 1994. Expression of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist* **126:** 249-257.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72:** 248-254.

Bro C, Regenberg B, Nielsen J. 2004. Genome-wild transcriptional response of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with an altered redox metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* **85:** 269-276.

Brun A, Chalot M, Botton B, Martin F. 1992. Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiology* **99:** 938-944.

Brun A, Chalot M, Botton,B. 1993. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*: occurence and immunogold localization in the free living mycelium. *Life Sciences Advances of Plant Physiology* **12 :** 53-60

Brun A, Chalot M, Duponnois R, Botton B. 1994. Immunogold localization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas fir ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* **5:** 139-144.

Campbell IM. 1974. Incorporation and dilution values: their calculation in mass-spectrally assayed stable isotope labelling experiments. *Bio-organic Chemistry* **3:** 386-397.

Cardoza RE, Moralejo FJ, Gutierrez S, Casqueiro J, Fierro F, Martin JF. 1998. Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the gdhA gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Current Genetics* **34:** 50-59.

Chakraborty TK, Das N, Mukherjee M. 2003. Evidences of high carbon catabolic enzyme activities during sporulation of *Pleurotus ostreatus* (Florida). *Journal of Basic Microbiology*. **43:** 462-467.

Chalot M, Brun A, Finlay RD, Söderström B. 1994. Respiration of [14C]alanine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *FEMS Microbiology Letters* **121:** 87-91.

Chalot M, Stewart GR, Brun A, Martin F, Botton B. 1991. Ammonium assimilation by spruce-*Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. *New Phytologist* **119:** 541-550.

De Zoysa PA, Connerton IF, Watson DC, Johnston JR. 1991. Cloning, sequencing and expression of the *Schwanniomyces occidentalis* NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene. *Current Genetics* **20:** 219-224.

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

Dell B, Botton B, Martin F, Le Tacon F. 1989. Glutamate dehydrogenase in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L) and beech (*Fagus sylvatica* L). *New Phytologist* **111:** 683-692.

Deluna A, Avendano A, Riego L, Gonzalez A. 2001. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Biochemistry* **276:** 43775-43783.

Dennen DW, Niederpruem DJ. 1967. Regulation of glutamate dehydrogenases during morphogenesis of *Schizophyllum commune*. *Journal of Bacteriology*. **93:** 904-913.

Diez B, Mellado E, Rodriguez M, Bernasconi E, Barredo JL. 1999. The NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from *Penicillium chrysogenum* and the construction of expression vectors for filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52:** 196-207.

El-Badaoui K, Botton B. 1989. Production and characterization of exocellular proteases in ectomycorrhizal fungi. *Annales de Sciences Forestières. Forest Tree Physiology, E. Dreyer et al., eds Elsevier/INRA* **46 suppl.:** 728s-730s.

Genetet I, Martin F, Stewart GR. 1984. Nitrogen assimilation in mycorrhizas. Ammonium assimilation in the N-starved ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *Plant Physiology* **76:** 395-399.

Glevarec G, Bouton S, Jaspard E, Riou MT, Cliquet JB, Suzuki A, Limami AM. 2004. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* **219:** 286-297.

Grotjohann N, Kowallik W, Huang Y, Schulte in den Baumen, A. 2000. Investigations into enzymes of nitrogen metabolism of the ectomycorrhizal basidiomycete, *Suillus bovinus* *Z Naturforsch [C]*. **55 :** 203-12

Hawkins AR, Gurr SJ, Montague P, Kinghorn JR. 1989. Nucleotide sequence and regulation of expression of the *Aspergillus nidulans* gdhA gene encoding NADP dependent glutamate dehydrogenase. *Molecular and General Genetics*. **218:** 105-111.

Heinonsalo J, Jorgensen KS, Sen R. 2001. Microcosm-based analyses of Scots pine seedling growth, ectomycorrhizal fungal community structure and bacterial carbon utilization profiles in boreal forest humus and underlying illuvial mineral horizons. *FEMS Microbiology Ecology* **36:** 73-84.

Hernandez G, Sanchez-Pescador R, Palacios R, Mora J. 1983. Nitrogen source regulates glutamate dehydrogenase NADP synthesis in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **154:** 524-528.

Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* **407:** 506-508.

Huang GC, Meng SD, Wang R, Tian B. 2002. Cloning of glutamate dehydrogenase cDNA from *Chlorella sorokiniana* and analysis of transgenic tobacco plants. *Acta Botanica Sinica* **44:** 318-324.

Inokuchi R, Kuma KI, Miyata T, Okada M. 2002. Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenic and physiological perspectives. *Physiologia Plantarum* **116:** 1-11.

Javelle A, Morel M, Rodriguez-Pastrana BR, Botton B, Andre B, Marini AM, Brun A, Chalot M. 2003. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology* **47:** 411-430.

Kershaw JL, Stewart GR. 1992. Metabolism of ^{15}N-labelled ammonium by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch. *Mycorrhiza* **1:** 71-77.

Kisaka H, Kida T. 2003. Transgenic tomato plant carrying a gene for NADP-dependant glutamate dehydrogenase (*gdhA*) from *Aspergillus nidulans*. *Plant Science* **164:** 35-42.

Krylov DM, Wolf YI, Rogozin IB, Koonin EV. 2003. Gene loss, protein sequence divergence, gene dispensability, expression level and interactivity are correlated in eukaryotic evolution. *Genome research* **13:** 2229-2235.

Lawit SJ, Miller PW, Dunn WI, Mirabile JS, Schmidt RR. 2003. Heterologous expression of cDNAs encoding *Chlorella sorokiniana* NADP-specific glutamate dehydrogenase wild-type and mutant subunits in *Escherichia coli* cells and comparison of kinetic and thermal stability properties of their homohexamers. *Plant Molecular Biology* **52:** 605-616.

Léjohn Hb. 1971. Enzyme regulation, lysine pathways and cell wall structures as indicators of major lines of evolution in fungi. *Nature* **231:** 164-168.

Lorillou S, Botton B, Martin F. 1996. Nitrogen source regulates the biosynthesis of NADP-glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* **132:** 289-296.

Magalhaes JR, Ju GC, Rich PJ, Rhodes D. 1990. Kinetics of $^{15}NH_4$ assimilation in *Zea mays*. *Plant Physiology* **94:** 647-656.

Martin F. 1991. Nuclear magnetic resonance studies of ectomycorrhizal fungi. *Methods in Microbiology, ed Read, DJ, Varma, AK. Academic Press, New York.* **23:** 121-148.

Martin F, Chalot M, Brun A, Lorillou S, Botton B, Dell B. 1992. Spatial distribution of nitrogen assimilation pathways in ectomycorrhizas. *Read D, Lewis D, Fitter A, Alexander I, eds. Mycorrhizas in ecosystems. Wallingford: C. A. B. International* 311-315.

Martin F, Côté R, Canet D. 1994. NH_4^+ assimilation in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, a ^{15}N-NMR study. *New Phytologist* **128:** 479-485.

Martin F, Msatef Y, Botton B. 1983. Nitrogen assimilation in mycorrhizas. I. Purification and properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme. New Phytologist* **93 :** 415-422

Martin F, Stewart GR, Genetet I, Le Tacon F. 1986. Assimilation of $^{15}NH_4^+$ by beech (*Fagus sylvatica* L) ectomycorrhizas. *New Phytologist* **102:** 85-94.

Martin F, Stewart GR, Genetet I, Mourot B. 1988. The involvement of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonium assimilation by the rapidly growing ectomycorrhizal ascomycete, *Cenococcum geophilum*, Fr. *New Phytologist* **110:** 541-550.

Marzluf GA. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **61:** 17-32.

Masclaux-Daubresse C, Valadier MH, Carrayol E, Reisdorf-Cren M, Hirel B. 2002. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment* **25:** 1451-1462.

Mawhinney TP, Robinett RS, Atalay A, Madson MA. 1986. Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **358:** 231-242.

Melo-Oliveira R, Oliveira IC, Coruzzi GM. 1996. Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA* **93:** 4718-4723.

Montanini B, Betti M, Marquez AJ, Balestrini R, Bonfante P, Ottonello S. 2003. Distinctive properties and expression profiles of glutamine synthetase from a plant symbiotic fungus. *Biochemical Journal* **373:** 357-368.

Perysinakis A, Kinghorn JR, Drainas C. 1994. Biochemical and genetical studies of NADP-specific glutamate dehydrogenase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* **26:** 315-320.

Plassard C, Chalot M, Botton B, Martin F. 1997. Le rôle des ectomycorhizes dans la nutrition azotée des arbres forestiers. *Revue Forestière Française* **49:** 82-98.

