



HAL
open science

**Transporteurs fongiques de manganèse : diversité et
analyse fonctionnelle chez le champignon saprophyte
Phanerochaete chrysosporium**

Loïc Diss

► **To cite this version:**

Loïc Diss. Transporteurs fongiques de manganèse : diversité et analyse fonctionnelle chez le champignon saprophyte *Phanerochaete chrysosporium*. Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0189 . tel-01749606

HAL Id: tel-01749606

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749606v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



U.F.R Sciences et Techniques Biologiques

Ecole Doctorale : Ressources, Procédés, Produits et Environnement

Transporteurs fongiques de manganèse: diversité et
analyse fonctionnelle chez le champignon saprophyte
Phanerochaete chrysosporium

Thèse de l'Université Henri Poincaré – Nancy

En Biologie Végétale et Forestière

Soutenue par Loïc DISS

Sous la direction de Michel CHALOT

Composition du jury :

Rapporteurs :	M. Alain Vavasseur	Directeur de recherche, CEA, Cadarache
	M. Sébastien Thomine	Directeur de recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette
Examineurs :	M. Bernard KUREK	Directeur de recherche, INRA, Reims
	M. Michel CHALOT	Professeur des Universités, UHP, Nancy
	M. Eric GELHAYE	Professeur des Universités, UHP, Nancy

Centre de recherche : U.M.R 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes
I.F.R 110 Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelles
Faculté des Sciences et Technologies – 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

J'adresse mes vifs remerciements à M. Alain Vavasseur et M. Sébastien Thomine pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier M. Bernard KUREK et M. Eric GELHAYE d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je remercie M. Michel CHALOT de m'avoir laissé faire mon travail de thèse au sein de l'équipe homéostasie métallique.

Je remercie également la région Lorraine et l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement de mes travaux.

Je ne pourrais pas oublier mes petits camarades de paillasse, Eva et Aude, qui m'auront régalié avec leurs pâtisseries, ou Didier, mon camarade des heures supplémentaires, allergique au vert ; le rouge c'est bon, mangez et buvez-en (Coca-cola addict). Je remercie également mes voisins de bureau Laurence et Chantal (♪ elle tape sur des bambous... ♪).

Cette thèse m'aura également permis de rencontrer des personnes comme Éléna, qui est la gentillesse incarnée, et de nombreux stagiaires, Denis, Marine, Julie (si tu viens à la soutenance tu devras être habillée en blanc)...

Je remercie également les gens de l'INRA de champenoux, en particulier Annick et Claire ainsi que Yohann et Carinne pour les heures passées ensemble.

Je dois également remercier les gens du « 3 » Jean-Pierre, Nicolas, Eric, Mélanie, Elisabeth, un merci tout particulier à Kamel et Jérémy.

Tout est poison, rien n'est poison, c'est la dose qui fait le poison !

Paracelse (1493-1541)

Pour gagner une course, il faut d'abord la finir.

Enzo Anselmo Ferrari (1898-1988)

ABRÉVIATIONS

ATX2	AnTioXidant
Ca	calcium
CCC1	Cross-Complements Ca phenotype of csg1
Cd	cadmium
CDF	Cation Diffusion Facilitator
Co	cobalt
Cu	cuivre
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
Fe	fer
Hg	mercure
K	potassium
Li	lithium
LiP	Lignine Peroxydase
Mg	magnésium
Mn	manganèse
Mn-CDF	Manganese Cation Diffusion Facilitator
MnT	Manganese Transporter
Mo	molybdène
MS	Matière Sèche
MTM	Manganese Trafficking factor for Mitochondrial SOD2
MTP	Metal Tolerance Protein
Na	sodium
Ni	nickel
NRAMP	Natural Rresistance Associated Macrophage Protein
Pb	plomb
PHO84	PHOspate metabolism
PMR1	Plasma Membrane ATPase
SMF	Suppressor of Mitochondria import Function
ZIP	ZRT-IRT-like proteins
Zn	zinc
ZRT	Zinc-Regulated Transporter

TABLES DES MATIÈRES

Abréviations	7
Tables des matières.....	9
1 Etude bibliographique	15
1.1 La paroi cellulaire végétale.....	15
1.1.1 Structure de la paroi végétale	15
1.1.2 Composition de la paroi	17
1.2 Les champignons xylophages	23
1.2.1 Les champignons de la pourriture brune	23
1.2.2 Les champignons de la pourriture molle.....	25
1.2.3 Les champignons de la pourriture blanche	25
1.3 Phanerochaete chrysosporium	27
1.4 Système lignolytique des champignons lignivores.....	33
1.4.1 Les laccases.....	33
1.4.2 Les peroxydases.....	37
1.4.3 Les enzymes auxiliaires	47
1.5 Espèces oxygénées et stress oxydatif.....	53
1.5.1 Oxygène et espèces oxygénées réactives	53
1.5.2 Production de ROS.....	57
1.5.3 Effets induits par les ROS.....	63
1.5.4 Systèmes de régulation du statut rédox	73
1.6 Le manganèse.....	83
1.6.1 Le manganèse : un élément essentiel	85
1.6.2 Le manganèse : un élément toxique	91
1.6.3 L'homéostasie au manganèse	97
1.7 Objectifs	129

2	Matériel et Méthodes	131
2.1	Matériel	131
2.1.1	Matériel biologique	131
2.1.2	Plasmides et Vecteurs d'expression.....	133
2.2	Méthodes	139
2.2.1	Conditions de culture	139
2.2.2	Méthodes de biologie moléculaire.....	145
3	Résultats.....	173
3.1	Famille SMF (Nramp, TC 2.A.55).....	177
3.1.1	Analyse phylogénétique des NRAMP fongiques	177
3.1.2	Expression des transporteurs.....	183
3.2	Famille PHO84 (MFS, TC 2.A.1.)	185
3.2.1	Analyse phylogénétique des PHO84 fongiques.....	185
3.2.2	Expression de PcPhT1.....	187
3.2.3	Complémentation fonctionnelle de <i>pho84Δ</i>	189
3.2.4	Localisation intracellulaire.....	191
3.2.5	Complémentation avec PcPhT3 et PcPhT4.....	193
3.3	Famille CCC1 (VIT, TC 2.A.89)	197
3.3.1	Analyse phylogénétique des CCC1 fongiques	197
3.3.2	Expression de PccCC1.....	199
3.3.3	Complémentation fonctionnelle en système levure	201
3.3.4	Localisation intracellulaire.....	203
3.4	Famille MTM (MC, TC 2.A.29)	205
3.4.1	Analyse phylogénétique des MTM fongiques	205
3.4.2	Expression de PcMTM1	207
3.4.3	Complémentation fonctionnelle de <i>mtm1Δ</i>	207
3.4.4	Localisation de <i>Pcmtm1Δ</i>	209
3.5	Orthologues de PMR1 (P-ATPase, TC 3.A.3).....	211

3.5.1	Analyse phylogénétique des PMR1 fongiques	211
3.5.2	Expression de PcPMR1	213
3.5.3	Complémentation fonctionnelle	215
3.6	Famille ATX2 (ZIP, TC 2.A.5).....	217
3.6.1	Analyse phylogénétique des orthologues fongiques de ATX2.....	217
3.6.2	Expression de PcATX2.....	219
3.6.3	Complémentation fonctionnelle de <i>sod1Δ</i>	221
3.6.4	Localisation intracellulaire.....	223
3.7	MnT (CDF, TC 2.A.4)	225
3.7.1	Etude phylogénétique	225
3.7.2	Expression de MnT	231
3.7.3	Complémentation en système levure	233
3.7.4	Localisation intracellulaire.....	235
3.7.5	Spécificité de sélection du métal par PcMnT	237
3.7.6	Effet de PcMnt sur la concentration intracellulaire en manganèse.....	241
3.7.7	Etude d'autres CDF de la famille Manganese.....	249
3.7.8	Etude des domaines transmembranaires.	259
4	Conclusion et perspectives.....	267
4.1	Transport du manganèse chez <i>P. chrysosporium</i>	267
4.2	Etude de MnT et des Mn-CDF	273
	Références Bibliographiques.....	277
	Annexes	305
	Publications	323

Le métabolisme secondaire, tant bactérien que végétal ou fongique, représente une source importante de produits ayant de multiples applications. De nombreux produits ont été isolés pour leurs intérêts en médecine comme la Pénicilline, qui est un métabolite secondaire d'un champignon, le Pénicillium, l'Aspirine (acide acétylsalicylique), qui a été isolée à partir d'écorce de saule (*Salix*) ou encore le Taxol (molécule anti-cancéreuse), isolé à partir de l'If européen (*Taxus baccata*).

De nombreuses autres molécules ont été isolées, dont certaines peuvent avoir des effets plus néfastes comme la morphine, qui peut être utilisée en médecine, mais que l'on retrouve également dans l'opium et que l'on obtient à partir du Pavot (*Papaver somniferum*) ou encore la cocaïne qui est un alcaloïde extrait à partir de feuilles de Coca (*Erythroxylum coca*). On retrouve également des poisons comme la coniine extraite à partir de la ciguë (*Conium maculatum*).

Les espèces fongiques peuvent produire des molécules aromatiques comme *Penicillium roquefortii* qui produit du 6-méthyl-butylacétate à l'arôme de banane, *Ceratocystis variispora* qui produit du citronellol et du géraniol à l'arôme de rose ou *Mycoacia uda* qui produit du p-tolualdéhyde à l'arôme d'amande.

De nombreux autres produits peuvent être utilisés et ont un intérêt pour l'Homme, ainsi on peut retrouver des enzymes comme des lipases ou des protéases dans les lessives afin d'en augmenter l'efficacité.

Certains organismes présentent des intérêts en bioremédiation ainsi *Pseudomonas halodenitrificans* est utilisé dans les stations d'épurations afin de supprimer les nitrates, certaines plantes comme la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*) ou le peuplier (*Populus*) peuvent être utilisées pour extraire les métaux lourds. Les champignons saprophytes utilisent un arsenal d'enzymes afin de dégrader la lignocellulose. Ces enzymes sont également capables de dégrader de nombreux autres produits comme des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou des colorants industriels. De nombreux procédés ont été mis au point afin de permettre une production plus importante de ces enzymes. Chez *Phanerochaete chrysosporium* une carence en manganèse engendre la production spécifique de certaines ligninases (Rothschild et al, 1999).

Bien que nécessaire à tous les organismes les connaissances sont faibles quant aux capacités de transport en manganèse chez les champignons saprophytes mais également dans le phylum des Basidiomycota dont fait partie *P. chrysosporium*. Cette étude a donc pour but de faire une carte du transportome du manganèse chez *P. chrysosporium* et de caractériser certains transporteurs notamment par expression hétérologue chez *Saccharomyces cerevisiae*.

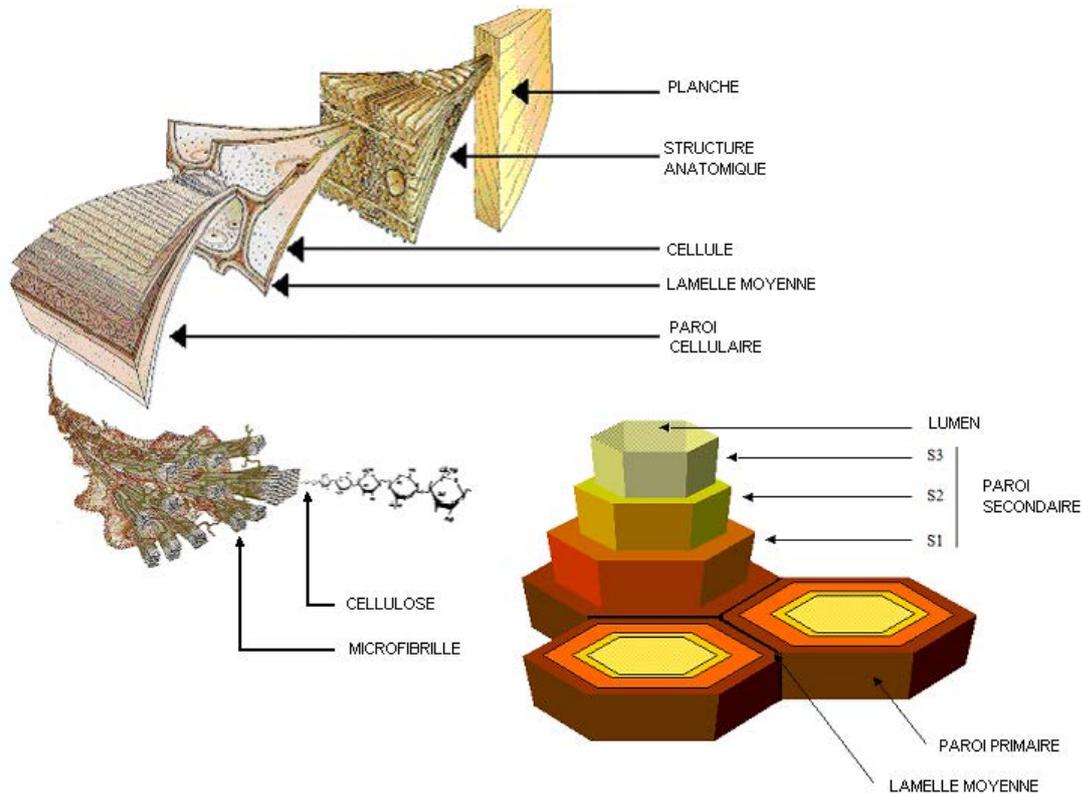


Figure 1 : Structure du bois : Le bois est constitué de « briques » de base comme la cellulose qui, en se complexant entre elles, vont permettre la formation des parois cellulaires qui sont nécessaires à la formation de structures comme les trachéides, qui permettent la conduction de la sève, mais également jouer un rôle de squelette. Les cellules vivantes sont généralement uniquement entourées d'une paroi primaire, à l'inverse le bois contient des reliques de cellules composées de la paroi primaire et secondaire, cette dernière pouvant être séparée en strates en fonction de l'orientation des microfibrilles.

1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

P. chrysosporium fait partie d'un groupe de champignons couramment nommés champignons de la pourriture blanche. Ils font partie d'un groupe plus large de champignons qui regroupe les champignons lignivores, qui sont capables de dégrader le bois. Tous les champignons lignivores ne sont pas capables de dégrader tous les constituants du bois ce qui permet de les répartir en plusieurs groupes en fonction de la manière dont ils vont attaquer les parois végétales.

1.1 LA PAROI CELLULAIRE VÉGÉTALE

1.1.1 STRUCTURE DE LA PAROI VÉGÉTALE

Le bois (Fig.1) est généralement représenté comme un édifice multimoléculaire constitué de trois éléments de base qui entourent les cellules végétales. La paroi végétale a plusieurs fonctions, en effet, elle joue un rôle de squelette pour la plante tout en assurant un rôle dans la défense, cette dernière représente une barrière contre différentes maladies. Ces fonctions ne doivent cependant pas se faire au détriment des échanges intercellulaires, ce qui explique sa complexité.

Elle est constituée de la lamelle moyenne qui permet la jonction intercellulaire. C'est un élément riche en pectines dont l'origine provient de la plaque équatoriale lors de la division cellulaire. La pectine est constituée de chaînes d'acide uronique reliées entre elles par des ions bivalents, elle possède donc une certaine élasticité qui peut être modulée par le rapport H^+/Ca^{2+} .

La paroi primaire est composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines. Elle est assez rigide pour jouer un rôle de squelette, mais doit être assez malléable pour permettre la croissance et la division cellulaires.

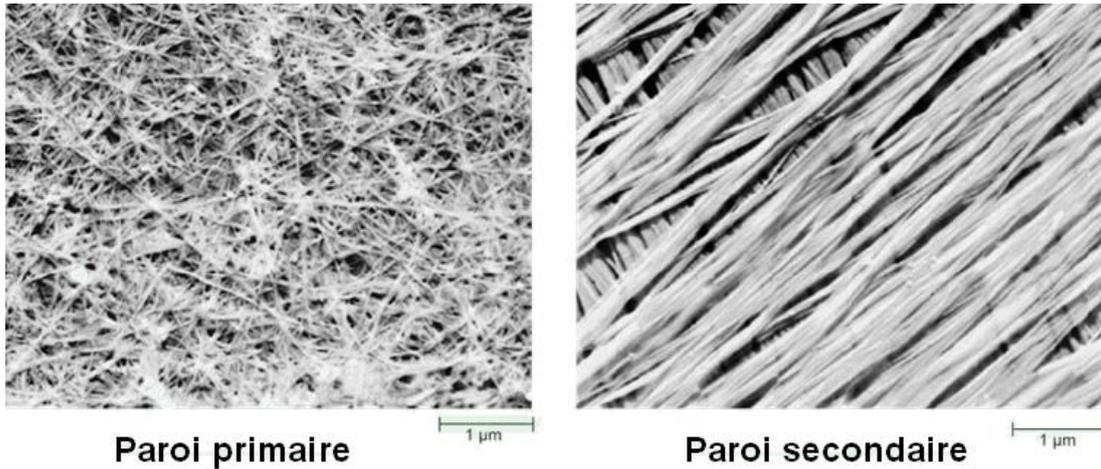


Figure 2 : Structure de la paroi primaire et secondaire en microscopie électronique. On peut constater que les fibrilles de la paroi secondaire sont orientées et que deux strates différentes sont visibles.

Tableau 1 : Composition relative des éléments constituant le bois.

Constituants du bois	%
Cellulose	de 40 à 50 %
Hémi-cellulose	de 10 à 30 %
Lignine	de 15 à 35 %

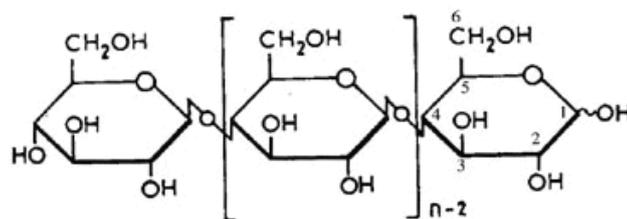


Figure 3 : La cellulose est constituée d'unités D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β 1-4.

La paroi secondaire est composée des mêmes éléments que la paroi primaire mais possède également de la lignine qui lui confère une solidité plus importante. Elle est généralement plus riche en cellulose que la paroi primaire et est plus épaisse. Elle peut être délimitée en strates qui sont le résultat de l'orientation parallèle des fibrilles de cellulose (Fig.2), cette dernière est alors dite cristallisée alors qu'elle est dite amorphe dans la paroi primaire. Après formation de la paroi secondaire les cellules ne pourront plus se diviser et vont mourir. Ce type de structure se retrouve dans les vaisseaux conducteurs du xylème.

1.1.2 COMPOSITION DE LA PAROI

Les trois principaux types de constituants qui vont permettre la formation de ces structures sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. La proportion de ces « briques » de base est variable dans le bois et généralement comprise entre les valeurs reprises dans le tableau 1. La concentration dans le bois peut varier en fonction de l'espèce mais également en fonction de la localisation (Feldman, 1985).

1.1.2.1 LA CELLULOSE

C'est un homopolysaccharide, c'est-à-dire une chaîne linéaire constituée d'unités D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β 1-4 (Fig.3). L'unité de base, la cellobiose, est constituée de deux oses et permet de définir un degré de polymérisation pouvant aller à plus de 10 000 unités. Les chaînes peuvent être liées entre elles par des liaisons hydrogènes intramoléculaires formant ainsi des microfibrilles de cellulose. C'est la forme de matière organique la plus abondante sur Terre (40 à 50% de la biomasse), la production de cellulose par les végétaux se compte en plusieurs dizaines de milliard de tonnes par an. C'est une matière première utilisée notamment dans la papeterie, la fabrication textile ou en tant qu'isolant. De nouvelles utilisations potentielles, comme la production de biocarburants ont également fait leur apparition.

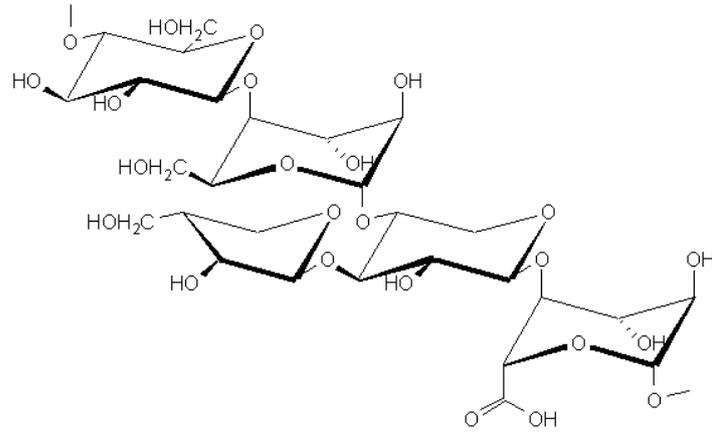


Figure 4 : L'hémicellulose est un hétéropolysaccharide, l'exemple montre une chaîne principale constituée (du haut vers le bas) de glucose, de mannose, de xylose et d'acide glucuronique. Elle est substituée latéralement par un arabinose.

1.1.2.2 L'HÉMICELLULOSE

Également composées d'osides, les chaînes sont plus courtes (50 à 300 unités) et ne sont pas totalement linéaires comme pour la cellulose, elles peuvent ainsi présenter des embranchements (Fig.4). L'hémicellulose est donc un hétéropolysaccharide qui est composé d'hexoses (glucose, mannose ou galactose...), mais également de pentoses comme le xylose, qui est le sucre généralement le plus abondant en particulier dans les feuillus. On trouve également des acides hexuroniques, comme l'acide glucuronique ou l'acide galacturonique.

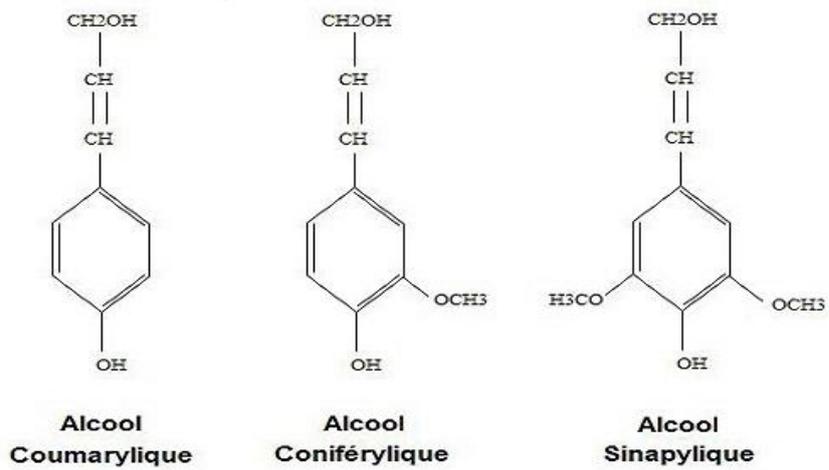


Figure 5 : Monolignols à la base de la synthèse de la lignine (Weng & Chapple, 2010).

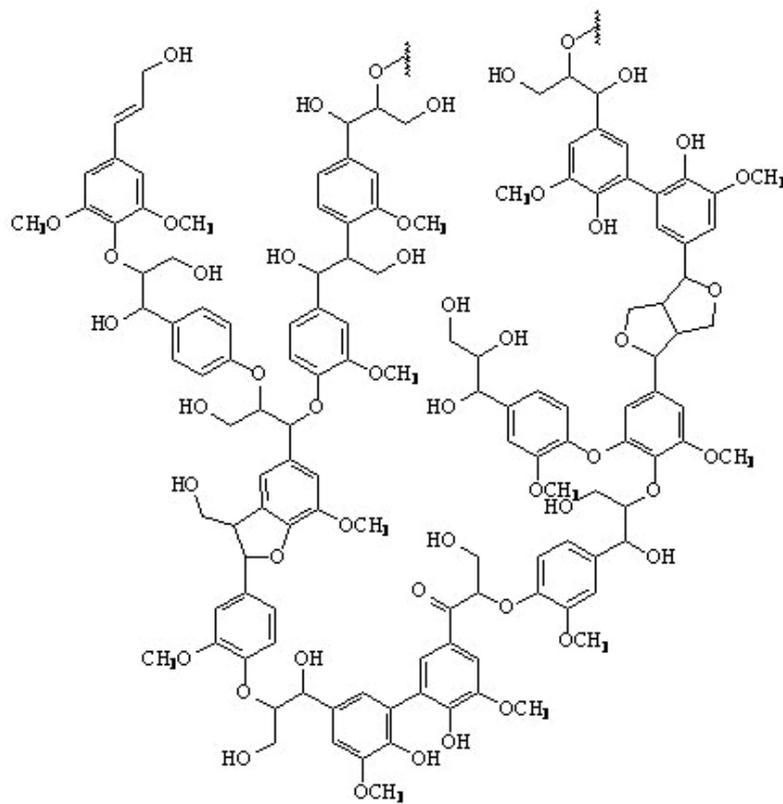


Figure 6 : Modèle statistique de structure que peut prendre la lignine.

1.1.2.3 LA LIGNINE

Bien que plus complexe, la structure de la lignine provient d'un élément unique, à savoir la phénylalanine qui donnera les trois constituants majoritaires (monolignols) que sont, l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, aussi nommés respectivement les unités H, G et S une fois intégrés dans la lignine (Weng & Chapple, 2010) (Fig.5). C'est le deuxième polymère naturel le plus présent après la cellulose. Il est hautement réticulé et sa structure est rendue complexe de par la présence de nombreux types de liaisons (Fig.6). Cette structure va permettre de donner des propriétés hydrophobes au bois du fait de sa composition phénylpropanoïque et d'en augmenter la rigidité, la lignine pouvant être liée de manière covalente avec la cellulose et l'hémicellulose grâce à l'action de laccases et de peroxydases impliquées dans l'activation des monolignols en les transformant en espèces radicalaires.

D'autres constituants peuvent entrer dans la formation des parois. On peut ainsi retrouver de la pectine, principalement constituée d'acides galacturoniques et de rhamnose ou encore l'HRGP (Hydroxyprolin Rich Glyco Protein) dont la quantité augmente lorsque les cellules végétales sont infectées et peut atteindre 10% de la paroi primaire.

Le bois est un matériau qui joue un rôle important dans la séquestration du carbone car il permet la fixation du CO₂ atmosphérique. Ceci est d'autant plus vrai si le bois n'est pas décomposé après la mort de l'arbre, par exemple en l'utilisant en tant que bois de charpente. Cependant, en conditions naturelles, il sera recyclé par un mécanisme de décomposition et le CO₂ sera donc relargé.

Le bois, et en particulier la lignine, n'est cependant pas dégradé pour beaucoup d'organismes. Néanmoins il peut être dégradé par des insectes xylophages, des bactéries et par certains champignons. Ces derniers sont bien plus aptes à dégrader le bois que les bactéries, celles-ci nécessitant souvent des conditions particulières comme une saturation du bois en eau pour certaines bactéries anaérobies. Toutefois, elles peuvent permettre une meilleure colonisation du bois par les champignons en présentant une activité nitrogénase, permettant ainsi d'augmenter la quantité d'azote disponible, ce dernier étant généralement un facteur limitant. A ce titre il a été démontré que l'azote peut également inhiber, *in vitro*, la production d'enzymes impliquées dans la dégradation du bois (Fenn & Kent Kirk, 1981), même s'il peut également engendrer une production plus importante d'enzymes en permettant une augmentation de la biomasse (Kachlishvili et al, 2006).

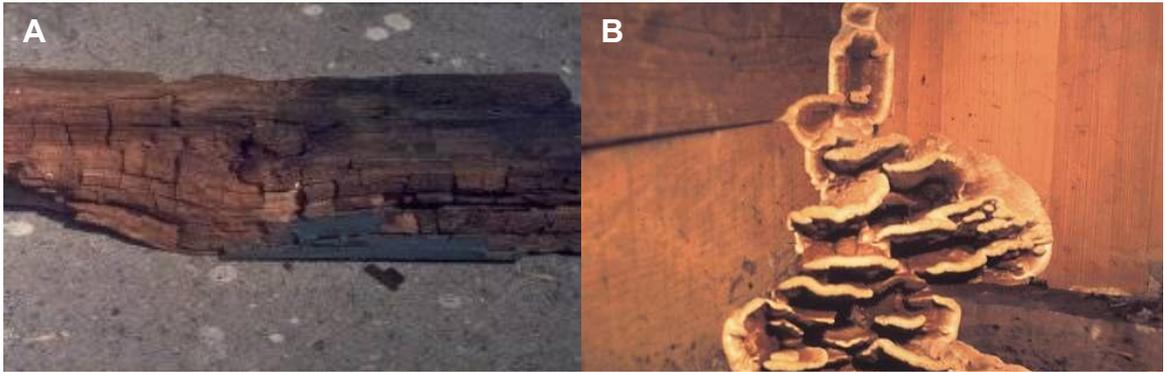


Figure 7 : Aspect cubique du bois après l'attaque par un champignon de la pourriture brune (A). Fructification de la Mérule pleureuse (*Serpula lacrimans*), caractérisée par la couleur rougeâtre que prend le champignon (B).

1.2 LES CHAMPIGNONS XYLOPHAGES

Couramment nommés champignons lignivores, alors qu'ils n'attaquent pas tous la lignine, les champignons xylophages sont généralement classés en trois catégories en fonction de la manière dont ils vont attaquer le bois et des dégâts qu'ils vont provoquer.

1.2.1 LES CHAMPIGNONS DE LA POURRITURE BRUNE

Cette catégorie de champignons est la plus fréquente dans les habitations. Elle est aussi appelée pourriture cubique à cause de l'aspect que prend le bois une fois qu'il a été attaqué. Les champignons s'attaquent essentiellement à la cellulose et aux hémicelluloses, mais peu à la lignine accentuant ainsi la coloration brune du bois. En séchant, le bois va se fendre donnant ainsi l'aspect de cube (Fig.7, A). Elle est provoquée par des basidiomycètes, on peut citer *Gloeophyllum trabeum*, *Lenzites sepiaria*, *Coniophora puteana* et la mэрule pleureuse (*Serpula lacrymans*) (Fig.7, B). Cette dernière est la principale cause d'attaque du bois dans les habitations (Schmidt, 2007) car elle est capable de se propager à travers les fondations et de se développer à partir d'une source d'humidité, alors que la plupart des champignons de la pourriture brune nécessitent la présence d'humidité dans tout le bois pour pouvoir se développer. Ce type de pourriture est connue depuis l'antiquité : ainsi la mэрule pleureuse est appelée peste rouge dans la Bible. Plus récemment on relate l'infection du H.M.S. Victory, le navire amiral de Nelson à Trafalgar, ainsi que de nombreux autres navires de la marine anglaise par le conioflore des caves et par la mэрule. Ce type de pourriture est d'autant plus dangereux qu'une perte de 2% de la masse du bois équivaut à une perte d'environ 50% de la résistance de ce dernier.

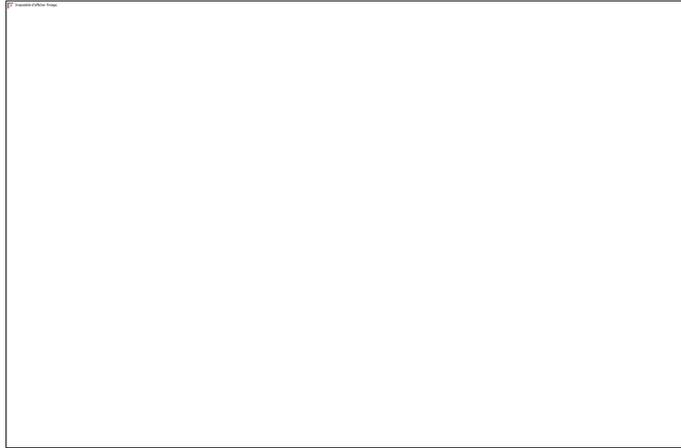


Figure 8 : Image en microscopie optique de *Chaetomium globosum* un champignon de la pourriture molle.



Figure 9 : Tronc d'arbre attaqué par *P. chrysosporium* un agent de la pourriture blanche.

1.2.2 LES CHAMPIGNONS DE LA POURRITURE MOLLE

Ces champignons se développent dans le bois en contact direct avec la terre ou avec de l'eau car ils demandent un taux d'humidité élevé. Ils attaquent également la cellulose et rendent le bois extrêmement friable. C'est une pourriture du bois qui est provoquée par des ascomycètes et des deutéromycètes. L'agent de la pourriture molle le plus connu est un ascomycète ; *Chaetomium globosum* (Fig.8) (Andersen & Nissen, 2000), qui peut être impliqué dans des contaminations humaines en raison de la production de mycotoxines (Ueno, 1985).

1.2.3 LES CHAMPIGNONS DE LA POURRITURE BLANCHE

Ce groupe est uniquement constitué de basidiomycètes, ils sont capables de dégrader la cellulose et les hémicelluloses, mais également de dégrader et de minéraliser la lignine. La dégradation de la lignine entraîne une décoloration du bois attaqué donnant la couleur caractéristique à ce type d'attaque du bois. Certains champignons dégraderont tous les constituants du bois de manière simultanée tandis que d'autres attaqueront en premier la lignine et les hémicelluloses. Ceci ouvre un potentiel intéressant pour l'industrie papetière (Blanchette, 1984).