Riego L, Avendano A, Deluna A, Rodriguez E, Gonzalez A. 2002. *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293:** 79-85.

Romero M, Guzman-Leon S, Aranda C, Gonzalez-Halphen D, Valenzuela L, Gonzalez A. 2000. Pathways for glutamate biosynthesis in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* **146:** 239-245.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TA. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

Schaap PJ, Muller Y, Baars JJ, Op Den Camp HJ, Sonnenberg AS, Van Griensven LJ, Visser J. 1996. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding NADP+- dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) from *Agaricus bisporus*. *Molecular and General Genetics* **250:** 339-347.

Selosse MA, Durrieu G. 2004. Une classification mycologique phylogénétique francophone (en 2003). *Acta Botanica Gallica* **151:** 73-102.

Shiparo BM, Stadtman ER. 1970. Glutamine synthetase. *Methods in enzymology. Ed Tabord H, Tabord CW. Academic Press, New York, London.* **17A:** 910-922.

Stewart G, Moore D. 1974. The activities of glutamate dehydrogenase during mycelial growth and sporophore development in *Coprinus lagopus* (sensu Lewis). *Journal of General Microbiology* **86:** 73-81.

Stillman TJ, Yip KS, Rice DW, Fuentes AM, Connerton I. 1995. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Neurospora crassa. Acta Crystallographica D Biological Crystallography.* **51:** 837-839.

Teichert S, Schonig B, Richter S, Tudzynski B. 2004. Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. *Molecular Microbiology* **53:** 1661-1675.

Ter Schure EG, Silljé EG, Raeven LJRM, Boonstra J, Verkleij AJ, Verrips CT. 1995. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae. Microbiology* **141:** 1101-1108.

Vallorani L, Polidori E, Sacconi C, Agostini D, Pierleoni R, Piccoli G, Zeppa S, Stocchi V. 2002. Biochemical and molecular characterization of NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii. New Phytologist* **154:** 779-790.

Wiame JM, Grenson M, Arst HN Jr. 1985. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in Microbial Physiology* **26:** 1-88.

Section 4- Conclusions générales et perspectives

L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit visait à mieux comprendre comment les champignons ectomycorhiziens s'adaptent aux contraintes environnementales en particuliers dans des sols forestiers présentant des profils azotés variables, et comment ils exploitent les ressources du sol pour permettre un fonctionnement efficace de l'organe symbiotique. L'objectif principal était de mieux comprendre les mécanismes de régulation mis en place par le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* et les ectomycorhizes en fonctions de différentes conditions azotées.

1- La première partie a consisté en l'étude de l'expression d'un millier de gènes dans le mycélium extramatriciel comparativement aux ectomycorhizes, au sein de l'association *Paxillus involutus*/*Betula pendula* en microcosme.

Publication 1 : Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizal symbiosis (Morel et al., 2005 Applied and Environmental Microbiology 71 (1) p382-391)

Le microcosme utilisé a permis de produire et d'étudier la structure absorbante des systèmes ectomycorhiziens : le mycélium extramatriciel. L'approche par filtre à ADNc a permis d'avoir accès à la régulation des gènes dans ce tissu qui se développe abondamment dans les sols forestiers, à la recherche de nutriments. Environ 20% des gènes uniques étudiés sont différentiellement exprimés dans ce tissu comparativement au mycélium directement en contact avec la racine (réseau de Hartig et manteau). Ces gènes concernent des fonctions comme le transport, la synthèse protéique ou le métabolisme des lipides. Il existe donc une régulation spatiale de l'expression des gènes au sein du système symbiotique, suggérant un rôle spécifique de chacun des tissus. Parmi les gènes les plus régulés, trois ont été plus précisément caractérisés : un transporteur d'urée, surexprimé dans le mycélium extramatriciel,

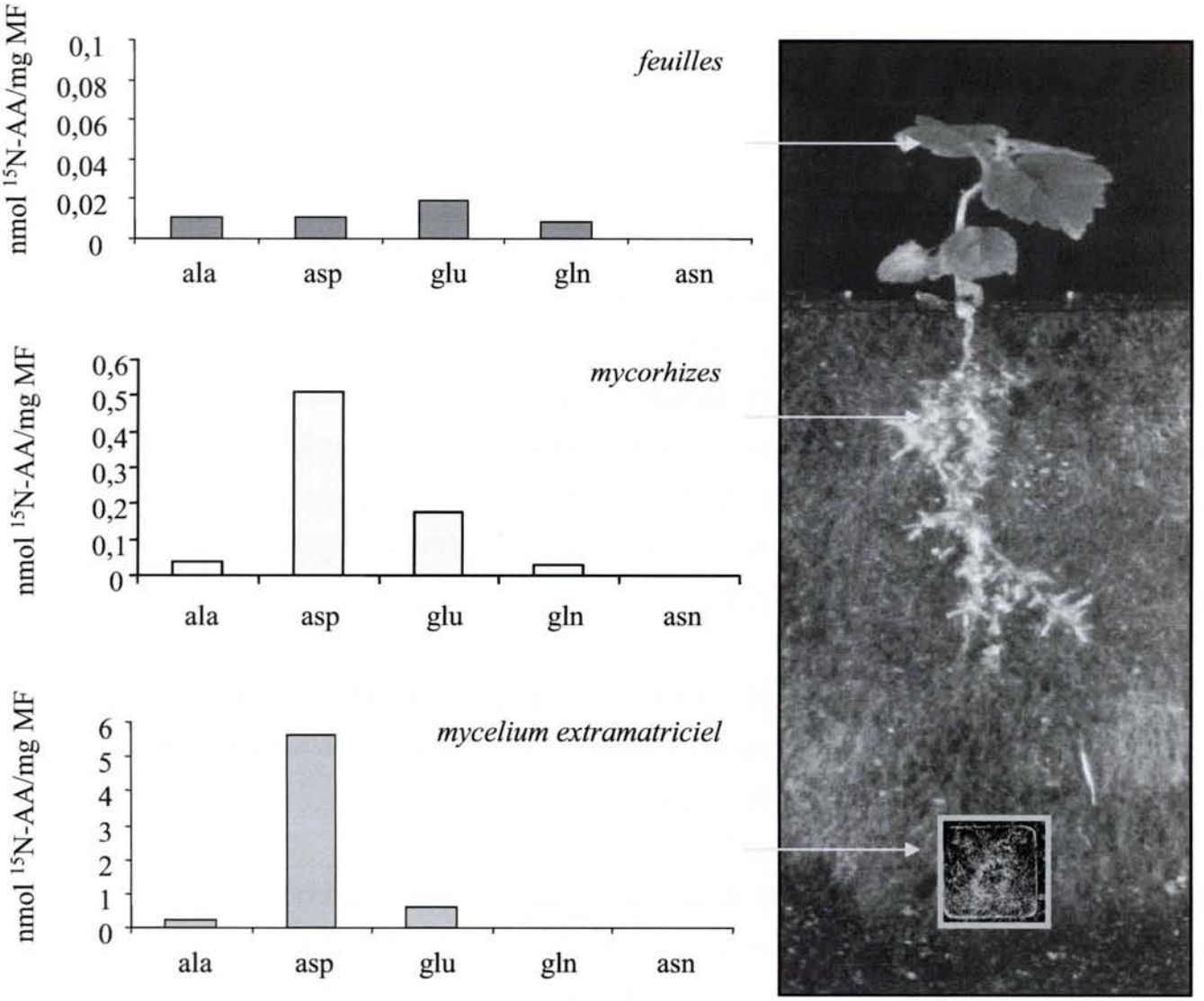


Figure 29 : Transfert de composés azotés marqués fournis par des patches de litière 15N au sein du système ectomycorhizien *Paxillus involutus/Betula pendula* en microcosme.
Les histogrammes montrent la quantité d'acides aminés marqués dans les différents compartiments du système symbiotique.

une phosphatidylserine decarboxylase et une protéine de fonction inconnue, appelée CipC, qui sont très fortement surexprimées dans les mycorhizes. Cette approche globale, réalisée sans à priori à donc permis de cribler des gènes d'intérêt d'un point de vue du fonctionnement symbiotique.