Afin de pouvoir dégrader le bois, les champignons vont devoir excréter un ensemble de protéines qui vont modifier et dégrader leurs substrats selon un processus oxydatif. Ce processus de dégradation étant peu spécifique, ces protéines représentent un intérêt important en bioremédiation. Il a été démontré qu'une grande diversité de xénobiotiques pouvaient être dégradés comme des pesticides, des hydrocarbures, des polymères synthétiques (Gusse et al, 2006), ainsi que des colorants (Pointing, 2001) (Rabinovich et al, 2004). Parmi ces champignons nous retrouvons *P. chrysosporium* (Fig.9), *Trametes versicolor* ou encore *Pleurotus ostreatus*.

On peut trouver une quatrième catégorie de champignons attaquant le bois connue sous le nom de champignons du bleuissement. Cependant ces champignons ne provoquent pas réellement de dégâts dans la structure du bois, mais entraînent une dépréciation du bois du fait de l'aspect visuel de ce dernier.



Figure 10 : Mycélium de *P. chrysosporium* en train de coloniser des copeaux de bois.

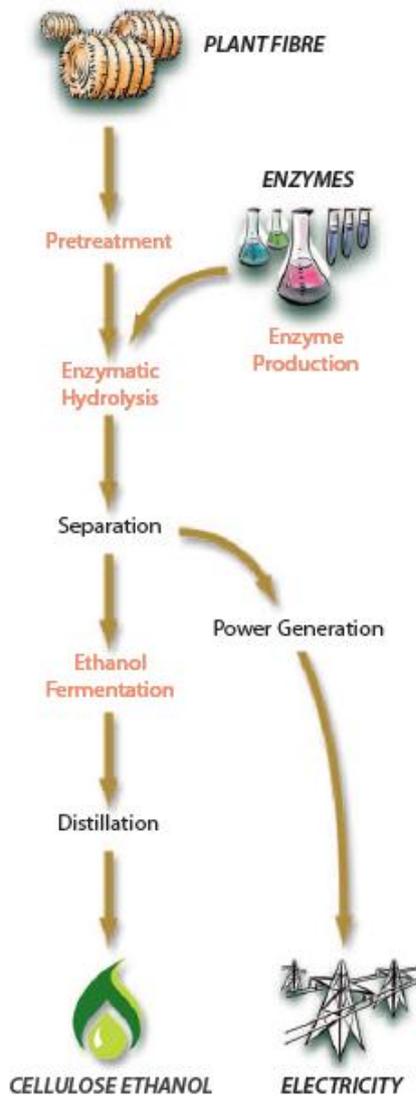
1.3 PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM

P. chrysosporium est un basidiomycète faisant partie de l'ordre des polyporales (Basidiomycota, Agaricomycotina, polyporales). Il a été décrit par Hal Burdsall en 1974, comme étant un champignon capable de croître sur des copeaux de bois (Fig.10) (Burdsall & Eslyn, 1974). *P. chrysosporium* est un décomposeur de feuillus et de résineux qui a été trouvé dans les forêts tempérées en Amérique du Nord, mais également en Europe. Il possède deux types d'enzymes particulièrement étudiées : il s'agit des manganèse-peroxydase (MnPs) et des lignines-peroxydases (LiPs), les premières ayant besoin de manganèse en tant que médiateur à l'inverse des secondes (Kersten & Cullen, 2007) Sa culture présente de multiples avantages. En effet, la croissance de ce champignon est extrêmement rapide et sa température optimale de croissance est d'environ 40°C, température que l'on retrouve notamment lors de la fabrication du compost. Il est cependant capable de pousser à des températures plus élevées.

Ses capacités de dégradation ainsi que sa croissance rapide font de *P. chrysosporium* un organisme modèle des champignons de la pourriture blanche qui est très étudié et qui a donné lieu au séquençage des 30 Mb de son génome en 2004 (Martinez et al, 2004).

Sur la base de données de Scopus (<http://www.scopus.com>), le terme « *Phanerochaete chrysosporium* » génère 1192 résultats en limitant la recherche sur les titres. Ce nombre est plus petit que pour certains organismes modèles de laboratoire tels que *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* qui génèrent respectivement 7639, 15496, 346974 et 104383 résultats. Cependant il est déjà comparable à des organismes modèles comme *Mus musculus* ou *Agrobacterium tumefaciens* qui génèrent 1649 et 2160 résultats.

P. chrysosporium génère plus de résultats que d'autres champignons de la pourriture blanche tel que *T. versicolor* ou *P. ostreatus* qui obtiennent respectivement 363 et 740 résultats. La comparaison avec des champignons de la pourriture cubique est aussi significative, ainsi *Serpula lacrymans* qui est pourtant un important agent de dégradation du bois dans les habitations, ne génère que 52 résultats, *Gloeophyllum trabeum* et *Coniophora puteana* ne génèrent quant à eux respectivement que 31 et 32 résultats. En comparaison, des champignons mycorrhiziens comme *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Laccaria bicolor*, *Tuber melanosporum* et *Hebeloma cylindrosporum* génèrent respectivement 219, 232, 99, 80 et 49 résultats, ce qui est moindre alors



IOGEN TECHNOLOGY MAKES IT POSSIBLE

Process Overview

Iogen technology makes it economically feasible to convert biomass into cellulose ethanol using a combination of thermal, chemical and biochemical techniques. The yield of cellulose ethanol is more than 340 litres per tonne of fibre. The lignin in the plant fibre is used to drive the process by generating steam and electricity, thus eliminating the need for fossil CO₂ sources such as coal or natural gas.

Technology Innovations

PRETREATMENT

Iogen developed an efficient pretreatment method to increase the surface area and "accessibility" of the plant fibre to enzymes. We achieve this through our modified steam explosion process. This improves ethanol yields, increases pretreatment efficiency, and reduces overall cost.

ENZYME PRODUCTION

Iogen has new, highly potent and efficient cellulase enzyme systems tailored to the specific pretreated feedstock. Iogen already has a worldwide business making enzymes for the pulp and paper, textiles and animal feed industries.

ENZYMATIC HYDROLYSIS

Iogen developed reactor systems that feature high productivity and high conversion of cellulose to glucose. This is accomplished through separate hydrolysis and fermentation using a multi-stage hydrolysis process.

ETHANOL FERMENTATION

Iogen uses advanced microorganisms and fermentation systems that convert both C₆ and C₅ sugars into ethanol. The "beer" produced by fermentation is then distilled using conventional technology to produce cellulose ethanol for fuel grade applications.

PROCESS INTEGRATION

Large-scale process designs include energy efficient heat integration, water recycling, and co-product production that make the overall process efficient and economical. Iogen has successfully validated these improvements within its demonstration scale cellulose ethanol facility.

Figure11 : L'utilisation d'enzymes afin de dégrader la ligno-cellulose permet d'augmenter la production d'éthanol (Source IOGEN : www.iogen.ca).

que ces champignons peuvent également représenter un intérêt commercial. En prenant des modèles de champignons phytoparasites comme *Magnaporthe grisea*, *Ustilago maydis*, et *Botrytis cinerea*, seul *Botrytis* génère un nombre comparable de résultats avec respectivement 469, 575 et 1350 résultats, ce dernier est très étudié car il possède plus de 200 plantes hôtes répertoriées et peut provoquer des pertes estimées à 20 % des récoltes mondiales. Un autre champignon phytopathogène génère plus de résultats, il s'agit de *Fusarium oxysporum* avec 5380 publications, cependant ce dernier est certainement mis en avant à cause de ses mycotoxines qui peuvent être toxiques pour l'Homme. Ainsi, des champignons dangereux pour l'Homme comme *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans* génèrent respectivement 2905, 2626, 4075 et 10237 résultats.

Le nombre de résultats relativement élevé, si on le compare par exemple à *B.cinerea*, s'explique par l'intérêt qu'il suscite en biotechnologie. Ainsi, en plus de son intérêt pour l'industrie papetière, où il pourrait permettre de traiter la lignine, qui représente 30% du carbone du bois et qui n'est pas conservée pour la préparation du papier car elle provoque son jaunissement. L'utilisation de ses enzymes extracellulaires est également étudiée afin de remplacer notamment les agents chlorés, utilisés comme agents de blanchiment dans la pâte à papier, et ainsi produire du papier de même blancheur sans avoir recours à des agents chimiques (Sigoillot et al, 2005).

Les enzymes lignolytiques représentent également un énorme intérêt dans l'industrie des biocarburants. Environ 90 milliards de litres d'éthanol ont été produits en 2010 afin de remplacer en partie le carburant nécessaire au transport routier. Initialement produit à partir de canne à sucre comme au Brésil, l'éthanol est aussi produit à partir de betterave ou encore de maïs. Cependant, cela présente des désavantages comme une envolée du cours du maïs à l'origine d'émeutes au Mexique en 2007, qui sont à l'origine d'une interdiction de son utilisation pour la production d'éthanol. En Europe il a été estimé que 15% des surfaces cultivées seraient nécessaires à la production de seulement 5% de sa consommation en carburants. C'est pourquoi l'utilisation d'enzymes comme les glucanases et les cellobiohydrolases mais également les hémicellulases et les ligninases est étudiée afin d'améliorer la production d'éthanol à partir des déchets ligno-cellulosiques comme la paille (Singh et al, 2011). Les plus grandes sociétés de production de bioéthanol comme POET et IOGEN cherchent à produire ce que l'on appelle communément le « bioéthanol de seconde génération » en utilisant ces enzymes (Fig.11), ce qui pourrait permettre de produire près de 500 milliards de tonnes d'éthanol par an (Dashtban et al, 2009).



Figure 12 : Pollution de la Pearl River (Chine) causée par la libération de colorants industriels.

Le système lignolytique de *P. chrysosporium* peut également être utilisé afin de dégrader des polluants. L'implication des Manganèse peroxydases a été particulièrement étudiée (Hofrichter, 2002). Il en découle des utilisations potentielles pour dégrader des composés phénoliques (Aitken et al, 1989), des sols contaminés aux HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) (Wang et al, 2009a) ou encore aux PCBs (polychlorobiphényles) (Fernandez-Sanchez et al, 2001) (Pointing, 2001). *P. chrysosporium* est également étudié pour dégrader un autre type de polluant, à savoir les colorants industriels. Ils peuvent être à l'origine de pollutions importantes comme dans le delta de la Pearl River en Chine où les colorants sont déversés directement dans la rivière (Fig.12). De nombreuses usines de Jeans sont effectivement localisées en Chine à Guangzhou, également connue sous le nom de « capitale mondiale du blue jeans ». *P. chrysosporium* est capable de dégrader un substrat modèle comme le poly R-478 (Dominguez et al, 2001). Il est intéressant de noter que, dans les conditions de cultures utilisées, il a été déterminé que les activités MnPs et LiPs étaient respectivement de 1350 et 364 U/l. Or le manganèse nécessaire à l'activité MnPs est également utilisé lors de la teinture. Il est ainsi utilisé sous sa forme permanganate de potassium (KMnO_4) pour éclaircir les jeans et leur donner leur aspect délavé, car, à l'inverse d'agents blanchissants comme l'hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ou de sodium $\text{Na}(\text{ClO})_2$, il n'attaque pas la fibre. Le manganèse est rejeté en même temps que les colorants provoquant ainsi une double pollution alors qu'il pourrait être utilisé afin de dégrader les colorants. Il a été démontré que de nombreux autres colorants pouvaient être dégradés à l'aide d'enzymes lignolytiques, ce qui ouvre de grandes perspectives à leur utilisation (Eichlerova et al, 2006; Ghasemi et al, 2010; Pointing, 2001).

Les enzymes lignolytiques présentent de multiples applications dont certaines n'ont pas été décrites comme la dégradation des matières plastiques (Orhan & Buyukgungor, 2000) ou dans le traitement des déchets. Ces enzymes seront décrites dans le chapitre suivant.

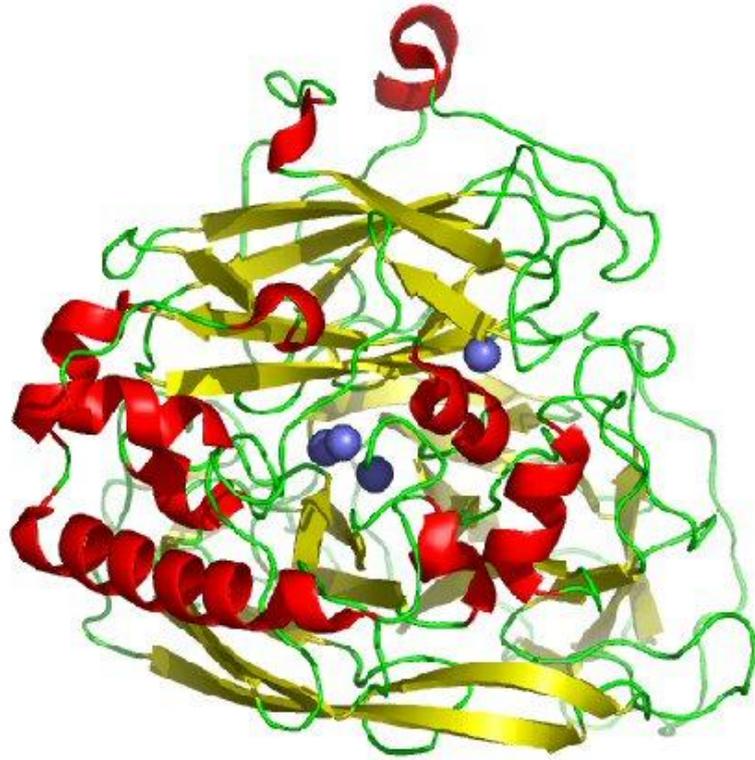


Figure 13 : Laccase de *T. versicolor* ; les quatre atomes de cuivre du centre réactionnel ont une disposition précise, un atome de cuivre isolé permet l'oxydation des phénols tandis qu'un cluster de 3 atomes de cuivre est responsable de l'activation du dioxygène (Piontek et al, 2002).

1.4 SYSTÈME LIGNOLYTIQUE DES CHAMPIGNONS LIGNIVORES

La paroi végétale, et en particulier la lignine, est très résistante. Même après la mort de la plante, le bois ne se décomposera pas aussi vite que les feuilles par exemple. Les champignons saprophytes vont cependant coloniser le bois afin d'accéder notamment aux sources de carbone disponibles dans ce dernier. Ils vont alors mettre en place un système de dégradation impliquant plusieurs enzymes comme les laccases (EC 1.10.3.2), des peroxydases (EC 1.11.1.X), à savoir, des lignines peroxydases (LiPs ; EC 1.11.1.14), les manganèses peroxydases (MnPs ; EC 1.11.1.13) ou encore des peroxydases dites «versatiles» (VPs ; EC 1.11.1.16). Les champignons sécrèteront également des enzymes auxiliaires qui permettront notamment de générer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) nécessaire à l'activité des peroxydases (Kersten & Cullen, 2007).

1.4.1 LES LACCASES

Les laccases (p-diphénol dioxygène oxydoréductases, EC 1.10.3.2) sont des métalloprotéines de 50 à 110 kDa contenant quatre atomes de cuivre dont l'arrangement correspond aux enzymes classées dans la famille des oxydases bleues à cuivre (Thurston, 1994). Elles sont impliquées dans des processus d'oxydation en utilisant le dioxygène comme accepteur final d'électrons afin de le réduire en eau. Elles sont capables d'oxyder des composés phénoliques, des diamines aromatiques et certains composés inorganiques (Xu, 1996). La conformation des centres réactionnels est caractéristique avec un des quatre atomes de cuivre qui est responsable de l'oxydation du substrat tandis que les trois autres forment un cluster impliqué dans l'activation du dioxygène (Piontek et al, 2002) (Fig.13). Il a été démontré que chez de nombreux organismes la production de laccase était régulée par la présence de cuivre (Collins & Dobson, 1997; Palmieri et al, 2000), et qu'elle pouvait être modulée par certains xénobiotiques (Gonzales et al, 2002; Xiao et al, 2004).

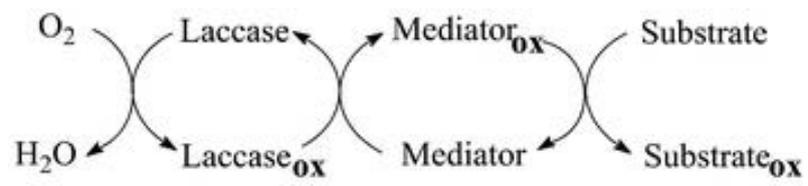


Figure 14 : Mécanisme de dégradation de substrats non phénoliques catalysé par les laccases.