Pour cette étude, le microcosme était seulement constitué de tourbe humide, aucun apport nutritif n'a été ajouté. L'étape suivante était donc d'enrichir ce microcosme en azote. Des études préliminaires ont permis de prouver que le microcosme était capable d'utiliser une source d'azote organique, apportée sous forme de patches de litière marquée à l'^{15}N et de la transférer à la plante (Figure 29). En effet, de l'alanie, de l'aspartate, du glutamate et de la glutamine marqués ont été détectés dans les feuilles de bouleau. L'analyse de l'expression des gènes dans cette condition permettra de savoir comment le système symbiotique modifie l'expression de certains de ses gènes et par conséquent s'adapte en fonction d'un enrichissement azoté.

2- Le deuxième objectif était la caractérisation de trois des gènes d'intérêt criblés grâce à l'approche présentée ci-dessus, codant un transporteur d'urée, une phosphatidylserine decarboxylase et une protéine de fonction inconnue (CipC).

Publication 2 : Characterization and regulation of PiDUR3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomycorrhizal fungus Paxillus involutus (Morel et al., soumis à Molecular Microbiology)

La capacité de *Paxillus involutus* à utiliser l'urée comme seule source d'azote a été mise en évidence par cette étude. La caractérisation du gène codant un transporteur d'urée (PiDur3) montre que son expression est soumise à la répression catabolique azotée, notamment par l'intermédiaire des pools intracellulaires de glutamine. De plus, l'expression du gène PiDUR3 et l' activité de la protéine correspondante sont étroitement liées à l'activité uréase, qui permet le catabolisme de l'urée en ammonium. Ceci suggère que *P. involutus* est capable d'incorporer de l'urée mais pas de le stocker. L'urée absorbée est en effet immédiatement dégradée en ammonium qui est lui-même métabolisé en glutamine par la glutamine synthétase permettant ultérieurement la synthèse des autres acides aminés dérivés, comme le glutamate, l'aspartate ou l'alanine.

Les perspectives de ce travail s'orientent vers des approches in situ, pour tenter de mieux appréhender l'importance de l'urée dans les sols forestiers et les capacités du champignon et des mycorhizes à utiliser cette source azotée particulière.

Publication 3: Molecular characterization of a new type of phosphatidylserine decarboxylase in *Paxillus involutus* (Morel et al., en préparation).

Des analyses phylogénétiques montrent que la protéine identifiée chez *P. involutus* (PiPSD) est un membre d'un nouveau groupe de la famille des phosphatidylserine decarboxylases (PSD), pas encore évoqué chez d'autres organismes. Deux types de PSD ont été caractérisées chez *Saccharomyces cerevisiae* (PSD1 et PSD2). Le nouveau groupe identifié a alors été nommé PSD3. L'alignement de séquences de plusieurs organismes allant des bactéries jusqu'aux mammifères a permis d'identifier une zone très conservée, reconnue comme étant spécifique de la famille des PSD grâce à l'outil bioinformatique PSI-PHI BLAST. Une signature a ensuite été proposée pour l'identification des PSDs. La régulation génique de PiPSD montre que le gène est soumis à la répression catabolique azotée. Des tests d'activités sont actuellement en cours de réalisation par l'équipe du Pr Voelker (Denver, USA) sur des extraits de *P. involutus* cultivés dans des conditions de carence en azote, enrichie en ammonium avec ou sans phosphinothricine, un inhibiteur spécifique de la glutamine synthétase, ou enrichie en glutamine. Les résultats permettront de corréler les variations de transcrits observés par RT-PCR aux activités enzymatiques. Les dosages d'activités en fonction du développement des mycorhizes, comparativement au champignon et aux racines de bouleau en culture pure permettront aussi de confirmer l'importance de cette enzyme au sein de l'organe symbiotique. L'hypothèse émise concernant son rôle dans le métabolisme des phospholipides potentiellement fournis au champignon par la plante demande à être vérifiée par des expériences de marquage au ^{14}C et d'analyse de lipides. Des premiers résultats de dosages de phospholipides dans le champignon en culture pure et les mycorhizes montrent que les lipides majoritairement présents sont des glycosyl diglycerides (mono- et di-galactosyl diglycerides) pour lesquels la quantification n'a pas pu être réalisée. Cette accumulation pourrait être due à une production de glycolipides au lieu de phospholipides, phénomène généralement observé pour les plantes et les champignons en conditions de carence en phosphate. En effet, les échantillons analysés ont été cultivés sur un milieu appauvri en azote et phosphate pour favoriser la synthèse des mycorhizes. Enfin, le séquençage du génome de *Laccaria bicolor* permettra l'accès aux séquences d'éventuels

autres gènes codant des PSDs. En effet, le génome de *Phanerochaete chrysosporum* a révélé que ce basidiomycète possèdait plusieurs types de PSD, suggérant la possibilité pour les champignons ectomycorhiziens de posséder également plusieurs gènes de la famille des PSDs. Leur caractérisation permettra de mieux comprendre leur rôle respectif dans le fonctionnement de l'organe symbiotique, au niveau structural, en terme de réorganisation membranaire, et fonctionnel, en terme de transfert de composés carbonés entre les deux partenaires. L'étude d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse des phospholipides pourrait être envisagée pour mieux comprendre le rôle du métabolisme des lipides dans les ectomycorrhizes.

Publication 4: Characterization of two fungal specific proteins in the ectomycorrhizal fungus *P. involutus* and ectomycorrhizas. (Morel et al., en préparation)

La caractérisation des deux gènes de *P. involutus* (CipC1 et CipC2) homologues à la CipC (Concanamycin induced protein) de *Emericella nidulans* a été entreprise au cours de ce travail de thèse. L'analyse des séquences protéiques suggère que ces protéines, dont les séquences n'ont été trouvées que chez les champignons, seraient impliquées dans des cascades de régulation régissant l'expression de certains gènes et notamment certains gènes responsables de la différentiation des hyphes fongiques. La protéine CipC2 a été produite chez *Escherichia Coli* et son expression montre une faible activation dans les mycorhizes par rapport au champignon en culture pure. Les premiers résultats d'étude d'expression des gènes codant CipC1 et CipC2 montrent que l'expression de CipC1 dépend de l'activité glutamine synthétase. D'autres expérimentations sont actuellement en cours ou envisagées pour compléter ces résultats préliminaires. Cependant, la fonction de ces protéines étant inconnue et l'inactivation des gènes correspondants étant impossible chez *Paxillus involutus*, leur caractérisation reste difficile. Les expériences à réaliser viseront à préciser leur rôle putatif dans la différentiation ramifiée des hyphes fongiques et le lien qu'elles peuvent avoir avec l'azote et plus précisément la glutamine synthétase.

3- **La troisième partie de mon travail s'intègre dans la compréhension des mécanismes d'absorption de l'azote (minéral et organique) et de son assimilation, chez les champignons ectomycorhiziens.**

Publication 5 : Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (Gs, NADP-Gdh) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* (Javelle et al., 2003 Molecular Microbiology 47 (2) p 411-430).

Cette étude a été menée chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. La régulation des gènes codant les trois transporteurs d'ammonium (AMT1, AMT2 et AMT3), la glutamate deshydrogénase (GDHA) et la glutamine synthétase (GLNA) d'*H. cylindrosporum* a été étudiée en fonction de différentes conditions azotées. Les résultats montrent que AMT1, AMT2 et NADP-GDH sont surexprimés en conditions de carence azotée, alors que AMT3 et GLNA apparaissent peu régulés au niveau transcriptionnel. L'analyse des concentrations intracellulaires des différents acides aminés et de l'ammonium montrent que la glutamine est responsable de la répression de l'expression de AMT1 et AMT2 et l'ammonium de celle de GDHA. De plus, un second niveau de régulation existe. En effet, il apparaît que l'ammonium inhibe l'activité des Amts alors que les activités enzymatiques Gs et Gdh ne sont que très peu régulées.

Publication 7 : Isolation and characterization of two peptide transport genes from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* (Benjdia et al., en préparation).

D'autres travaux ont consisté à caractériser l'absorption d'azote organique par *H. cylindrosporum* en collaboration avec Daniel Wipf (Université de Tûbingen, Allemagne).
Au cours de cette étude deux transporteurs de peptides ont été isolés et caractérisés (PtrA et PtrB). Ma contribution à ce travail a été l'étude de l'expression de ces deux gènes en fonction de différentes conditions nutritives. Les résultats montrent que PTR2A est surexprimé en condition de carence en acides aminés intracellulaires. Le transport de peptides est alors soumis à la répression catabolique azotée au même titre que les transporteurs d'ammonium. En revanche, l'analyse de l'expression de PTR2B ne présente pas de variation d'expression en fonction des conditions azotées, suggérant qu'il est insensible au contrôle azoté. Par comparaison avec PTR3 de *S. cerevisiae*, qui n'est pas non plus régulé par l'azote, il a été

suggéré que PTR2B était impliqué dans les mécanismes de régulation du prélèvement de peptides et d'acides aminés.