Elles sont impliquées dans la dégradation de la lignine en formant des espèces radicalaires de composés phénoxyliques qui peuvent entraîner la rupture de liaisons aryl-C. Du fait de la structure de la lignine, ce phénomène de dégradation peut impliquer l'utilisation de médiateurs intermédiaires qui, une fois oxydés, iront à leur tour attaquer la lignine et pourront attaquer des composés non phénoliques (D'Acunzo et al, 2004) (Fig.14). Ces enzymes ont été largement étudiées et trouvent un intérêt en biotechnologie, ainsi les laccases sont utilisées dans des processus tels que le blanchiment de la pâte papetière, les biosenseurs, les industries alimentaires, la décoloration de teinture industrielle (Eichlerova et al, 2006) (Zouari-Mechichi et al, 2006), l'assainissement des sols ainsi qu'en bioremédiation (Mayer & Staples, 2002), et dans la production de polymères complexes.

Ces enzymes semblent présentes chez de nombreux champignons (Valderrama et al, 2003), y compris des champignons non lignivores comme *B. cinerea*, un phytopathogène, où elles semblent nécessaires à la pathogénicité (Goetz et al, 1999). Quatre laccases ont été mises en évidence chez *P. ostreatus* (Mansur et al, 2003), le même nombre de laccases a été déterminé chez *T. versicolor* en fonction de leur pH isoélectrique (Jonsson et al, 1995), 17 gènes de laccases sont présents chez *C. cinerea* (Kilaru et al, 2006). Cependant il y a débat quant à la présence de laccases chez *P. chrysosporium* ainsi, divers auteurs ont détecté une activité laccase, cependant, ces résultats sont contestés et pourraient être dus à un artefact causé par le manganèse (Podgornik et al, 2001), de plus l'absence de gènes codant pour des laccases dans le génome de la souche RP78 a été mise en avant (Kersten & Cullen, 2007). Une étude a cependant mis en avant la présence d'une protéine de type oxydase sécrétée et nommée MCO1, cette dernière présente une activité ferroxidase (Larrondo et al, 2003). Des recherches dans le genre *Phanerochaete* ont permis de mettre en évidence et de cloner une laccase de *Phanerochaete flavido-alba*. L'analyse phylogénétique de cette laccase la classe cependant dans un clade différent des laccases de basidiomycètes et met en avant une ressemblance avec MCO1 (Rodríguez-Rincón et al, 2010). Il semblerait également que deux isoformes de laccases soient présentes chez *P. chrysosporium* NCIM 1197 (Gnanamani et al, 2006). L'absence de laccases dans la souche RP78, qui arrive pourtant à dégrader efficacement le bois, a remis en cause l'importance des laccases dans la délignification, cependant, il a été démontré que chez *Sporotrichum pulverulentum* elles étaient nécessaires à la dégradation efficace de la lignine (Ander & Eriksson, 1976).

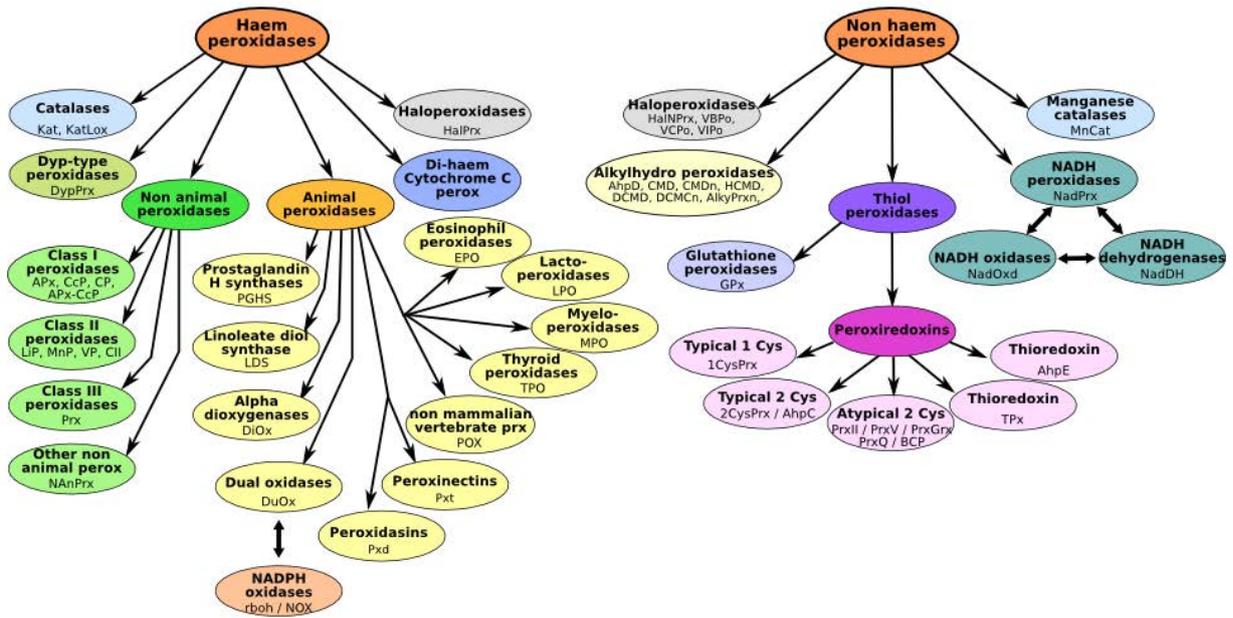
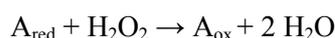


Figure 15 : Classification des différentes familles de peroxydase selon le site peroxibase (Passardi et al, 2007).

1.4.2 LES PEROXYDASES

Les peroxydases existent dans tous les règnes du vivant, ces enzymes sont des oxydases, qui utilisent divers peroxydes (ROOH) comme accepteurs final d'électrons pour catalyser un certain nombre de réactions d'oxydation. Elles sont classées en deux grandes catégories suivant qu'elles possèdent ou non un centre hémique (Fig.15) et catalysent une réaction du type :



A_{red} étant un substrat donneur d'électron donnant A_{ox} une fois oxydé. En fonction de la nature de A la stoechiométrie de la réaction pourra nécessiter une ou deux moles de A pour la réduction du peroxyde d'hydrogène. Certaines peroxydases utiliseront également un substrat de type hydroperoxyde à la place de H_2O_2 .

Les peroxydases catalysent une multitude de réactions en fonction de leurs substrats, ainsi chez l'Homme certaines sont nécessaires au système immunitaire ou à la régulation hormonale comme la synthèse des hormones thyroïdiennes. Leur quantité est plus importante chez les plantes où elles sont impliquées dans le métabolisme de l'auxine, l'élongation cellulaire, la formation de la lignine et de la subérine, ou encore dans des mécanismes de défense contre les agents pathogènes. Alors que certaines peroxydases sont impliquées dans des processus pro-oxydants, comme les lignine-peroxydases (EC 1.11.1.14), d'autres sont impliquées dans les processus de protection. Nous pouvons ainsi citer les catalases (EC 1.11.1.6) ou les glutathion peroxydases (EC 1.11.1.9) qui seront plus longuement décrites dans la suite de ce manuscrit. Les peroxydases représentent un grand intérêt en biotechnologie, ainsi la peroxydase du raifort (HRP) est utilisée comme révélateur, notamment en étant conjuguée à des anticorps (Veitch, 2004). Les champignons saprophytes utilisent certaines peroxydases afin de dégrader les polymères du bois, ces protéines sont regroupées dans les peroxydases hémiques de classe II (Fig.15).



Figure 16 : Structure d'une lignine-peroxydase (isozyme H2) de *P. chrysosporium* à une résolution de 1,7 Å. Les atomes de calcium représentés en noir, entourent l'hème dont le fer est représenté en gris (Choinowski et al, 1999).

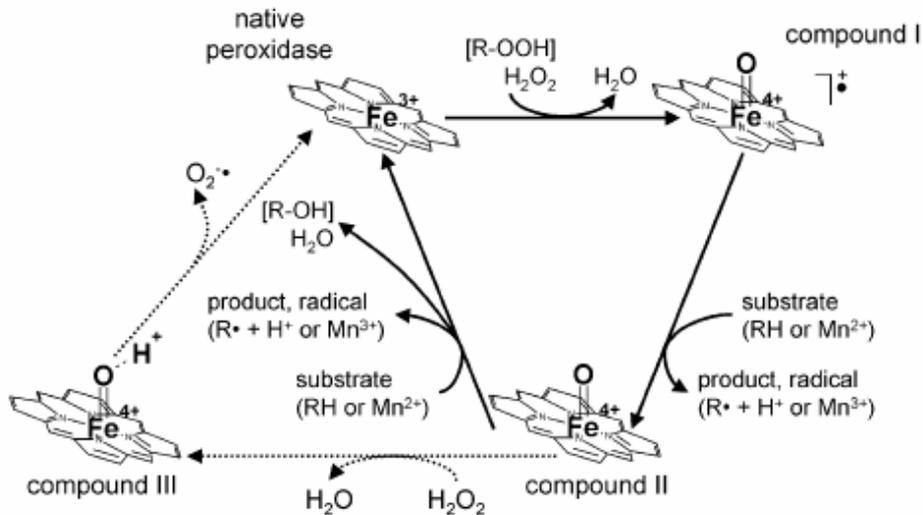


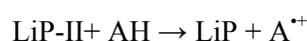
Figure 17 : Mécanisme catalytique des peroxydases impliquées dans la dégradation de la lignine (Cullen & Kersten, 2004).

1.4.2.1 LES LIGNINE-PEROXYDASES

Les lignine-peroxydases ou dirarylpropane peroxydases, (EC 1.11.1.14) sont des glycoprotéines dont les différentes isoformes ont entre 38 et 46 kDa et possèdent un noyau protoporphyrine IX (Fig.16). Le système catalytique a été largement étudié et est basé sur l'utilisation du peroxyde d'hydrogène afin de pouvoir oxyder des molécules cibles comme la lignine, ce qui entraînera sa dépolimérisation. Le peroxyde d'hydrogène oxyde l'enzyme selon un mécanisme qui implique le transfert de deux électrons permettant la formation du composé I (Fig.17) contenant un centre oxyferrique et un centre porphyrine de type Fe(IV).



Le composé I de la LiP oxydera à son tour un substrat conduisant à la formation du composé II., l'oxydation d'une deuxième molécule de substrat permettant le retour de l'enzyme à son état initial (Fig.17) (Gold et al, 1989).



Les lignines peroxydases ont un potentiel redox élevé et sont capables de dégrader une grande variété de substrats aromatiques tels que les phénols, les éthers aromatiques, ainsi que des substrats non phénoliques. Les réactions catalysées par les LiPs sont très diverses et incluent la rupture de liaisons C α -C β (Hammel et al, 1985), l'hydroxylation de groupements benzyliques ou encore des processus de déméthoxylation. En dégradant la lignine, les LiPs vont entraîner la formation d'aldéhydes, de cétones, de radicaux phénoxy et de cations radicalaires de l'alcool veratrylique (alcool 3,4-diméthoxybenzylique) (Leisola et al, 1985) (Tien & Kirk, 1984).

L'alcool veratryl est un substrat des LiPs. Il est oxydé via le transfert successif de deux électrons conduisant à la formation de veratrylaldéhyde (Tien, 1987). Chez *P. chrysosporium*, l'alcool veratryl est synthétisé en même temps que les LiPs, durant le métabolisme secondaire (Fenn & Kent Kirk, 1981). Il a de multiples effets sur le système lignolytique de *P. chrysosporium*, néanmoins son rôle exact reste incertain. Une hypothèse est que l'alcool veratryl jouerait un rôle dans la protection des lignine-peroxydases contre leur inactivation par le peroxyde d'hydrogène, mais surtout réagirait avec les lignine-peroxydases pour former un cation radicalaire qui a pu être mis en évidence par résonance électronique de spin. Ce radical pourrait

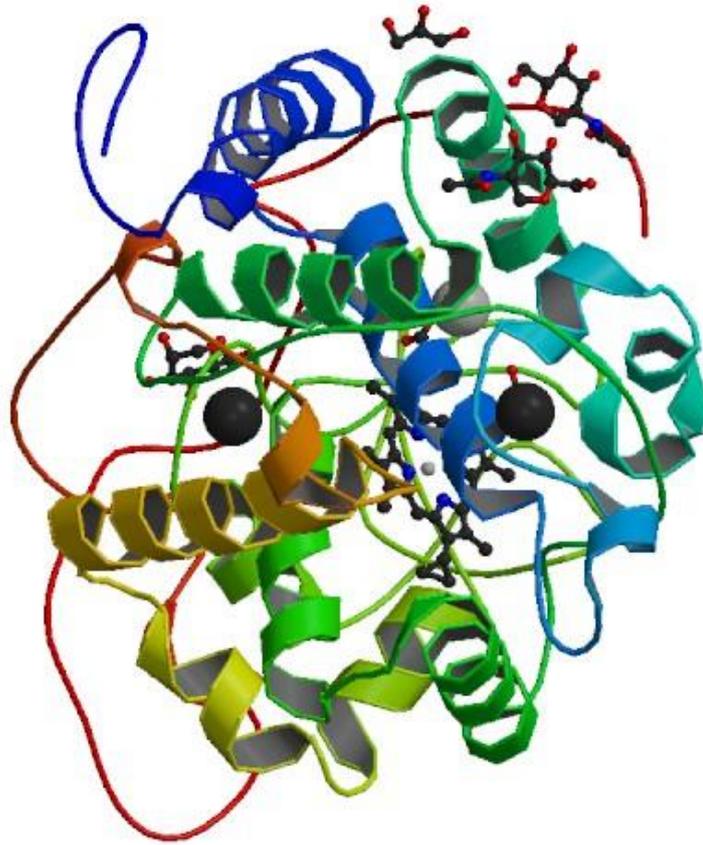


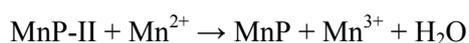
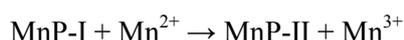
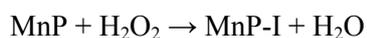
Figure 18 : Manganèse peroxydase de *P. chrysosporium* à une résolution de 0,93 Å. La position du manganèse est définie par la sphère grise, deux atomes de calcium sont présents de part et d'autre de l'hème et sont représentés en noir (Sundaramoorthy et al, 2010).

agir en tant que médiateur rédox, ce qui expliquerait pourquoi l'activité des LiPs est stimulée quand il est présent. L'alcool veratryl semble être un substrat qui entre en compétition avec les composés phénoliques et sa réactivité légèrement plus faible pourrait favoriser sa diffusion pour engendrer l'oxydation de composés phénoliques plus éloignés (Huang et al, 2003).

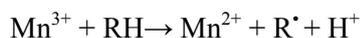
Chez *P. chrysosporium*, dix isoformes de lignine-peroxydases ont été mises en évidence (Kersten & Cullen, 2007). Ce nombre élevé d'isoformes semble être une donnée constante chez les champignons de la pourriture blanche, ainsi seize isoformes de lignine-peroxydases sont détectées chez *T. versicolor* (Johansson & Nyman, 1993).

1.4.2.2 LES MANGANÈSE-PEROXYDASES

Les manganèse-peroxydases (MnP) (EC 1.11.1.13) sont capables d'oxyder le Mn^{2+} en Mn^{3+} en utilisant le peroxyde d'hydrogène (Paszczynski et al, 1985). Elles possèdent également un centre hémique (Fig.18). Le fonctionnement de la MnP est aussi basé sur un cycle catalytique passant par trois formes distinctes de l'enzyme. La forme native de la manganèse-peroxydase est oxydée en composé MnP-I par le peroxyde d'hydrogène qui sera lui-même réduit par du Mn^{2+} et des phénols pour donner le composé MnP-II. Ce dernier pourra être réduit par du Mn^{2+} , mais pas par des composés phénoliques, afin d'obtenir à nouveau l'enzyme native (Wariishi et al, 1989).



Le manganèse ainsi libéré sous sa forme Mn^{3+} engendrera à son tour la dégradation de la lignine pour repasser sous sa forme Mn^{2+} par une réaction de la forme :



La présence d'acides organiques comme l'acide oxalique stimule l'activité des manganèse-peroxydases en stabilisant les ions Mn^{3+} formés et permet ainsi à ces derniers de diffuser plus efficacement (Glenn et al, 1986).

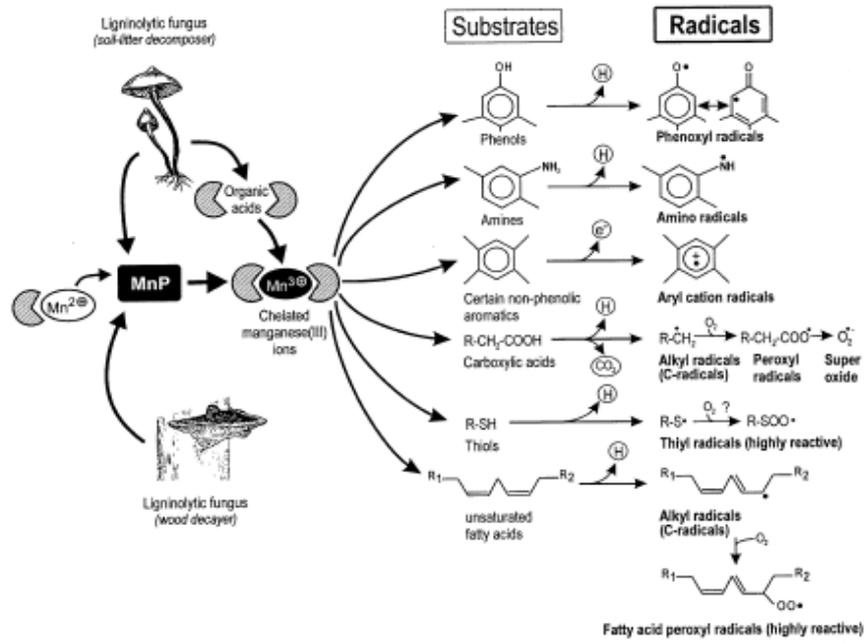


Figure 19 : Exemples de substrats pouvant être dégradés par les manganèse-peroxydases (Hofrichter, 2002).

L'utilisation de modèles de lignine a permis de suggérer que les MnPs peuvent être impliquées dans l'oxydation de composés phénoliques, mais également non phénoliques dans le processus de dégradation de la lignine. De plus, en présence de manganèse et d'acide organique, les MnPs sont capables d'oxyder une grande variété de molécules différentes (Fig.19) (Hofrichter, 2002).

Chez *T. versicolor*, cinq isoformes de manganèse-peroxydases ont été mises en évidence (Johansson & Nyman, 1993). Un nombre identique a également été détecté chez *P. chrysosporium* (Martinez et al, 2004), une sixième MnP pourrait être présente, cependant aucune séquence complète n'a pu être prédite et aucune transcription n'a pu être mise en avant. Des comparaisons de séquences ont permis de montrer que des enzymes lignolytiques sont présentes chez les champignons mycorhiziens (Bodeker et al, 2009; Chen et al, 2001). Les capacités de décomposition semblent donc présentes chez de nombreux champignons.

Une MnP est présente chez le champignon symbiotique *L. bicolor*, l'utilisation de puce à ADN permet la mise en évidence d'une surexpression de la MnP de *L. bicolor* lors de la mycorhization. Ceci pourrait suggérer une implication lors de la mise en place ou la maintenance de cette dernière. Même si les enzymes lignolytiques semblent présents dans de nombreux champignons, les champignons saprophytes présentent une diversification d'enzymes bien plus importante. Cette multiplication et spéciation des enzymes se retrouvent également pour des enzymes comme les P450 monooxygénases qui sont en quantité bien plus importante chez *P. chrysosporium* (150) que chez la levure. Ce phénomène de duplication est généralement mis en relation avec la possibilité de dégrader une grande variété de composés (Doddapaneni et al, 2005).

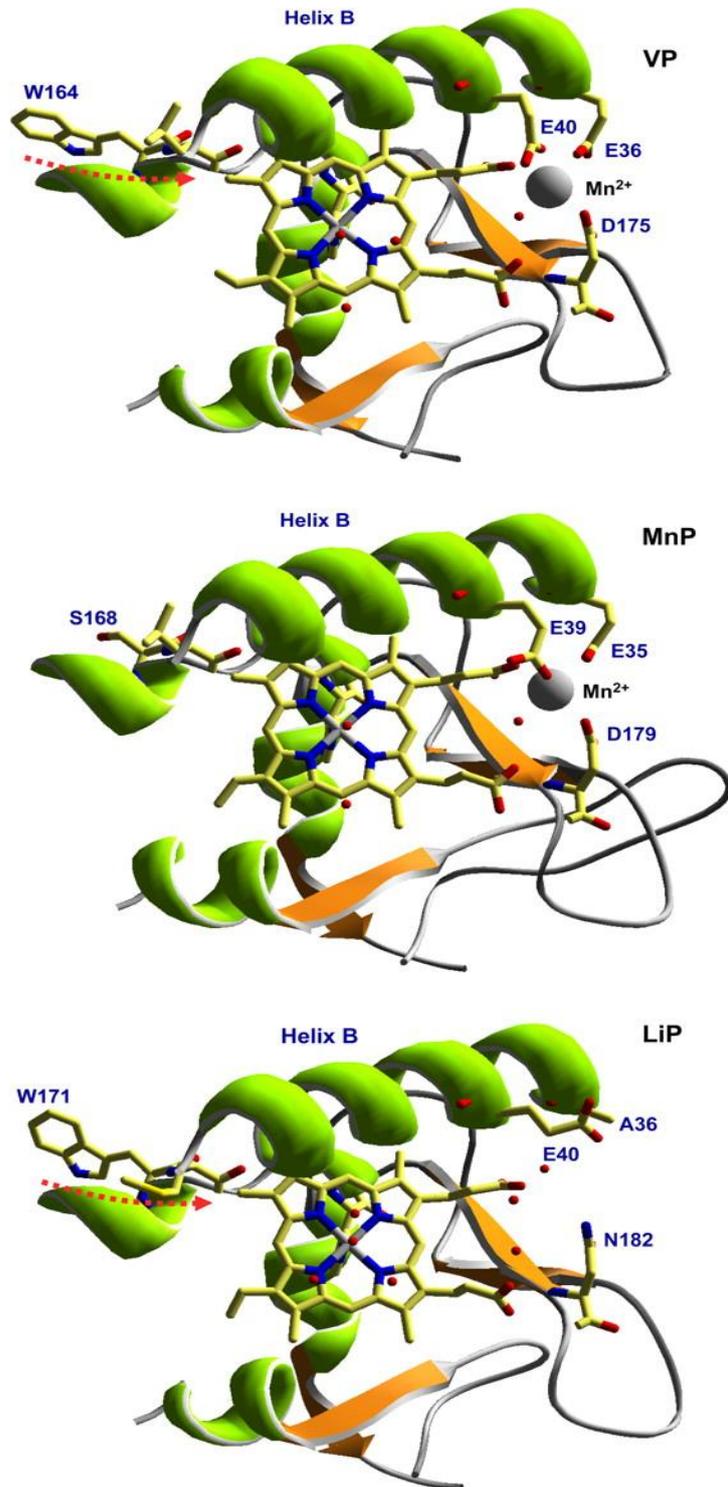


Figure 20 : Comparaison de structure entre la peroxydase-versatile (VP) de *Pleurotus eryngii* et la lignine et manganèse-peroxydase de *P. chrysosporium*. Les 3 acides aminés typiques du site de fixation du manganèse (2 glutamates et un aspartate) de la MnP (E 35,39 et D 179) sont également présents dans la VP (E 36,40 et D175). La VP porte également un tryptophane (W 164) responsable de l'activité lignine-peroxydase de la LiP (W 171) (Ruiz-Duenas et al, 2009).

1.4.2.3 LES VERSATILE-PEROXYDASES

Il a été démontré que certaines peroxydases capables d'utiliser le manganèse comme médiateur impliqué dans l'attaque de la lignine, et donc initialement défini comme MnPs comme chez *Pleurotus eryngii* (Martinez et al, 1996), sont également capables d'utiliser les substrats aromatiques de manière similaire aux lignine-peroxydases (Camarero et al, 1999). Ces enzymes ont été regroupées sous le terme de peroxydases versatiles (EC 1.11.1.16).

L'analyse phylogénétique des peroxydases met en avant que les VPs sont plus proches des LiPs que des MnPs. Le système catalytique des LiPs a été étudié et il a été déterminé que le canal présent dans les peroxydases ne joue apparemment pas de rôle dans l'oxydation des composés phénoliques. Ainsi la mutation d'une lignine-peroxydase de *P. chrysosporium* par modification en alanine des résidus entourant le canal, à savoir, l'histidine en position 82 et la glutamine en position 222 ne modifie pas l'activité de l'enzyme. A l'inverse, la mutation d'un résidu tryptophane en position 171 (Fig.20 : LIP W171), présent à la surface de la protéine, diminue drastiquement l'activité de l'enzyme (Sollewijn Gelpke et al, 2002). Les VPs semblent également présenter ce résidu et sa mutation (Fig.20 : VP W164) engendre une réduction de l'activité plus ou moins importante en fonction de l'acide aminé qui va le remplacer (Ruiz-Duenas et al, 2009). Les VPs possèdent par ailleurs les résidus nécessaires à l'oxydation du manganèse. Il s'agit de deux glutamates et un aspartate qui sont présents sur les MnPs (Fig.20 : MnP, E 35,39 et D 179). Ces résidus se retrouvent également sur les VPs (Fig.20:VP, E 36,40 et D175) (Ruiz-Duenas et al, 2009). Une analyse phylogénétique a permis de mettre en évidence que certaines enzymes initialement classées comme LiP ou comme MnP pourraient en fait être des VPs. Aucune VP ne semble être présente chez *P. chrysosporium*.

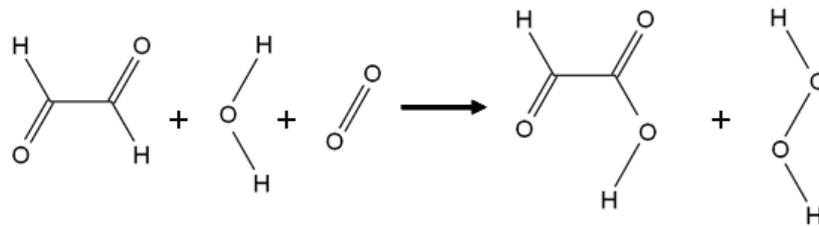


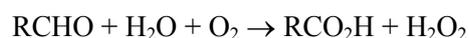
Figure 21 : Conversion du glyoxal en glyoxylate par la GLX couplée à une production de peroxyde d'hydrogène.

1.4.3 LES ENZYMES AUXILIAIRES

Le peroxyde d'hydrogène nécessaire à l'activité des peroxydases peut être généré à l'aide d'enzymes auxiliaires qui seront produites en conditions ligno-cellulolytiques. Le mécanisme permettant la production du peroxyde d'hydrogène fait intervenir plusieurs enzymes qui vont permettre la production du peroxyde d'hydrogène.

1.4.3.1 LA GLYOXAL OXYDASE

La glyoxal oxydase (GLX) est une glycoprotéine à cuivre de 68 kDa présente sous deux formes chez *P. chrysosporium* et dont le pH isoélectrique est de 4,7 et 4,9 (Kersten et al, 1995). Elle permet de générer du peroxyde d'hydrogène à partir d'aldéhydes. Il a été démontré qu'une grande variété de substrats pouvait être oxydée par la GLX selon la réaction :



L'oxydation d'un substrat modèle de la lignine par les LiPs libère différents éléments comme le glycolaldéhyde. Ce dernier est utilisable par la GLX et permet de régénérer du peroxyde d'hydrogène tout en produisant également de l'oxalate (Whittaker et al, 1996). Du glyoxal et du méthylglyoxal sont présents dans le milieu de culture en condition lignolytique. Ils sont tous deux des substrats de la GLX et pourront donc générer du peroxyde d'hydrogène à l'instar du glyoxal qui permet de produire du peroxyde d'hydrogène pendant sa conversion en glyoxylate (Fig.21).

L'expression de la GLX est temporellement corrélée avec la production de peroxydases et avec la présence de substrats dans le milieu de culture, suggérant un lien physiologique étroit entre la production de peroxydases et la production de peroxyde d'hydrogène (Kersten & Kirk, 1987; Kersten, 1990; Janse et al, 1998). Il a été mis en évidence que l'activité de la GLX était régulée de manière post-traductionnelle par la présence de peroxydases et leurs produits qui pourront à nouveau servir de substrat (Kersten, 1990). Les produits de dégradation de la lignine représentent d'excellents substrats pour la GLX et permettent de régénérer le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la dégradation de la lignine par les peroxydases (Hammel, 1994).

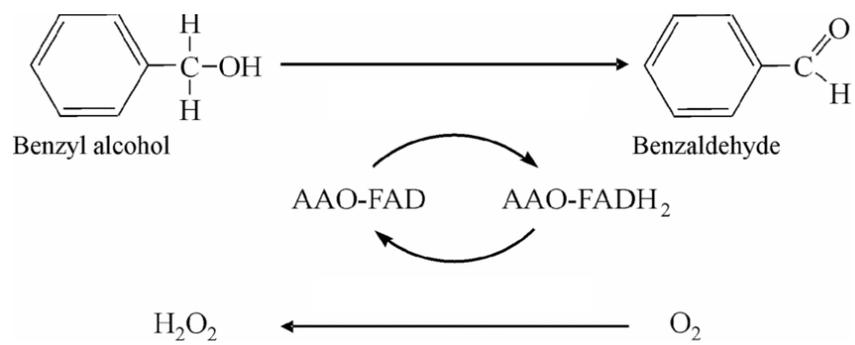


Figure 22 : Production de peroxyde d'hydrogène via la réduction d'un alcool en son aldéhyde.

1.4.3.2 LES ARYL ALCOOL OXYDASES

L'aryl alcool oxydase (AAO) va permettre de générer du peroxyde d'hydrogène en catalysant la transformation d'alcools primaires aromatiques en leurs aldéhydes correspondants (Fig.22). Pendant ces réactions, du peroxyde d'hydrogène est formé. Les substrats des AAOs peuvent être formés durant la dépolymérisation de la lignine (Muheim et al, 1990).

De nombreux substrats peuvent être utilisés par l'AAO afin de générer du peroxyde d'hydrogène comme par exemple les alcools veratryl ou anisyl (4-Methoxybenzyl alcohol), les convertissant en leur aldéhyde respectif (Fig.22) (Guillen et al, 1992). Certains substrats comme l'alcool veratryl, l'alcool anisyl ou encore le 2-Naphthalene methanol ont été mis en avant car ils permettent une production importante de peroxyde d'hydrogène. De plus, Guillen et ses collaborateurs ont démontré que certains alcools, une fois dégradés en aldéhydes, peuvent être réutilisés par les AAOs pour produire du peroxyde d'hydrogène.

Une AAO est également présente dans le génome de *P. Chrysosporium*. Cette enzyme, avec une spécificité de substrat comparable à celle des AAOs, va ainsi permettre de réduire de nombreux aldéhydes, qui seront potentiellement à nouveau des substrats des AAOs afin de générer du peroxyde d'hydrogène (Muheim et al, 1991).

1.4.3.3 LES OXYDASES

D'autres enzymes permettent encore de générer du peroxyde d'hydrogène. Ainsi *P. chrysosporium* possède également deux glucose oxydases ; une glucose-1-oxydase (EC 1.1.3.4) (Kelley & Reddy, 1986), ainsi qu'une pyranose-2-oxydase (EC 1.1.3.10) (Eriksson et al, 1986). Cette dernière a été particulièrement étudiée, localisée au niveau du périplasme, son expression est concomitante avec d'autres enzymes du système lignolytique (Pisanelli et al, 2009).

Une alcool-oxydase (EC 1.1.3.13) (aussi nommée méthanol-oxydase) semble également présente et permettre de générer du peroxyde d'hydrogène (Eriksson & Nishida, 1988).

1.4.3.4 LES CELLOBIOSE-DÉHYDROGÉNASES

Les enzymes de type cellobiose-déhydrogénases (EC 1.1.99.18) sont largement répandues chez les champignons de la pourriture blanche. Ce sont des enzymes possédant deux domaines distincts, à savoir un domaine à FAD et un hème de type b. Il a été démontré qu'elles sont capables d'engendrer l'oxydation de la cellobiose et des oligosaccharides associés en leurs lactones respectives. Des études ont montré que l'oxygène pouvait être utilisé comme accepteur final d'électron permettant ainsi la production de peroxyde d'hydrogène, cependant, les quinones, les radicaux phenoxy et le fer représenteraient de meilleurs accepteurs d'électrons (Henriksson et al, 2000). Le rôle principal de l'enzyme serait de générer des radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton. Ces radicaux, tout comme le Mn^{3+} , pourraient jouer un rôle important dans l'attaque initiale de la lignine, cette dernière ne laissant passer que des éléments de faible poids moléculaire.

S'il a été démontré que les lignine et manganèse-péroxydases sont les constituants majeurs du système ligninolytique de *P. chrysosporium*, de nombreuses autres enzymes participent également à ce mécanisme, pour certaines en générant le peroxyde d'hydrogène nécessaire aux peroxydases, pour d'autres, en ayant des activités propres comme les protéases, les endoglucanases. Ainsi, *cbh1-4*, un gène codant pour une cellobiose hydrolase, est fortement exprimé en présence de cellulose.