Publication 6 : The NADP dependant Glutamate dehydrogenase : a dispensable function in ectomycorrhizal fungi. (Morel et al., soumis dans New Phytologist)

Grâce à l'utilisation de différentes techniques biochimiques, moléculaires et isotopiques, et à l'étude de diverses souches fongiques, nous avons confirmé que la contribution de la glutamate deshydrogénase à NADP (NADP-GDH) dans l'assimilation de l'ammonium n'est pas indispensable dans les processus d'assimilation d'ammonium pour différentes souches fongiques. Deux groupes de champignons ont pu être distingués: les GDH^+ incluant *Hebeloma cylindrosporum*, qui possèdent une NADP-GDH fonctionnelle et les GDH^- comme *Paxillus involutus* pour lesquels aucune activité NADP-GDH ni aucun transcrit n'a été détecté, quelque soient les conditions azotées testées. L'absence d'expression de la NADP-GDH observée pour certains champignons, n'est donc pas due à des régulations transcriptionnelles par l'azote comme cela a été démontré pour de nombreux gènes codant des protéines du métabolisme azoté. Ces résultats confirment que la fonction NADP-GDH est dispensable chez les champignons ectomycorhiziens, ce qui lui confère un rôle mineur dans l'assimilation de l'ammonium. Nous avons émis l'hypothèse que cette absence de fonction pourrait être une adaptation évolutive en relation avec la niche écologique des champignons, plutôt qu'une régulation transitoire de l'expression du gène en fonction des conditions azotées variables de l'environnement.

Les perspectives de ce travail sont de tenter de comprendre les causes exactes de cette diversité et leurs implications écologiques et évolutives. Les raisons pour lesquelles le gène codant la NADP-GDH n'est pas exprimé chez certains champignons pourraient être élucidées en partie grâce à l'analyse des séquences de ces gènes. On peut supposer que le gène codant la NADP-GDH est présent dans les différentes souches étudiées mais qu'il a été rendu inactif par des évenements de mutations ou transpositions par exemple.

Section 5- Références bibliographiques

Abuzinadah RA, Read DJ (1986a) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. New Phytologist 103 : 481-493

Abuzinadah RA, Read DJ (1986b) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. II. Utilization of protein by mycorrhizal plants of *Pinus contorta*. New Phytologist 103 : 495-506

Abuzinadah RA, Read DJ (1986c) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. III. Protein utilization by *Betula*, *Picea* and *Pinus* in mycorrhizal association with *Hebelom crustuliniforme*. New Phytologist 103 : 507-514

Abuzinadah RA, Read DJ (1989) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. IV. The utilization of peptides by birch (*Betula pendula*) infected with different mycorrhizal fungi. New Phytologist 112 : 55-60

Ageger R (1991) Characterization of ectomycorrhiza. Methods in Microbiology 23: 25-73

Ageger R (1995) Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Mycorrhiza structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology (eds A.K. Varma and B. Hock). Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 685-734

Ageger R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae: a proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. Mycorrhiza 11: 107-114

Ahonen-Jonnarth U, Finlay RD (2001) Effects of evated nickel and cadmium concentrations on growth and nutrient uptake of mycorrhizal and non-mycorrhizal *pinus sylvestris* seedlings. Plant and Soil 236 (2) : 129-138

Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, Valdes-Lopez V, DeLuna A, Cardenas R (2004) NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Curr Microbiol 48 : 68-72

Albrecht C, Asselin A, Piche Y, Lapeyrie F (1994) Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization. Physiologia Plantarum 91 :104-110

Allen MF, Swenson W, Querejeta JI, Egerton-Warburton LM, Treseder KK (2003) Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. Annual Review of Phytopathology 41 : 271-303

Altshul SF, Bouguski MS, Gish W, Wooton JC (1994) Issues in searching molecular sequence databases. Nature genetics 6 :119-129

Altshul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25 :3389-3402

Amaranthus MP, Perry DA (1994) The functioning of ectomycorhizal fungi in the field : linkages in space and time. Plant and soil 159 : 133-140

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 unliled and limed peat. New Phytologist 133: 695-704

Aquino MT, Plassard C (2004) Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. FEMS Microbiology Ecology 48 : 149-156

Arnebrant, K., Ek, H., Finlay, R.D., Soderstrom, B (1993) Nitrogen translocation between *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. seedlings inoculated with *Frankia* sp. and *Pinus contorta* Dougl. ex Loud seedlings connected by a common ectomycorrhizal mycelium. New Phytologist 124 : 231-242

Arshad M, Frankenberg WT (1998) Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. Advances in Agronomy 62: 45-151

Ashford AE (1998) Dynamic pleiomorphic vacuole systems : Are they endosomes and transport compartments in fungal hyphae ? Advance in Botanical Research 28 : 119-159

Ayling SM, Smith SE, Smith FA, Kolesik P (1997) Transport processes at the plant-fungus interface in mycorrhizal associations: Physiological studies. Plant and Soil 196 :305-310

Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist* 149 : 4-8

Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, (...), Shachar-Hill Y (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. Plant Physiology 131 (3) :1496-1507

Bago B, Pfeffer PE, Zipfel W, Lammers P, Shachar-Hill Y (2002) Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 244 (1-2) : 189-197

Balasubramanian S, Kim S-J, Podila GK (2002) Differential expression of a malate synthase gene during the preinfection stage of symbiosis in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. New Phytologist 154 : 517-527

Barnes D, Lai W, Breslav M, Naider F, Becker JM (1998) PTR3, a novel gene mediating amino acid-inducible regulation of peptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 29 : 297-310

Béguiristain T, Lapeyrie F (1997) Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. New Phytologist 136 : 525-532

Bending G, Read D (1995) The strucure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. New Phytol. **130:**411-417

Bengtsson J (1998) Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. Applied Soil Ecology 10 : 191-199

Bidartondo MI, Bruns TD, Weiß M, Sérgio C, Read DJ (2003) Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences 270 (1517) :835-842

Björkman E (1960) Monotropa hypopitys L. - An epiparasite on tree roots. Phyiologia Plantarum 13 :308-327

Blaudez D, Botton B, Chalot M (2000) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology 146 (5) : 1109-1117

Blaudez D, Chalot M, Dizengremel P, Botton B (1998) Structure and function of the ectomycorrhizal association between Paxillus involutus and Betula pendula. II. Metabolic changes during mycorrhiza formation. New Phytologist 138 (3) : 543-552

Blaudez D, Kohler A, Martin F, Sanders D, Chalot M (2003) Poplar Metal Tolerance Protein 1 Confers Zinc Tolerance and Is an Oligomeric Vacuolar Zinc Transporter with an Essential Leucine Zipper Motif. Plant Cell 15 :2911-2928

Bond EM, Chase JM (2002) Biodiversity and ecosystem functioning at local and regional spatial scales. Ecology letters 5 (4) : 467-470

Bonfante P, Balestrini R, Martino E, Perotto S, Plassard C, Mousain D (1998) Morphological analysis of early contacts between pine roots and two ectomycorrhizal Suillus strains. Mycorrhiza 8 : 1-10

Botton B, Dell B (1994) Expression of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in eucalypt ectomycorrhizas. New Phytologist 126 : 249-257

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72 :248-254

Brady NC (1990) The nature and properties of soils tenth edition. Macmillan publishing company New York.

Brandes B, Godbold DL, Kuhn AJ, Jentschke G (1998) Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the *Paxillus involutis* mycorrhizal fungus New effect on Phytologist 140 : 735-743

Brownlee A, Duddridge JA, Malibari A, Read DJ (1983) The structure and function of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming interplant connections and providing pathways for assimilate and water transport. Plant and Soil 71 : 433-44

Brun A, Chalot M, Botton, B (1993) Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*: occurence and immunogold localization in the free living mycelium. Life Sciences Advances of Plant Physiology **12 :** 53-60

Brun A, Chalot M, Botton B, Martin F (1992) Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP- glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. Plant Physiology 99 : 938-944

Brun A, Chalot M, Duponnois R, Botton B (1994) Immunogold localization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas fir ectomycorrhizas. Mycorrhiza 5: 139-144

Brun A, Chalot M, Finlay RD, Söderström B (1995) Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* (Roth.). I. Dynamics of mycorrhiza formation. New Phytologist 129 :487-493

Burgess T, Laurent P, Dell B, Malajczuk N, Martin F (1995) Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. Planta 195: 408-417

Burleigh SH, Cavagnaro T, Jakobsen I (2002) Functional diversity of arbuscular mycorhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. Journal of Experimental Botany 53 : 1593-1601

Campbell IM (1974) Incorporation and dilution values: their calculation in mass-spectrally assayed stable isotope labelling experiments. Bio-organic Chemistry 3 : 386-397

Casarin V, Plassard C, Souche G, Arvieu JC (2003) Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. Agronomie 23 (5-6) : 461-469

Chalot M, Brun A (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS Microbiology Reviews 22 :21-44

Chalot, M, Stewart GR, Brun A, Martin F, Botton B (1991) Ammonium assimilation by spruce-*Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. New Phytologist 119 : 541-550

Chalot M, Brun A, Botton B, Söderström B (1996) Kinetics, energetics and specificity of a general amino acid transporter from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology 142 :1749-1756

Chalot M, Brun A, Finlay RD, Söderstrom B (1994a) Respiration of [14C]alanine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. FEMS Microbiology Letters 121 (1) : 87-91

Chalot M, Brun A, Finlay RD, Söderstrom B (1994b) Metabolism of [14C]glutamate and [14C]glutamine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology 140 (7) : 1641-1649

Charvet-Candela V, Hitchin S, Reddy MS, Cournoyer B, Marmeisse R, Gay G (2002a) Characterization of a *Pinus pinaster* cDNA encoding an auxin up-regulated putative peroxidase in roots. Tree Physiology 22 : 231-238

Charvet-Candela V, Hitchin S, Ernst D, Sandermann Jr H, Marmeisse R, Gay G (2002b) Characterization of an Aux/IAA cDNA upregulated in *Pinus pinaster* roots in response to colonization by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. New Phytologist 154 : 769-777

Cheng CS, Samuel D, Liu YJ, Lai SM, Lin KF, Lyu PC (2004) Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. Biochemistry 43:13628-13636

Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus acquaticus*. Journal of Bacteriology 127 :1550-1557

Chilvers GA (1968) Some distinctive types of eucalypt mycorrhizas. Australian Journal of Botany 26: 49-70

Chuyong GB, Newbery DM, Songwe NC (2002) Litter breakdown and mineralization in a central African rain forest dominated by ectomycorrhizal trees. Biogeochemistry 61 : 73-94

Coalpert JV, Van Assche JA (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. New Phytologist 123 :345-351

Coalpert JV, Van Tichelen KK, Van Assche JA, Van Laere A (1999) Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizalroots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. New Phytologist 143 : 589-597

Cole L, Orlovich DA, Ashford, AE (1998) Structure, function, ad motility of vacuoles in filamentous fungi. Fungal Genetics and Biology 24 : 86-100

Conway EI (1967) Microdiffusion analysis and volumetric error, II ed. Crosby, Lockwood, London.

Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M, Leroy P (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Applied and Environmental Microbiology 70 (12) :7413-7417

Dell B, Botton B, Martin F, Le Tacon F (1989) Glutamate dehydrogenase in ectomycorrhizas of spruce (Picea excelsa L) and beech (Fagus sylvatica L). New Phytologist 111: 683-692

Ditengou FA, Beguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211 (5) : 722-728

Donnelly DP, BoddyL, Leake JR (2004) Development, persistence and regeneration of foraging ectomycorrhizal mycelial systems in soil microcosms. Mycorrhiza 14 (1) : 37-45

Duddridge JA (1986) The development and ultrastructure of ectomycorhhizas. IV. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing, and a number of ectomycorrhizal hosts in vitro in the presence of exogenous carbohydrate. New Phytologist 103 :465-471

Duddridge, JA, Finlay, RD, Read, DJ, Soderstrom, B (1988) The structure and function of the vegetatative mycelium of ectomycorrhizal plants: III. Ultrastructural and autoradiographic analysis of inter-plant carbon distribution through intact mycelial systems. New Phytologist 108 :183-188

Duplessis S, Courty P-E, Tagu D, Martin F (2005) Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytologist 165 (2) : 599-611

Duplessis S, Sorin C, Voiblet C, Palin B, Martin F, Tagu D (2001) Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Current Genetics 39 : 335-339

Dutton MV, Evans CS (1996) Oxalate productin by fungi : Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. Canadian Journal of Microbiology 42 : 881-895

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

Ek H, Andersson S, Söderström B (1996) Carbon and nitrogen flow in silver birch and Norway spruce connected by a common mycorrhizal mycelium. Mycorrhiza 6 :465-467

Ek BA, Huss-Danell K(1995) Nitrogen fixation by *Alnus incana* and nitrogen transfer from *A. incana* to *Pinus sylvestris* influenced by macronutrient and ectomycorhiza. New Phytologist 131 : 453-459

Ekblad A, Wallander H, Carisson R, Huss-Danell K (1995) Fungal biomass in roots and extramatrical mycelium in relation to macronutrients and plant biomass of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* and *Aulnus incana*. New Phytologist 131: 443-451

El-Badaoui K, Botton B (1989) Production and characterization of exocellular proteases in ectomycorrhizal fungi. Annales de Sciences forestières 46 supplément Forest Tree Physiology 728-730

Emmerton KS, Callaghan TV, Jones HE, Leake JR, Michelsen A, Read DJ (2001a) Assimilation and isotopic fractionation of nitrogen by mycorrhizal fungi. New Phytologist 151 : 501-512

Emmerton KS, Callaghan TV, Jones HE, Leake JR, Michelsen A, Read DJ (2001b) Assimilation and isotopic fractionation of nitrogen by mycorrhizal and nonmycorrhizal subarctic plants. New Phytologist 151 : 513-524

Feinberg AP, Vogelstein B (1984) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochemistry 137 :266-267

Ferrol N, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2002) Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. Plant and Soil 244 :231-237

Finlay RD (1989) Functional aspects of phosphorus uptake and carbon translocation in incompatible ectomycorrhizal associations between *Pinus sylvestris* and *Suillus grevillei* and *Boletinus cavipes*. New Phytologist 112 : 185-192

Finlay RD, Ek H, Odham G, Söderström B (1988) Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ^{15}N- labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. New Phytologist 110: 59-66

Finlay RD, Frostegard A, Sonnerfeldt AM (1992) Utilization of organc and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. Ex Loud. New Phytologist 120 :105-115

Finlay R, Read DJ (1986a) The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of ^{14}C-labeled carbon between plants interconnected by a common mycelium. New Phytologist 103 : 143-156

Finlay, RD, Read, DJ (1986b) The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The up-take and distribution of phosphorus by mycelial strands in the connecting host plants. New Phytologist 103 :157-165

Fries N, Serck-Hanssen K, Dimberg, LH, Theander O (1987) Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus Suillus (Boletaceae). Experimental Mycology 11: 360-363

Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNA from race transcripts : amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85 :8998-9002

Garcia-Garrido JM, Ocampo J (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Journal of Experimental Botany 53 : 1377-1386

Gaspar L, Pollero R, Cabello M (1994) *Glomus antarcticum*: The lipids and fatty acid composition. Mycotaxon 51 (NUMBER COM), 129

Gay G, Gea L (1994) Role of fungal auxin in ectomycorrhiza formation. Acta Botanica Gallica 141 : 491-496

Gehl JM, Garbaye J (1990) The effects of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water-use efficiency and response to transplanting in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. Annales des Sciences Forestières 47 : 551-563

Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P, Didier E (1993) Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*: Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. Plant Physiology 101 (2) : 513-522

Glevarec G, Bouton S, Jaspard E, Riou MT, Cliquet JB, Suzuki A, Limami AM (2004) Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. Planta 219 : 286-97

Gobert A, Plassard C (2002) Differential NO3- dependent patterns of NO3- uptake in *Pinus pinaster*, *Rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association. New Phytologist 154: 509-516

Goday A, Jensen AB, Culianez-Macia FA, Mar Alba M, Figueras M, Serratosa J, Torrent M, Pages M (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals Plant Cell 6 (3) : 351-360

Griffiths RP, Castellan, MA, Caldwell BA (1991) Hyphal mats formed by two ectomycorrhizal fungi and their association with Douglas-fir seedlings: a case study. Plant & Soil 134 (2) : 255-259

Grotjohann N, Kowallik W, Huang Y, Schulte in den Baumen, A (2000) Investigations into enzymes of nitrogen metabolism of the ectomycorrhizal basidiomycete, *Suillus bovinus*
Z Naturforsch [C] 55 **:** 203-12

Guillot J, Giollant M, Damez M, Dusser M (1994) Involvement of fungal lectins in recognition between mushroom and tree during the early stages of mycorrhizae formation. Acta Botanica Gallica 141 (4) : 443