L'expression des ligninases est régulée par des mécanismes complexes et généralement couplée au métabolisme secondaire. Elle peut être stimulée par diverses carences. Il a été démontré qu'une carence en carbone ou en azote permettait d'engendrer la synthèse de ces dernières (Van der Woude et al, 1993). La production des LiPs peut être stimulée par une augmentation de la pression en oxygène (Dosoretz & Grethlein, 1991). Il a ensuite été montré que si le manganèse peut induire la sécrétion des MnPs, son absence peut également jouer un rôle sur la sécrétion des LiPs, via l'inactivation de la Mn-SOD, cette dernière jouant un rôle dans la détoxification des ROS générées au niveau de la mitochondrie (Rothschild et al, 1999). Cette constatation a permis de créer un lien entre la production de LiPs et le stress oxydatif (Belinky et al, 2006; Belinky et al, 2003).

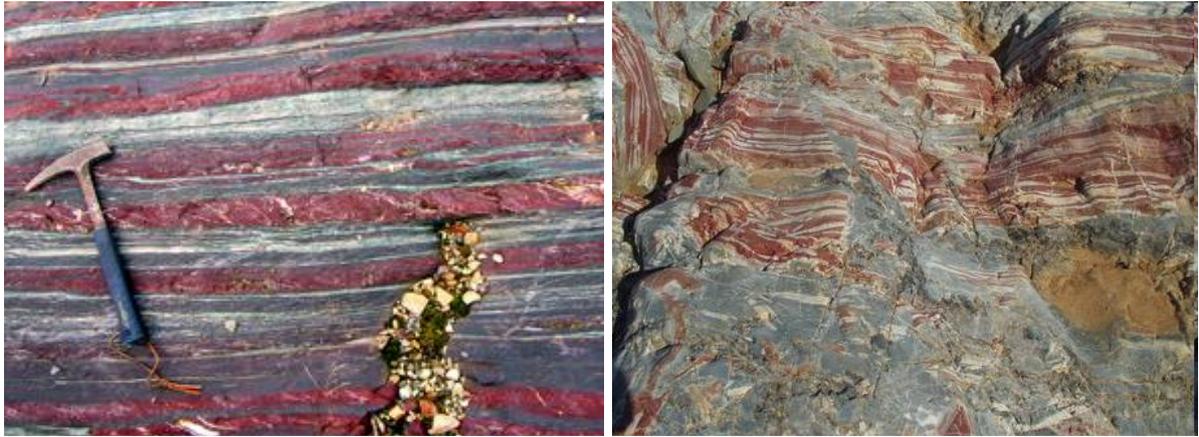


Figure 23 : Gisements de fer rubanés datant de 3 milliards d'années. Parc National Karijini en Australie-Occidentale.



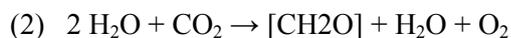
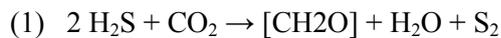
Figure 24 : Stromatolite fossilisé, et forme actuelle des stromatolites dans la baie des requins en Australie-Occidentale.

1.5 ESPÈCES OXYGÉNÉES ET STRESS OXYDATIF

1.5.1 OXYGÈNE ET ESPÈCES OXYGÉNÉES RÉACTIVES

Il y a environ 3,5 milliards d'années, les seuls organismes vivant sur Terre étaient des bactéries. Le niveau en oxygène à l'époque était inférieur à 10⁻⁵% du niveau atmosphérique actuel (Holland, 2006). L'oxygène n'étant pas encore présent elles tiraient leur énergie de mécanismes anaérobies. Elles utilisaient l'énergie du soleil pour leur métabolisme avec des donneurs d'électrons comme l'H₂S: c'est donc une photosynthèse non-oxygénique (équation 1). Dans le cas de l'H₂S, on parle de bactéries sulfureuses que l'on retrouve chez les bactéries pourpres (famille *Chromatiaccae*, *Ectothiorhodospiracca*) et les bactéries vertes.

D'autres formes de vie vont ensuite utiliser l'eau comme donneur d'électrons et permettre la production d'oxygène (équation 2).



L'oxygène étant très réactif, il va réagir avec le fer et provoquer sa précipitation massive sous forme ionique dans l'eau pour donner les célèbres gisements de fer rubanés (***banded iron formation***, abrégé en BIF) qui se sont déposés à cette période (Fig.23). En plus de la production d'oxygène, ces bactéries, comme les cyanobactéries, ont également permis de fixer du carbone sous la forme de stromatolites (Fig.24).

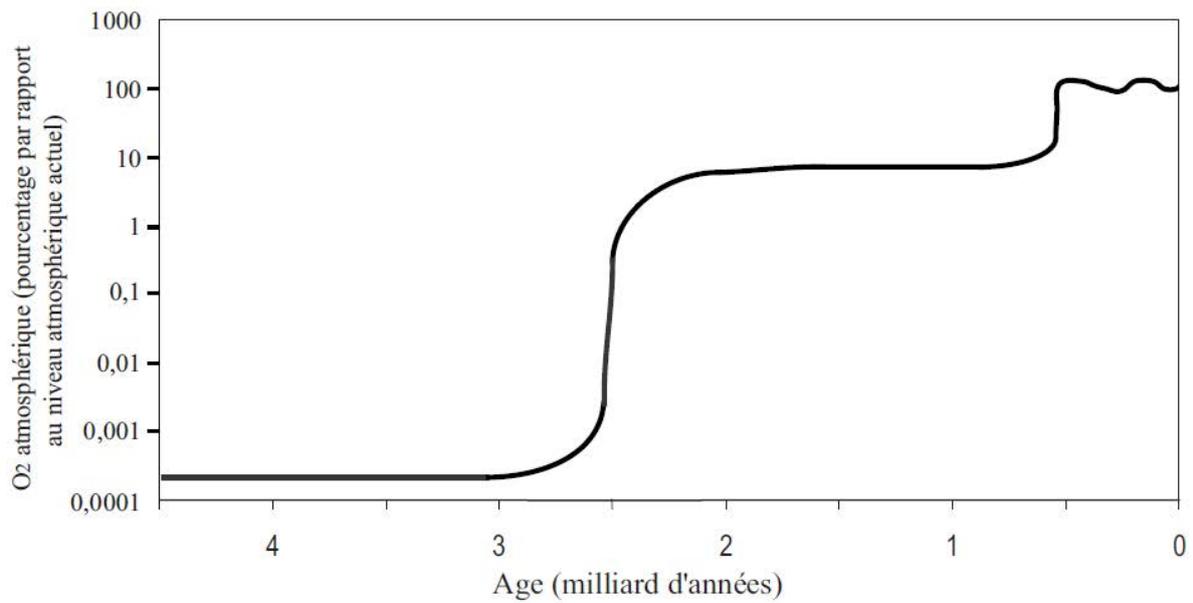
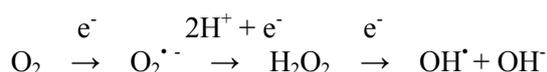


Figure 25 : Évolution de la concentration en oxygène dans l’atmosphère terrestre au cours du temps. Il y a 2.8 milliards d’années le taux d’oxygène dans l’atmosphère a augmenté à cause de l’activité des cyanobactéries. Une deuxième augmentation du niveau d’oxygène a lieu lors de la colonisation de la terre par les végétaux.

L'activité photosynthétique des cyanobactéries contenues dans les océans va engendrer une augmentation de la concentration en oxygène dans l'atmosphère jusqu'à une concentration comprise entre 1 et 10% du niveau atmosphérique actuel (Fig.25) (Kump, 2008). L'oxygène ainsi libéré va provoquer la disparition de formes de vie anaérobie. Un moyen de se protéger de l'oxygène ainsi formé est de l'utiliser comme accepteur final d'électrons via un métabolisme respiratoire, c'est cette réaction que peuvent réaliser certaines bactéries comme les α -protéobactéries qui sont certainement à l'origine de la mitochondrie (Gray et al, 2001).

Cependant l'oxygène, ou plutôt le dioxygène, n'est pas la seule forme de l'oxygène qui puisse avoir des effets délétères pour un organisme. Ainsi, les espèces oxygénées réactives, ou ROS (aussi nommées espèces actives de l'oxygène) peuvent également perturber le métabolisme. Les ROS sont des espèces radicalaires, c'est-à-dire des espèces chimiques, atomes ou molécules, possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs couches externes. Il existe des exceptions à cette définition, ainsi le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3) ou encore l'oxygène singulet sont également réactifs et peuvent être à l'origine de la formation d'autres radicaux libres. Les ROS peuvent soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Ainsi l'oxygène peut recevoir un électron pour former le radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). En acceptant un deuxième électron il y aura formation de l'ion peroxyde non radicalaire qui peut être protoné pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène étant relativement instable ce dernier pourra lentement se dismuter en radicaux hydroxyles ($OH\bullet$). Ces réactions sont résumées ci-dessous:



Ces éléments ainsi formés pourront également réagir avec d'autres composés et produire d'autres espèces radicalaires comme des peroxydinitrites NOO^{\bullet} . *In vivo* ils peuvent réagir avec des composants de la cellule et produire d'autres espèces radicalaires comme des radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}), des radicaux alkoxydes (RO^{\bullet}), R pouvant être une chaîne carbonée comme un acide gras ou la chaîne peptidique d'une protéine.

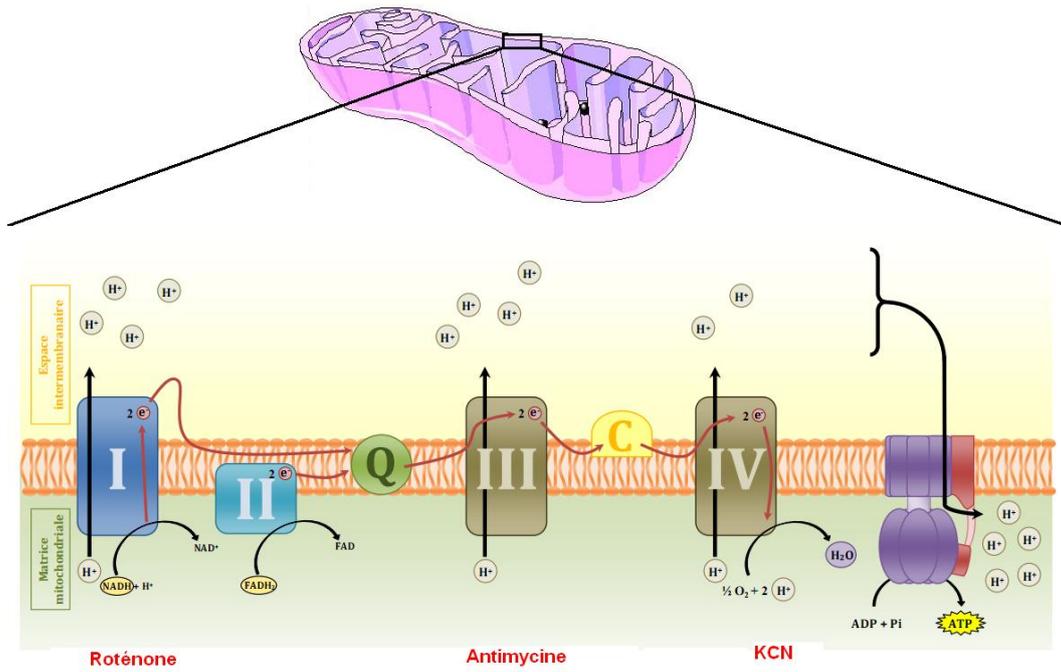


Figure 26 : Chaîne respiratoire mitochondriale : Les complexes 1,3 et 4 sont des pompes à protons servant à générer un gradient d'H⁺ qui va permettre de synthétiser de l'ATP au niveau du complexe F₀-F₁ (ATPase).

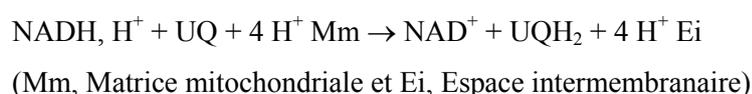
1.5.2 PRODUCTION DE ROS

In vivo, plusieurs systèmes biochimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue de ROS comme la production d'énergie, mais également des stress biotiques ou abiotiques, un déséquilibre rédox, la synthèse ou la perception d'hormones, le développement, la mort cellulaire. Lorsqu'un organisme n'est plus capable de maintenir un équilibre entre la production et la dégradation des ROS, ce dernier est dans un état dit de stress oxydant. L'implication des radicaux libres au cours des processus de vieillissement a été mise en évidence depuis 1956. Un excès de ROS peut entraîner des dommages importants dans tout organisme vivant et ceci en modifiant de multiples structures biologiques telles que les protéines, les lipides, les sucres ou l'ADN.

1.5.2.1 PRODUCTION MITOCHONDRIALE

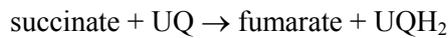
La mitochondrie est la source de production de l'énergie indispensable au fonctionnement cellulaire. C'est au niveau de la chaîne mitochondriale que s'effectue la réduction de l'oxygène en eau afin de produire l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme sous la forme de molécules d'adénosine triphosphate (ATP). Cependant ce système présente des "fuites", occasionnant une réduction incomplète du dioxygène et l'apparition de ROS. Il a été estimé que entre 1 et 3% de l'oxygène consommé était ainsi transformé en espèces radicalaires (Boveris & Chance, 1973; Boveris et al, 1972). Il existe deux sources principales de "fuites" et donc de production de ROS, il s'agit des complexes I et III (Fig.26) (Brookes, 2005).

Le complexe I est la première pompe à protons de la chaîne respiratoire. C'est une NADH-coenzyme Q oxydoréductase (EC 1.6.5.3), elle catalyse le transfert de 2 électrons du NADH au coenzyme Q (aussi nommé ubiquinone) via la flavine mononucléotide (FMN) et un ensemble de centres [Fe-S] entraînant ainsi sa réduction. Ce transfert d'électrons va également permettre la sortie de 4H^+ vers l'espace intermembranaire. Nous pouvons écrire une réaction globale sous la forme :

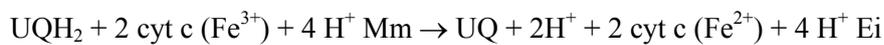


Le complexe II est une succinate - coenzyme Q oxydoréductase (EC 1.3.5.1). Le succinate va perdre deux électrons et sera ainsi transformé en fumarate. Les électrons seront transférés au

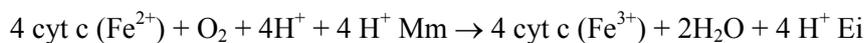
coenzyme Q via une flavine adénine dinucléotide (FAD). Ce n'est pas une pompe à protons, cependant elle va permettre de générer du coenzyme Q réduit via la réaction :



Le complexe III est une coenzyme Q déshydrogénase (EC 1.10.2.2). Le coenzyme Q va permettre le transport d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire, le cytochrome c qui relie le complexe III au complexe IV. Ce transfert d'électrons permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale (Mm) à l'espace inter-membranaire (Ei) et fait du complexe III la deuxième pompe à protons de la chaîne respiratoire via la réaction :



Le complexe IV est une cytochrome C oxydase (EC 1.9.3.1). Comme le complexe I et III c'est une pompe à protons, cependant il est généralement considéré qu'elle ne génère pas de production d'espèces réactives. Elle catalyse une réaction du type :



Le dernier complexe de la chaîne mitochondriale et le complexe V, c'est une ATP synthase (EC 3.6.3.14) qui est en charge de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique.



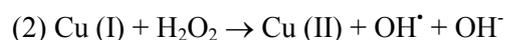
Il faut noter que le mécanisme de cette réaction est réversible si le gradient de protons est perturbé. Les différents complexes sont des cibles privilégiées d'inhibiteurs utilisés dans certains insecticides, des herbicides ou encore des fongicides.

1.5.2.2 AUTRES CAUSES DE PRODUCTION DE ROS

1.5.2.2.1 Production accidentelle

De nombreux autres phénomènes peuvent être à l'origine de la production de ROS. Ainsi chez l'Homme, des radicaux libres peuvent être produits au cours de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes du fait de l'activité cyclooxygénase et lipooxygénase (Stocker et al, 1991).

Certains métaux de transition comme le fer ou le cuivre peuvent être impliqués dans des réactions oxydatives en interagissant avec des molécules intracellulaires comme la vitamine C (équation 1) (Ionescu & Poljsak, 2010). Le cas de la vitamine C est d'autant plus intéressant que cette molécule qui est normalement impliquée dans la protection contre les molécules oxydantes peut dans ce cas devenir prooxydante au contact de ces métaux. Le cuivre I peut ensuite réagir avec du peroxyde d'hydrogène et ainsi produire un radical OH.



Chez les végétaux, la production de ROS est drastiquement stimulée si les plantes sont exposées à de fortes intensités lumineuses (Willekens et al, 1997) ou à la sécheresse (Dat et al, 2000). Chez l'Homme, il a été démontré que de nombreuses causes pouvaient être à l'origine de réactions oxydatives comme une malnutrition sévère, le fait de fumer ou une infection (Halliwell & Cross, 1994). Les dommages oxydatifs au niveau des mitochondries et l'altération des systèmes de défense antioxydants sont associés à de nombreuses maladies comme la maladie de Parkinson, d'Alzheimer ou encore dans la formation de cancers (Bankson et al, 1993).