Günther Th, Perner B, Gramss G (1998) Activities of phenol oxidizing enzymes of ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Journal of Basic Microbiology 38 (3) : 197-206

Hagerberg D, Thelin G, Wallander H (2003) The production of ectomycorrhizal mycelium in forests: Relation between forest nutrient status and local mineral sources. Plant and Soil 252 (2) : 279-290

Hamer DH (1986) Metallothionein. Annual revue of Biochemistry 55 :913-951

Hampp R, Wiese J, Mikolajewski S, Nehls U (1999) Biochemical and molecular aspects of C/N interaction in ectomycorrhizal plants: An update. Plant and Soil 215 : 103-113

Harrison MJ (1999) Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbioses. Journal of Experimental Botany 50 : 1013-1022

Hartley J, Cairney JWG, Mehrag AA (1997) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptative tolerance to potentially toxic metals in the environment ? Plant and Soil 189 :303-319

He XH (2002) Nitrogen Exchange between Plants Through Common Mycorrhizal Networks. PhD thesis. The University of Queensland, Brisbane, Australia

He XH, Critchley C, Bledsoe C (2003) Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). Critical Reviews in Plant Sciences 22 : 531-567

Heinonsalo J, Hurme KR, Sen R (2004) Recent ^{14}C-labelled assimilate allocation to Scots pine seedling root and mycorrhizosphere compartments developed on reconstructed podzol humus, E- and B- mineral horizons. Plant and Soil 259 :111-121

Helling RB (1994) Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? J Bacteriol. 176 : 4664-8

Henn MR, Chapela IH (2004) Isotopic fractionation during ammonium assimilation by basidiomycete fungi and its implications for natural nitrogen isotope patterns. New Phytologist 162 : 771-781

Hibbett DS (2002) When good relationships go bad. Nature 419 (6905) : 345-346

Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ (2000) Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. Nature 407 (6803) : 506-508

Hilbert JL, Costa G, Martin F (1991) Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. Plant Physiology 97 : 977-984

Hilbert JL, Martin F (1988) Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. New Phytologis 110: 339-346

Hobbie EA, Colpaert JV (2003) Nitrogen availability and colonization by mycorrhizal fungi correlate with nitrogen isotope patterns in plants. New Phytologist 157 (1) : 115-126

Hofmann K, Stoffel W (1992) PROFILEGRAPH : an interactive graphical tool for protein sequence analysis. Computational and Applied Bioscience 8 : 331-337

Högberg MN, Högberg P (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. New Phytologist 154 (3) : 791-795

Hogberg P, Hogberg MN, Quist ME, Ekblad A, Nasholm T (1999) Nitrogen isotope fractionation during nitrogen uptake by ectomycorrhizal and non-mycorrhizal Pinus sylvestris. New Phytologist 142 (3) : 569-576

Högberg P, Nordgren A, Buchmann N, Taylor AFS, Ekblad A, Hogberg MN, Nyberg G, Ottosson-Lofvenius M, Read DJ (2001) Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. Nature 411 (6839) : 789-792

Horan DP, Chilvers GA (1990) Chemiotropism- the key to ectomycorrhizal formation. New Phytologist 116 : 297-301

Horan DP, Chilvers GA, Lapeyrie F (1988) Time sequence of the infection process in eucalypt mycorrhiza. New Phytologist 109 : 451-458

Huang GC, Meng SD, Wang R, Tian B (2002) Cloning of glutamate dehydrogenase cDNA from *Chlorella sorokiniana* and analysis of transgenic tobacco plants. Acta Botanica Sinica 44 : 318-324

Hyde GJ, Cole L, Ashford AE (1997) Mycorrhizas movies : Sequences of *Pisolithus tinctorius* vacuole motility on the internet in conjonction with Newscorner article. Mycorrhiza 7 : 167-169

Ikeda TP, Shauger AE, Kustu S (1996) *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation . Journal of Molecular Biology 259 (4) : 589-607

Ito H, Fukuda Y, Muruta K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells with alkali cations. Journal of Bacteriology 153 :163-168

Jacob C, Courbot M, Martin F, Brun A, Chalot M (2004) Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. FEBS Letters 576 (3) :423-427

Jacobs PF, Peterson RL, Massicotte HB (1989) Altered fungal morphogenesis during early stages of ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus pilularis*. Scanning Microscopie 3 : 249-255

Jambois A, Ditengou FA, Kawano T, Delbarre A, Lapeyrie F (2004) The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid-specific competitors which do not alter auxin transport. Physiologia Plantarum 120 (3) : 501-508

Jany JL, Martin F, Garbaye J (2003) Respiration activity of ectomycorrhizas from *Cenococcum geophilum* and *Lactarius sp* in relation to soil water potential in five beech forests. Plant and soil 255 (2) : 487-494

Jargeat P, Rekangalt D, Verner MC, Gay G, Debaud JC, Marmeisse R, Fraissinet-Tachet L (2003) Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. Current Genetics 43 : 199-205

Javelle A, Andre B, Marini AM, Chalot M (2003) High-affinity ammonium transporters and nitrogen sensing in mycorrhizas. Trends in Microbiology 11 :53-5.

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

Javelle A, Rodriguez-Pastrana BR, Jacob C, Botton B, Brun A, Andre B, Marini AM, Chalot M (2001) Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. Febs Letters 505: 393-398

Jentschke G, Godbold L, Brandes B (2001) Nitrogen limitation in mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*) seedlings induced mycelial foraging for ammonium: implications for Ca and Mg uptake. Plant and soil 234: 109-117

Johansson T, Le Quéré A, Ahren D, Söderström B, Erlandsson R, Lundeberg J, Uhlén M, Tunlid A(2004) Transcriptionnal responses of Paxillus involutus and Betula pendula during formation of ectomycorrhizal root tissue. Molecular Plant-Microbe Interactions 17 : 202-215

Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. New Phytologist 135 (4) : 575-586

Kershaw JL, Stewart GR (1992) Metabolism of ^{15}N-labelled ammonium by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch. Mycorrhiza 1 : 71-77

Kisaka H, Kida T (2003) Transgenic tomato plant carrying a gene for NADP-dependant glutamate dehydrogenase (*gdhA*) from *Aspergillus nidulans*. Plant Science 164 : 35-42

Klironomos JN, Hart MM (2001) Food-web dynamics - Animal nitrogen swap for plant carbon. Nature 410 (6829) : 651-652

Kreuzwieser J, Stulen I, Wiersema P, Vaalburg W, Rennenberg H (2000) Nitrate transport processes in *Fagus-Laccaria*-Mycorrhizae. Plant and Soil 220 (1-2) : 107-117

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 environ. 27:27-40

Lagrange H, Jay-Allgmand C, Lapeyrie F (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates Pisolithus hyphal growth at picomolar concentration. New Phytologist 149 (2) : 349-355

Landerweert 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

Langley JA, Hungate BA (2003) Mycorrhizal controls on belowground litter quality. Ecology 84 :2302-2312

Lasat MM (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. Journal of Environmental Quality 31 : 109-120

Laurent P, Voiblet C, Tagu D, de Carvalho D, Nehls U, De Bellis R, Balestrini R, Bauw G, Bonfante P, Martin F (1999) A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. Molecular Plant Microbe Interaction. 12 : 862-871

Leake JR (2001) Is diversity of ectomycorrhizal fungi important for ecosystem function? New Phytologist 152 (1) : 1-3

Leake JR, Donnelly DP, Saunders EM, Boddy L, Read DJ (2001) Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following ^{14}C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: Effects of litter patches and interaction a wood-decomposer fungus. Tree Physiology 21 (2-3) , 71-82

Leake JR, Read DJ (1997) Mycorrhizal fungi in terrestrial ecosystems. In The Mycota IV. Experimental and Microbial Relationships. Eds. D Wicklow and B Söderström. Pp. 281-301. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Lei J, Lapeyrie F, Malajczuk N, Dexheimer J (1990) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro*. III. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhizal formation. New Phytologist 116: 115-122

LePage BA, Currah RS, Stockey R, Rothwell GW (1996) Fossil ectomycorrhiza in eocene Pinus roots. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 91 : 11841-11849

Lilleskov EA, Fahey TJ, Lovett GM (2001) Ectomycorrhizal fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient. Ecological Apllications 11(2): 397-410.

Lorillou S (1995) Contribution à l'étude de la régulation de la glutamate deshydrogenase à NADP chez le basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N. Thèse.

Lorillou S, Botton B, Martin F (1996) Nitrogen source regulates the biosynthesis of NADP glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. New Phytologist 132: 289-296

Malajczuk N, Lapeyrie F, Garbaye J (1990) Infectivity of pine and eucaypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. I. Mycorrhiza formation in model systems. New Phytologist 114 :627-631

Maleck K, Dietrich RA (1999) Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? Trends in Plant Science 4 (6) : 215-219

Mankel A, Krause K, Kothe E (2002) Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. Applied and Environmental Microbiology 68 :1408-1413

Margelis S, D'Souza C, Smal AJ, Hynes MJ, Adams TH, Davis MA (2001) Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology 183 :5826-5833

Marschner A (1986) Phytotoxicity testing of environmental chemicals on various wild plants and one cultivated plant I [Phytotoxizitatsprufung von Umweltchemikalien an verschiedenen Wildpflanzen und einer Kulturpflanze]. Verhandlungen - Gesellschaft fur Okologie 16 : 375-382

Martin F, Botton B (1993) Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. Advances in Plant Pathology 9 : 83-102

Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. New Phytologist 151 (1) : 145-154

Martin F, Msatef Y, Botton B (1983) Nitrogen assimilation in mycorrhizas. I. Purification and properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*. New Phytologist 93 : 415-422

Martin F, Stewart GR, Genetet I, Le Tacon F (1986) Assimilation of $^{15}NH_4^+$ by beech (Fagus sylvatica L.) mycorrhizas. New Phytologist 102 : 85-94

Martin F, Stewart GR, Genetet I, Mourot B (1988) The involvement of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonium assimilation by the rapidly growing ectomycorrhizal ascomycete, *Cenococcum geophilum*, Fr. New Phytologist 110 : 541-550

Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59 :159-163

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

Marzluf GA (1997) Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. Annual Revue of Microbiology 51 : 73-96

Masclaux-Daubresse C, Valadier MH, Carrayol E, Reisdorf-Cren M, Hirel B (2002) Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. Plant, Cell and Environment 25 : 1451-1462

Massicote HB, Peterson RL, Ackerley CA, Piché Y(1986) Structure and ontogeny of *Alnus crispa-Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. Canadian Journal of Botany 64 : 177-192

Mawhinney TP, Robinett RSR, Atalay A, Madson MA (1986) Analysis of amino acids as their tert-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatography 358 :231-242

Meharg AA (2003) The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. Mycological Research 107 :1253-1265

Meharg AA, Cairney JWG (2000) Ectomycorrhizas - extending the capabilities of rhizosphere remediation? Soil Biology and Biochemistry 32 (11-12) : 1475-1484

Melin E (1925) Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorriza. Gustav Fischer, Jena, Germany

Melo-Oliveira R, Oliveira IC, Coruzzi GM (1996) Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. Proc Natl Acad Sci U S A 93 : 4718-23

Montanini B, Moretto N, Soragni , Percudani R, Ottonello S (2002) A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. Fungal Genetics and Biology 36: 22-34

Morris CE, Bardin M, Berge O, Frey-Klett P, Fromin N, Girardin H, Guinebretière M-H, et al. (2002) Microbial biodiversity: Approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 : 592-616

Nehls U, Beguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F, Martin F (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Planta 207: 296-302

Nehls U, Bock A, Einig W, Hampp R (2001) Excretion of two proteases by the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. Plant, Cell and Environment 24 : 741-747

Nehls U, Kleber, R, Wiese J, Hampp R (1999) Isolation and characterization of a general amino acid permease from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist 144 : 343-349

Nilsson LO, Wallander H (2003) Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce forest was reduced in response to nitrogen fertilization. New Phytologist 158 (2) : 409-416

Onguene NA, Kuyper TW (2002) Importance of the ectomycorrhizal network for seedling survival and ectomycorrhiza formation in rain forests of south Cameroon. Mycorrhiza 12 : 13-17

Ostonen I, Lohmus K (2003) Proportion of fungal mantle, cortex and stele of ectomycorrhizas in Picea abies (L.) Karst. in different soils and site conditions. Plant and Soil: 257 (2) : 435-442

Perez-Moreno J, Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. New Phytologist 145 : 301-309

Perez-Moreno J, Read DJ (2001a) Nutrient transfer from soil nematodes to plants: A direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. Plant, Cell and Environment 24 :1219-1226

Perez-Moreno J, Read DJ (2001b) Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences 268 (1474) :1329-1335

Perry JR, Basrai MA, Steiner HY, Naider F, Becker JM (1994) Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. Molecular and Cellular Biology 14 :104-115

Pfeffer PE, Douds Jr DD, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. Plant Physiology 120 (2) : 587-598

Pfeffer PE, Douds J DD, Bücking H, Schwartz DP, Shachar-Hill Y (2004) The fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytologist 163 (3) : 617-627

Plassard C, Chalot M, Botton B, Martin F (1997) Le rôle des ectomycorhizes dans la nutrition azotée des arbres forestiers. Revue Forestière Française XLIX (n° spécial) : 82-98

Podila GK, Zheng J, Balasubramanian S, Sundaram S, Hiremath S, Brand JH, Hymes MJ (2002) Fungal gene expression in early symbiotic interactions between Laccaria bicolor and red pine. Plant and Soil 244 (1-2) : 117-128

Polidori E, Agostini D, Zeppa S, Potenza L, Palma F, Sisti D, Stocchi V (2002) Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos-Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. Molecular Genetics and Genomics 266 : 858-864

Querejeta JI, Egerton-Warburton-LM, Allen MF (2003) Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. Oecologia 134 (1) : 55-64

Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. Nature 414 :462-466

Read DJ, Leake JR, Langdale AR (1988) The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. In : Boddy L, Marchant R, Read DJ. Eds. Nitrogen, Phosphorus and sulfur utilization by fungi. Cambridge : University Press, pp 181-202

Read DJ, Francis R, Finlay RD (1985) Mycorrhizal mycelia and nutrient cycling in plant communities. Ecological Interaction in Soil: Plants, Mocrobes and Animals pp. 193-217

Read DB, Bengough AG, Gregory PJ, Crawford JW, Robinson D, Scrimgrour CM, Young IM, Zhang K, Zhang X (2003) Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. New Phytologist 157:315-326

Reddy SM, Pandey AK, Melayah D, Marmeisse R, Gay G (2003) The auxin responsive gene Pp-C61 is up-regulated in Pinus pinaster roots following inoculation with ectomycorrhizal fungi. Plant, Cell and Environment 26 : 681-691

Reid CPP, Woods FW (1969) Translocation of C14-labeled compounds in mycorrhizae and its implications in interplant nutrient cycling. Ecology 50 :179-187

Rhee SG, Chlock PB, Stadtman ER (1976) Mechanistic studies of glutamine synthetase from *Escherichia Coli*. Biochimie 58 :35-49

Rigou L, Mignard E, Plassard C, Arvieu JC, Remy JC (1995) Influence of ectomycorrhizal infection on the rhisosphere pH around roots of maritime pine (*Pinus pinaster* Soland *in* Ait.). New Phytologist 130 : 141-147

Rousseau JVD, Sylvia DM, Fox AJ (1994) Contribution of ectomycorrhiza to the potentiel nutriment-absorbing surface of pine. New phytologist 128: 639-644.

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anelia. Science 230 : 1350-1354

Salzer P, Hebe G, Hager A (1997) Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustiliniforme* by host chitinases prevents induction of K^+ and Cl^- release, extracellular alkalinization and H_2O_2 synthesis of *Picea abies* cells. Planta 203 : 470-479

Salzer P, Hebe G, Reith A, Zitterell-Haid B, Stransky H, Gaschler K, Hager A (1996) Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors by extracellular spruce cell enzymes. Planta 198 :118-126

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74 : 5463-5467

Schagger H, Von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry 166:368-379

Shepherd VA, Orlovich DA, Ashford AE (1993) Cell to cell transport via motile tubules in growing hyphae of a fungus. Journal of Cell Biology 105 : 1173-1178

Sherman F, Fink GR, Hicks JB (1986) Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Simard SW, Jones MD, Durall DM, Perry DA, Myrold DD, Molina R (1997a) Reciprocal transfer of carbon isotopes between ectomycorrhizal Betula papyrifera and Pseudotsuga menziesii. New Phytologist 137 :529-542

Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R (1997b) Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. Nature 388 :579-582

Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi coincidence with vascular plants. Nature 363 : 67-69

Simoneau P, Viemont JD, Moreau JC, Strullu DG (1993) Symbiosis-related polypeptides associated with the early stages of ectomycorrhiza organogenesis in birch (*Betula pendula* Roth). New Phytologist 124 : 495-504

Singh OV, Labana S, Pandey G, Budhiraja R, Jain RK (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decotamination from soil. Applied and Microbiological Biotechnology 61: 405-412

Sirrenberg A, Salzer P, Hager A (1995) Induction of mycorrhiza-like structures and defence reactions in dual cultures of Spruce callus and ectomycorrhizal fungi. New Phytologist 130: 179-156

Smith SE et Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis, 2nd Edn. Academic Press, San Diego.