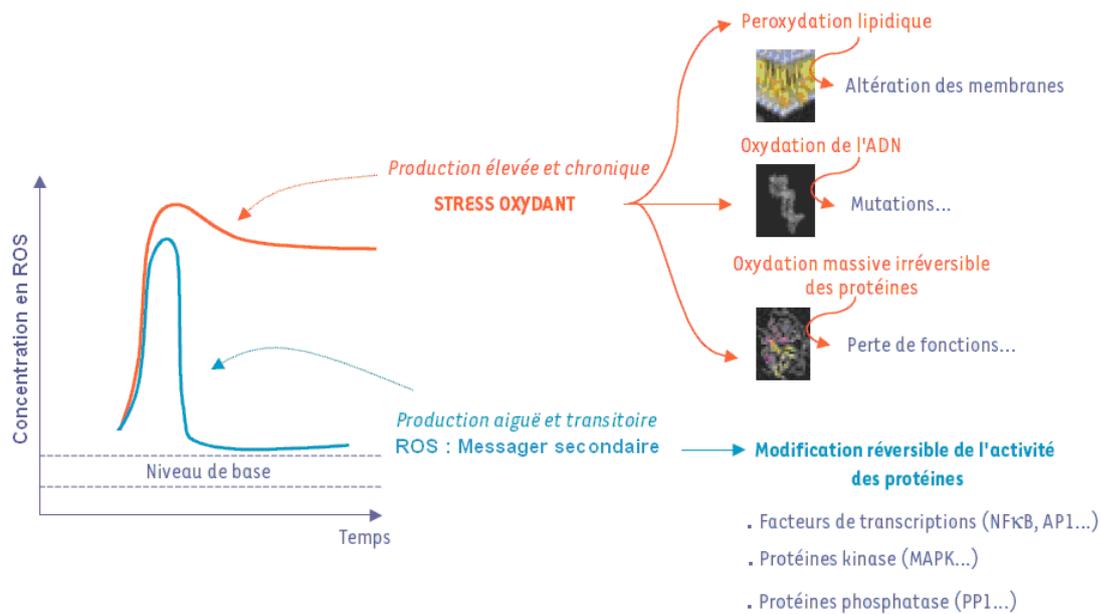
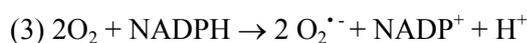


Figure 27 : Les ROS sont généralement présents à un niveau de base dans les cellules. Une production transitoire peut avoir lieu, cette dernière n'engendrera pas d'effets délétères et pourra jouer un rôle de messenger secondaire. Si la production est continue ou que les systèmes de régulation ne sont pas capables de contrebalancer cette production, il y a des risques d'engendrer des dégâts au niveau des composants cellulaires.

1.5.2.2.2 Production induite

La production de ROS peut aussi être induite par un agent pathogène. Ainsi chez l'Homme elle est caractérisée par l'activation de la NADPH oxydase (Babior, 2004) qui va permettre la réduction de l'oxygène en anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) (équation 3).

L'anion superoxyde est à l'origine d'autres formes réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et l'acide hypochloreux (HOCl) (Babior, 2004; Gougerot-Pocidallo et al, 2002). Ces composés pourront, à leur tour, réagir pour donner des ROS secondaires à l'exemple du peroxydinitrite (équation 4) (Beckman et al, 1990).



Les plantes peuvent également se protéger des organismes pathogènes en produisant des ROS (Glazebrook, 2005). Ces derniers jouent un rôle dans des processus de mort cellulaire programmé qui induira le développement d'une lésion nécrotique localisée autour du site d'infection du pathogène permettant ainsi à la plante d'isoler ce dernier. En réponse, les champignons pathogènes sécrètent des enzymes comme des superoxyde dismutases afin de s'en protéger (Hu et al, 2007).

1.5.3 EFFETS INDUITS PAR LES ROS

Quand les conditions physiologiques sont normales, les mécanismes antioxydants présents suffisent à maintenir la quantité de ROS à un niveau basal, les ROS ne provoquent alors pas d'effets irréversibles et sont généralement compensés par des mécanismes antioxydants de base (Fig.27). Si la quantité de ROS devient plus importante, que ce soit par une production endogène ou une source externe, le système peut se retrouver surchargé, ce qui entraînera des dommages sur les composants de la cellule. Les ROS pourront aussi bien oxyder les lipides que les protéines ou encore les acides nucléiques et en particulier l'ADN (Fig.27).

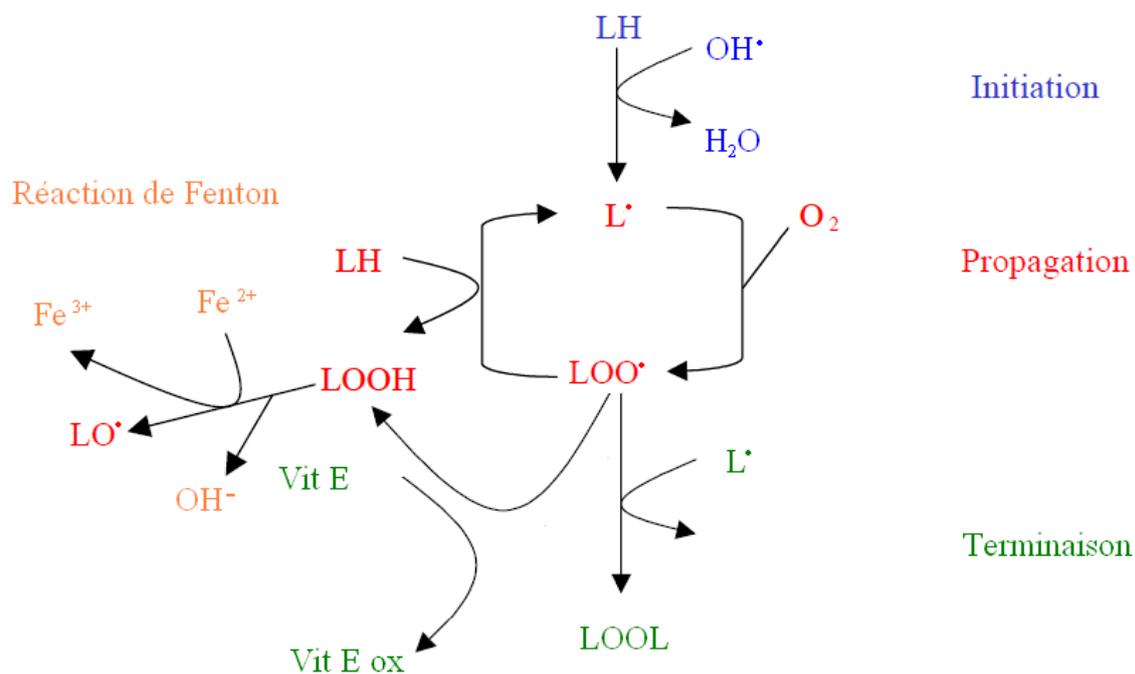
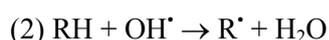
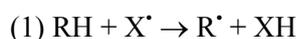


Figure 28 : Oxydation des lipides : une espèce radicalaire (ici $\text{OH}\cdot$) va initier l'attaque d'un lipide et engendrer la formation d'une espèce radicalaire ($\text{L}\cdot$) très réactive. Cette dernière pourra réagir avec de l'oxygène et propager le phénomène de peroxydation. La terminaison de la propagation pourra se faire grâce à des agents antioxydants comme la vitamine E ou en réagissant avec une autre espèce radicalaire. Des composés secondaires peuvent également se former par exemple en réagissant avec des métaux de transition (Waldeck & Stocker, 1996).

1.5.3.1 PEROXYDATION DES LIPIDES

Les ROS peuvent provoquer l'oxydation des acides gras et en particulier les acides gras polyinsaturés (Pamplona et al, 2000). Les mécanismes réactionnels de l'oxydation des lipides ont été décrits par Bolland et Gee en 1946 et sont généralement découpés en trois étapes (Fig.28).

Une étape d'initiation, dont les ROS peuvent être la cause, mais qui peut aussi être induite sous certaines conditions par la lumière, par des métaux de transition ou par l'activité de la lipoxigénase, va provoquer la formation d'espèces radicalaires en arrachant un atome d'hydrogène. Cette étape peut être initiée par de nombreux composés radicalaires mais pas par des composés comme le peroxyde d'hydrogène (Catalá, 2009). Nous pouvons résumer cette étape par l'équation 1, qui donne l'équation 2 dans le cas précis du radical hydroxyle :



Cette étape d'initiation va engendrer une étape de propagation, c'est-à-dire un processus autocatalytique qui va causer la peroxydation en chaîne des lipides. En réagissant avec de l'oxygène il y aura formation de radicaux libres peroxydes (équation 3) qui pourront à leur tour réagir avec d'autres molécules d'acides gras pour former des hydroperoxydes et de nouvelles espèces radicalaires (équation 4). Ces dernières pourront à leur tour réagir avec l'oxygène et ainsi propager le phénomène de peroxydation (Catalá, 2006).



La terminaison de l'oxydation peut se faire par une réaction entre deux produits radicalaires ce qui aura pour conséquence de donner un produit stable (équation 5,6 et 7) ou lorsque le radical sera stabilisé par un antioxydant comme la vitamine E.



Au cours du processus d'oxydation, d'autres formes pourront également être formées comme des époxydes, des aldéhydes ou encore des alcanes. Ainsi chez l'Homme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE) ont été étudiés comme indicateurs de la peroxydation lipidique (De Zwart et al, 1998; Marnett, 1999) et peuvent être détectés par des méthodes classiques de GC-MS (Spiteller & Spiteller, 2000). Ces molécules étant électrophiles, elles sont capables de se lier de manière covalente à d'autres molécules, comme les protéines et les acides nucléiques et ainsi les endommager (Farmer & Davoine, 2007; Ishii et al, 2006).

Les hydroperoxydes pourront également repasser sous forme radicalaire en réagissant par exemple avec des métaux de transition (Girotti, 1998). Ils devront donc être stabilisés, ce qui peut être réalisé par la glutathion peroxydase qui sera décrite dans le chapitre sur les systèmes de régulation rédox. Les modifications provoquées par la peroxydation des lipides membranaires vont modifier l'organisation des membranes, leur fluidité et leur perméabilité (Borchman et al, 1992; Hong et al, 2004; Mandal & Chatterjee, 1980). Une fois le processus de peroxydation initié, les acides gras pourront également attaquer d'autres composés comme des protéines membranaires.

1.5.3.2 OXYDATION DES PROTÉINES

Les protéines peuvent être directement oxydées par les ROS via un mécanisme comparable à celui impliqué dans la peroxydation des acides gras cependant elles peuvent également aussi être modifiées par des dérivés de l'oxydation des lipides comme le MDA (Ishii et al, 2006; Kim & Lee, 2008) ce qui entrainera la formation de protéines présentant des adduits (Khan et al, 2002). Il a été démontré que l'état d'oxydation des protéines peut être caractérisé par l'introduction de groupement carbonyle (Levine, 2002). Les dégâts occasionnés par les ROS peuvent aller de la modification par oxydation d'un seul acide aminé à des modifications plus importantes comme la rupture d'une chaîne protéique, un pontage entre deux acides aminés d'une protéine voire de protéines différentes et l'addition d'adduits comme le MDA, mais également de glucides.

Tous les acides aminés peuvent potentiellement être oxydés par le radical hydroxyle. Cependant, les acides aminés présentant des groupements plus réactifs sont des cibles privilégiés, ainsi les acides aminés aromatiques comme la tyrosine et l'histidine (Uchida & Kawakishi, 1993) ou la phénylalanine (Leeuwenburgh et al, 1997) peuvent être très facilement oxydés. Les composés soufrés comme la cystéine ou la méthionine sont également sensibles,

ainsi cette dernière peut être convertie en sulfoxyde de méthionine puis en sulfone de méthionine. Cette oxydation en sulfoxyde peut être rendue réversible par l'action d'une enzyme : la méthionine sulfoxyde réductase (MSRA) (Garrison, 1987; Levine et al, 2000). La modification des acides aminés pourra générer d'autres produits en fonction de l'espèce radicalaire de départ, ainsi un acide peroxonitrique pourra entraîner la nitration de la tyrosine (Tien et al, 1999).

Les ROS, en provoquant des modifications d'acides aminés, des pontages, des cassures de chaîne peptidique ou encore l'ajout d'adduits, peuvent engendrer des modifications structurales des protéines ce qui pourra engendrer une diminution voire une perte totale de la fonction des protéines, ces dernières pourront également devenir plus sensibles aux protéases entraînant un ralentissement du métabolisme cellulaire (Levine, 2002). Les modifications de l'état rédox qu'engendrent les ROS peuvent avoir d'autres conséquences sur les protéines. Ainsi, il est possible que chez les personnes diabétiques, la diminution des protéines hépatiques et un turnover important soient en partie dûs à une altération de l'activité des protéines chaperonnes, ces dernières pouvant être très sensibles au statut rédox.

La dualité entre les effets négatif et positif des ROS se retrouve aussi au niveau de l'oxydation qu'ils peuvent induire sur les protéines. Ainsi il a été démontré que les ROS et en particulier la carbonylation des protéines pouvaient jouer un rôle important dans la levée de dormance des graines de tournesol (Oracz et al, 2007).

1.5.3.3 DOMMAGES CAUSÉS AUX ACIDES NUCLÉIQUES.

Comme toutes autres molécules, les acides nucléiques peuvent également être soumis à des modifications engendrées par les ROS. Deux types d'acides nucléiques peuvent être présents dans une cellule vivante : l'acide ribonucléique (ARN) et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Il convient de séparer les dommages qui peuvent être occasionnés à l'ADN de ceux causés à l'ARN. Ce dernier n'étant pas le support de l'information génétique (excepté dans le cas de certains virus) une modification n'aura pas autant d'importance et de conséquences qu'une modification qui surviendrait sur l'ADN. En effet, le turnover et le temps de vie court des ARNs permettra leur destruction et leur remplacement assez rapidement. Il n'en est pas de même pour l'ADN, il faudra donc que ce dernier soit réparé au risque de transmettre une mutation lors de la division cellulaire ou d'engendrer la mort cellulaire si la mutation a pour conséquence l'inactivation fonctionnelle d'une protéine nécessaire au métabolisme cellulaire.

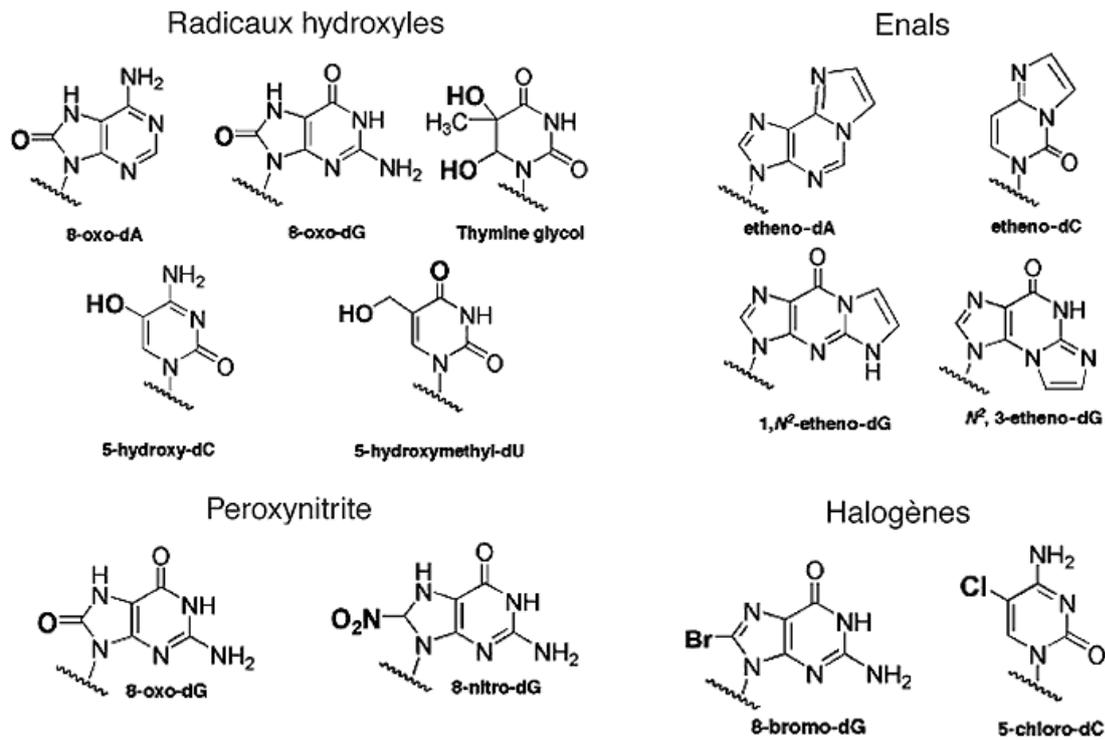


Figure 29 : Exemples de modifications de bases obtenues par l'action d'espèces réactives de l'oxygène (Chen et al, 2002).