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

Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. Ismb 6 : 175-182

Soupene E, Lee H, Kustu S (2002) Ammonium/methylammonium transport (Amt) proteins facilitate diffusion of NH3 bidirectionally. Proceeding of the National Academy of the United States of America. 99: 3926-3931

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98 :503-517

Staddon PL, Ramsey CB, Ostle N, Ineson P, Fitter AH (2003) Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of C-14. Science 300 (5622) : 1138-1140

Stewart G, Moore D (1974) The activities of glutamate dehydrogenase during mycelial growth and sporophore development in *Coprinus lagopus* (sensu Lewis). Journal of General Microbiology 86 : 73-81

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

Tagu D, De Bellis R, Balestrini R, De Vries OMH, Piccoli G, Stocchi V, Bonfante P, Martin F (2001) Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus* globulus roots. New Phytologist 149 : 127-135

Tagu D, Martin F (1995) Expressed sequence tags of randomly selected cDNA clones from *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza. Molecular Plant-Microbe Interactions 8 : 781-783

Tagu D, Nasse B, Martin F (1996) Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal Basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Gene 168 : 93-97

Tagu D, Palin B, Balestrini R, Gelhaye E, Lapeyrie F, Jacquot JP, Sautiere PE, Bonfante P, Martin F (2003) Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-S-transferase from *Eucalyptus globulus* roots. Plant Physiology and Biochemistry 41 : 611-618

Tagu D, Python M, Cretin C, Martin F (1993) Cloning symbiosis-related cDNAs from eucalypt ectomycorrhiza by PCR-assisted differential screening. New Phytologist 125 : 339-343

Teichert S, Schönig B, Richter S, Tudzynski B (2004) Deletion of *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. Molecular Microbiology 53:1661-1675

Ter Schure EG, Van Riel NAW, Verrips CT (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiology Reviews 24 : 67-83

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W : improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleid Acids research 22 : 4673-4680

Tibbett M, Sanders FE (2002) Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. Annals of Botany 89 : 783-789

Timonen S, Sen R (1998) Heterogeneity of fungal and plant enzyme expression in intact Scots Pine - *Suillus bovinus* and - *Paxillus involutus* mycorrhizospheres developed in natural forest humus. New Phytologist 138 (2) : 355-366

Treseder KK, Allen MF (2000) Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO2 and nitrogen deposition. New Phytologist 147 (1) : 189-200

Tusnády GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. J Chem Inf Comput Sci 41 : 364-368

Unkles SE, Wang R, Wang Y, Glass ADM, Crawford NM, Kinghorn JR (2004) Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cells. Journal of Biological Chemistry 279 : 28182-28186

Vallorani L, Polidori E, Sacconi C, Agostini D, Pierleoni R, Piccoli G, Zeppa S, Stocchi V (2002) Biochemical and molecular characterization of NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. New Phytologist 154 : 779-790

Van Aarle IM, Olsson PA (2003) Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Applied and Environmental Microbiology 69 (11) : 6762-6767

Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity dtermines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396: 69-72

Van Der Heijden EW, Kuyper ThW (2003) Ecological strategies of ectomycorrhizal fungi of Salix repens: Root manipulation versus root replacement. Oikos 103 (3) : 668-680

Van Tichelen KK, Colpaert JV (2000) Kinetics of phosphate absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine seedlings. Physiologia Plantarum 110 : 96-103

Vézina LP, Margolis HA, Delaney (1989) Changes in activity of enzymes involved in primary nitrogen metabolism due to ectomycorrhizal symbiosis on jack pine seedlings. Physiologia Plantarum 75 : 55-62

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 (2) : 181-191

Wallenda T, Read DJ (1999) Kinetics of amino acid uptake by ectomycorrhizal roots. Plant, Cell and Environment 22 : 179-187

Wallander, H (2000) Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonized by different ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 218: 249-256

Wallander H (2002) Utilization of organic nitrogen at two different substrate pH by different ectomycorrhizal fungi growing in symbiosis with *Pinus sylvestris* seedlings. Plant and Soil 243 : 23-30

Wallander, H., Hagerberg, D (2004) Do ectomycorrhizal fungi have a significant role in weathering of minerals in forest soil? Symbiosis 37: 249-257

Wallander H, Johansson L, Pallon J (2002) PIXE analysis to estimate the elemental composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grown in contact with different minerals in forest soil. FEMS Microbiology Ecology 39 :147-156

Wallander H, Nylund JE (1992) Effects of excess nitrogen and phosphorus starvation on the extramatrical mycelium of ectomycorrhizas on *Pinus sylvestris* L. New Phytologist 120: 495-503

Wiame JM, Grenson M, Arst HN (1985) Nitrogen catabolic repression in yeasts and filamentous fungi. Advences in Microbial Physiology 26 :1-87

Wipf D, Benjdia M, Tegeder M, Frommer WB (2002) Characterization of a general amino acid permease from Hebeloma cylindrosporum. FEBS Letters 528 :119-124

Wray LV, Zalieckas JM, Fisher SH (2001) *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protei-protein interaction with transcription factor TnrA. Cell 107 :427-435

Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA (2000) Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. Colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. Plant, Cell and Environment 23 : 39-49

Wu BY, Nara K, Hogetsu T (2001) Can ^{14}C-labeled photosynthetic products move between *Pinus densiflora* seedlings linked by ectomycorrhizal mycelia? New Phytologist 149 :137-146

Wu B, Watanabe I, Hayatsu M, Nioh I (1999) Effect of ectomycorrhizae on the growth and uptake and transport of N-15-labeled compounds by Pinus tabulaeformis seedlings under water-stressed conditions. Biology and fertility 28 (2) : 136-138

Yang XE, Baligar VC, Foster JC, Martens DC (1997) Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize with different nickel levels. Plant and Soil 196:271:276

Zhu H, Guo DC, Dancik BP (1990) Purification and characterization of an extracellular acid proteinase from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. Applied and Environmental Microbiology 56 :837-843

Mademoiselle **MOREL Mélanie**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1

en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1085

Nancy, le 11 octobre 2005

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY
LE PRÉSIDENT

J.P. FINANCE

Université Henri Poincaré, Nancy I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY Cédex
Tél. : 03 83 68 20 00 - Fax : 03 83 68 21 00

Résumé

Le premier objectif de mon travail de thèse a été de comparer les profils d'expression de nombreux gènes dans le compartiment fongique directement au contact de la racine (au niveau des apex mycorhiziens) et le mycélium extramatriciel de l'association ectomycorhizienne entre *Paxillus involutus* et *Betula pendula*. Des gènes codant un transporteur d'urée surexprimé dans le mycélium extramatriciel, une phosphatidylserine decarboxylase et une protéine de fonction inconnue, surexprimées dans les mycorhizes ont été clonés et caractérisés plus en détail.

Le deuxième volet de mon travail s'est davantage axé sur la compréhension des mécanismes permettant l'ajustement du métabolisme azoté des champignons ectomycorhiziens à des conditions azotées variables du milieu. Les études ont porté à la fois sur le transport de l'ammonium et de peptides, et sur les voies d'assimilation de l'ammonium. De plus, nous avons tenté de déterminer les facteurs responsables de la diversité interspécifique existant au sein des champignons ectomycorhiziens concernant l'assimilation de l'azote, en couplant des approches à la fois biochimiques et moléculaires.

The first purpose of my work was to compare gene expression between the fungal compartment in close contact with the root and the extramatrical mycelium of the *Paxillus involtus/Betula pendula* symbiotic association. A gene coding a urea transporter, up-regulated in the extramatrical mycelium, and genes coding a phosphatidylserine decarboxylsase and a protein of unknown function were cloned and characterized further.

The second part of my work dealt with the mechanisms involved in the adaptation of ectomycorrhizal fungi to external nitrogen conditions. Studies concerned ammonium and peptide transport, and ammonium assimilating pathways. Moreover, we tried to determine the potental factors explaining the interspecific diversity observed among ectomycorrhizal fungi concerning nitrogen assimilation pathways, by coupling both biochemical and molecular approaches.