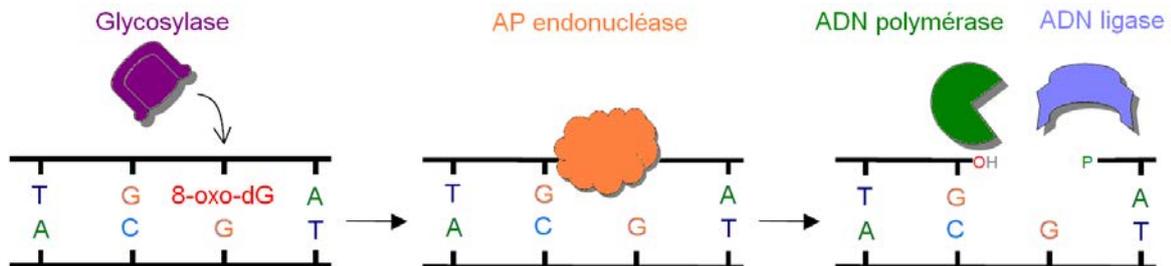


Figure 30 : Mécanisme d'excision-réparation : Le mauvais appariement sera reconnu et la base endommagée sera excisée par une glucosylase. Une endonucléase va ensuite cliver le site apurique créant une extrémité OH qui permettra à une ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire au brin restant. Une ADN ligase permettra enfin de refermer le brin d'ADN

Comme pour les lipides et les protéines il peut y avoir différentes modifications induites par les ROS. Ainsi l'oxydation des purines par le radical hydroxyle provoquera la formation de 8-oxo-déoxyguanosine (8-oxo-dG) ou de 8-oxo-déoxyadénosine (8-oxo-dA). Lors de la réplication de l'ADN la 8-oxo-dG pourra s'apparier avec une désoxyadénosine et sera donc remplacée par une désoxythymidine ce qui aura pour conséquence d'introduire une mutation.

D'autres composés pourront également être produits par oxydation comme la 8-5'-cyclo-déoxyguanosine. L'oxydation de l'ADN par de l'ion peroxy-nitrite pourra donner de la 8-nitro-déoxyguanosine et de la 8-oxo-dG, cette dernière pourra à son tour être la cible de l'ion peroxy-nitrite, entraînant ainsi une désamination (Burney et al, 1999).

Les espèces radicalaires pourront en outre réagir avec les groupements aminés et ainsi former des adduits qui pourront avoir un effet mutagène. Les composés formés lors de la peroxydation des lipides comme le MDA et le HNE sont capables de réagir avec l'ADN et de former ces adduits. Les produits engendrés par les ROS sont nombreux (Chen et al, 2002). Les principaux produits engendrés par l'attaque des ROS sont reportés sur la figure 29.

Les cellules contiennent cependant des systèmes de réparation qui pourront, via le système d'excision-réparation de base faisant intervenir des ADN glycosylases, éliminer la base (Hazra et al, 2001; Ikeda & Seki, 2001) et réparer le mauvais appariement (Fig.30). D'autres mécanismes peuvent aussi entrer en jeu comme le système d'excision-réparation de nucléotide qui permettra de réparer d'autres erreurs comme des dimères de thymines.

Les ROS sont impliqués dans diverses pathologies humaines et sont potentiellement une cause du vieillissement cellulaire. Malgré les effets secondaires néfastes qu'ils peuvent avoir, ces derniers sont toujours présents dans les cellules et participent à son fonctionnement. Ainsi il a été démontré qu'ils sont également capables de fonctionner comme des messagers secondaires et d'induire des voies de signalisation cellulaires rédox-sensibles comme les Map-kinases.

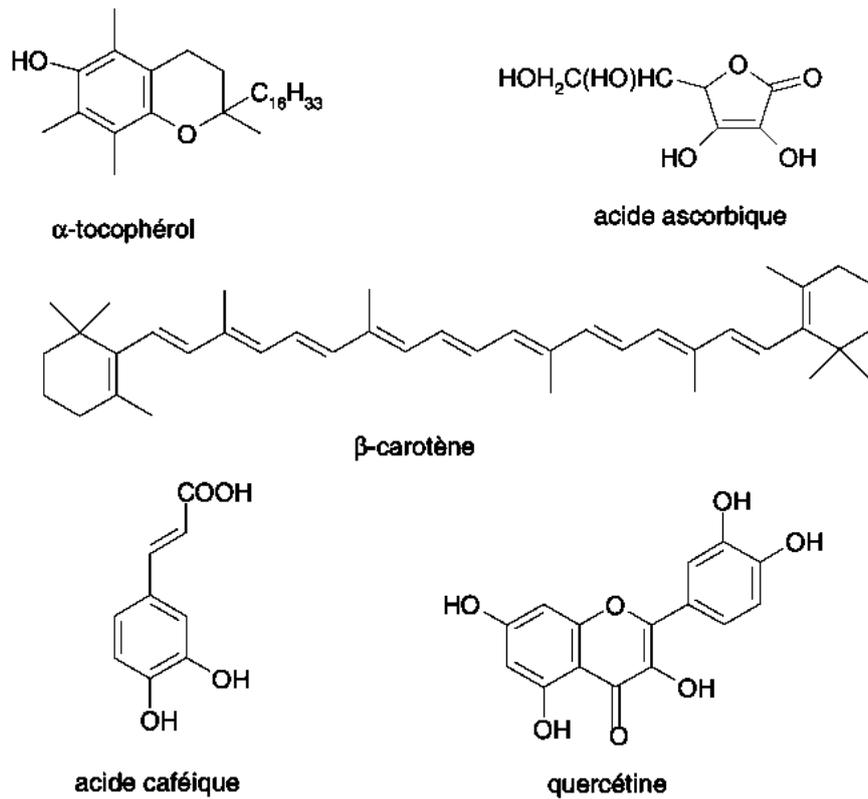


Figure 31 : Composés ayant des activités anti-oxydantes : α -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), β -carotène (famille des caroténoïdes), acide caféique et quercétine (famille des polyphénols).

1.5.4 SYSTÈMES DE RÉGULATION DU STATUT RÉDOX

L'organisme possède un certain nombre de moyens de défense contre les atteintes des radicaux libres qui peuvent mettre en jeu des enzymes comme les superoxyde dismutases, les catalases ou la glutathion peroxydase. Il existe également des systèmes non enzymatiques comme les vitamines E et C, les caroténoïdes, les polyphénols (Fig.31) ou le glutathion (Vouldoukis et al, 2004). Lorsque ce système est submergé, l'organisme est dans une situation de stress oxydant, ce qui engendrera l'oxydation des protéines, de l'ADN et des membranes cellulaires.

1.5.4.1 LE GLUTATHION

Le glutathion (γ -glutamylcystéinyglycine) est un tripeptide composé de cystéine, de glutamate et de glycine. Il représente la principale réserve en soufre des cellules. C'est un élément important dans le contrôle de l'état rédox d'une cellule, car il agit en tant que donneur d'électron. A ce titre, on le trouve en grande concentration dans les cellules, et plus particulièrement dans les hépatocytes où sa concentration peut atteindre 5 mM. Il joue non seulement un rôle central dans la protection contre les espèces oxygénées réactives, mais également contre les xénobiotiques. Chez l'Homme, un manque en glutathion est associé à diverses pathologies comme des déficiences hépatiques ou des anémies hémolytiques.

Dans une cellule, le glutathion existe sous deux formes à savoir une forme réduite (donneuse d'électron) et une forme oxydée. La forme réduite est normalement majoritaire dans une cellule qui n'est pas soumise à un stress oxydatif. L'équilibre entre les deux formes peut donc être utilisé comme un indicateur de l'état rédox d'une cellule. En effet, le glutathion joue un rôle important dans la régulation du statut thiol/disulfure des groupements sulfhydryles des protéines, qui peut conditionner la fonction des protéines. Dans des conditions physiologiques normales, il les maintient sous forme réduite. Dans des conditions de stress oxydant, il forme avec les groupements sulfhydryles des protéines des ponts disulfures réversibles, par une réaction de glutathionylation (Lind et al, 1998). La glutathionylation jouerait un rôle central dans l'initiation de la réponse au stress et la régulation des cycles cellulaires (Moriarty-Craige & Jones, 2004).

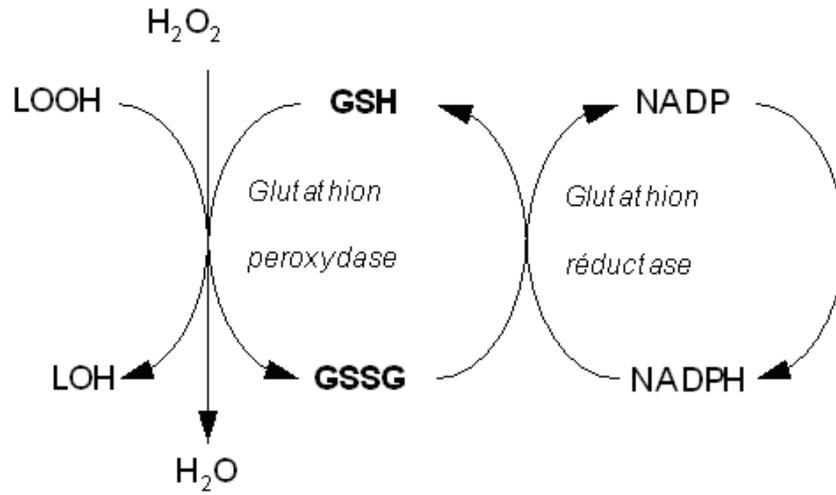


Figure 32 : Régénération du glutathion réduit par la glutathion réductase et utilisation du glutathion par la glutathion peroxydase.

La limitation en soufre, ainsi que l'exposition à de l'oxygène pur, inducteur d'espèces oxygénées réactives, induisent la production de lignine-peroxydases chez *P. chrysosporium*, ce qui suggère un rôle du glutathion dans la réponse au stress oxydatif.

1.5.4.2 LA GLUTATHION PEROXYDASE

La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9 et EC 1.11.1.12) est présente chez les Mammifères sous 5 isoformes qui se retrouvent dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Son rôle principal est d'éliminer le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Fig.32) selon la réaction :



Il a été démontré que certaines de ces enzymes pouvaient être régénérées à l'aide de glutathion, mais elles peuvent également être régénérées à l'aide de thiorédoxines (Tanaka et al, 2005). Elles jouent un rôle de régulateur. En effet, il a été démontré que GPx3, une glutathion peroxydase de *S. cerevisiae*, agissait en tant que messenger de l'état rédox de la cellule en interagissant avec YAP1, un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydatif (Delaunay et al, 2002).

1.5.4.3 LES GLUTATHION RÉDUCTASES

Les glutathion réductases (EC 1.8.1.7) permettent de régénérer le glutathion réduit (GSH) à partir de glutathion oxydé (GSSG). Cette réaction nécessite du pouvoir réducteur apporté par le NADPH (Fig.32). Chaque mole de GSSG nécessite une mole de NADPH afin de régénérer le GSH. La glutathion réductase est conservée dans tous les règnes du vivant. Il existe une exception notable, il s'agit de la Drosophile, qui ne possède pas de glutathion réductase. La réduction de glutathion pourrait s'y effectuer via des protéines comme les thiorédoxines (Kanzok et al, 2001) qui sont également impliquées dans le contrôle du statut rédox et qui seront décrites dans le paragraphe 1.5.4.5.

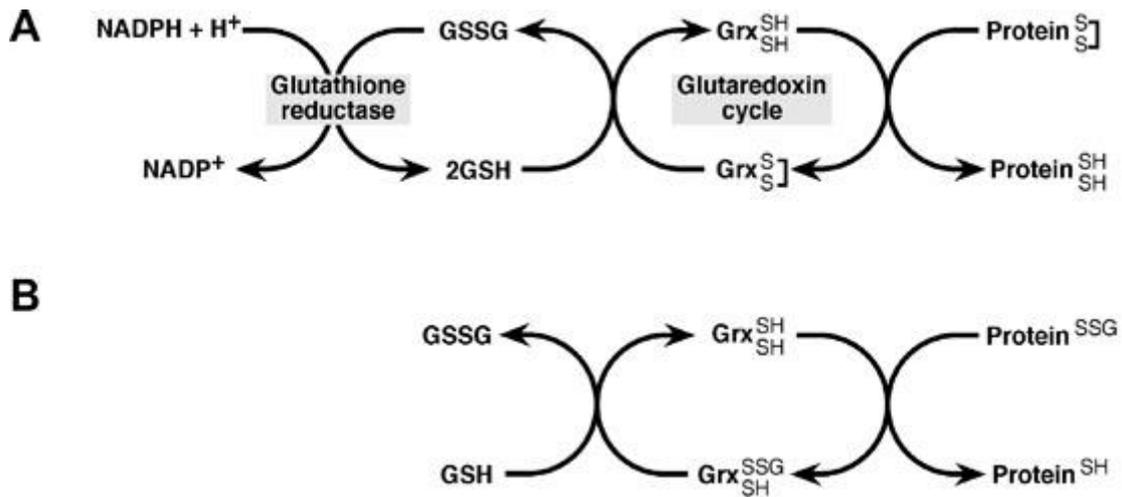


Figure 33 : Les glutarédoxines (Grx) catalysent la réduction des ponts disulfures dans les protéines en utilisant le glutathion (GSH) qui est transformé en glutathion disulfure (GSSG) (A). Le GSH est régénéré par la glutathion réductase NADPH-dépendante. Les Grx sont également capables de déglutathionyer des thiols et peuvent ainsi modifier l'activité ou la localisation de certaines enzymes (B).

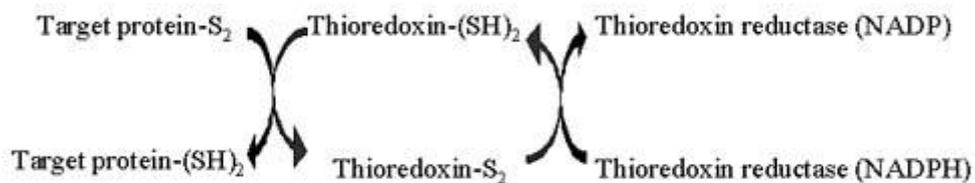


Figure 34 : Réduction de ponts disulfures par la Trx, cette dernière est recyclée par la TR qui est une protéine NADPH dépendante.

1.5.4.4 LES GLUTARÉDOXINES

Il s'agit d'une autre famille de protéines en relation avec le glutathion. Elles permettent aux cellules de lutter contre les espèces oxygénées réactives mais sont aussi impliquées dans des phénomènes de détoxification (Collinson & Grant, 2003). Les glutarédoxines se répartissent en deux grandes familles, selon la composition de leur centre rédox actif : les glutarédoxines à dithiol (possédant un site actif de type CysXXCys) et les glutarédoxines à monothiol (avec un site actif de type CysXXSer). Elles sont capables de réduire des ponts disulfures dans les protéines en utilisant le glutathion (Fig.33, A), et de manière très efficace, vont pouvoir déglutathionyler des groupements thiols des protéines (Fig.33, B). Dans cette réaction, seule une cystéine est nécessaire, ce qui met en évidence le rôle essentiel de cette dernière. Quatre glutarédoxines sont présentes chez *P. chrysosporium*.

1.5.4.5 LES THIORÉDOXINES ET LA THIORÉDOXINE RÉDUCTASE

Les thiorédoxines (Trx) (EC 1.8.4.10) sont des enzymes à groupement thiol capables d'ouvrir différents ponts disulfures en convertissant ses cystéines de la forme (SH)₂ à la forme S-S. Elles sont donc au centre des systèmes de réduction des espèces oxygénées réactives (Gelhaye et al, 2004; Gelhaye et al, 2005) mais également dans la régulation de l'activité de certains facteurs de transcription comme AP-1 et NF-B ou encore dans l'apoptose en inhibant l'activité d'ASK1 (Apoptosis Signal-regulated Kinase-1). Une fois oxydée, la Trx sera à nouveau réduite par la thiorédoxine réductase (TR) (EC 1.6.4.5). Cette dernière permet la régénération du système thiorédoxine à partir de NADPH. L'analyse du génome de *P. chrysosporium* permet de mettre en évidence la présence de 4 gènes codants potentiellement pour des Trxs (Fig.34).

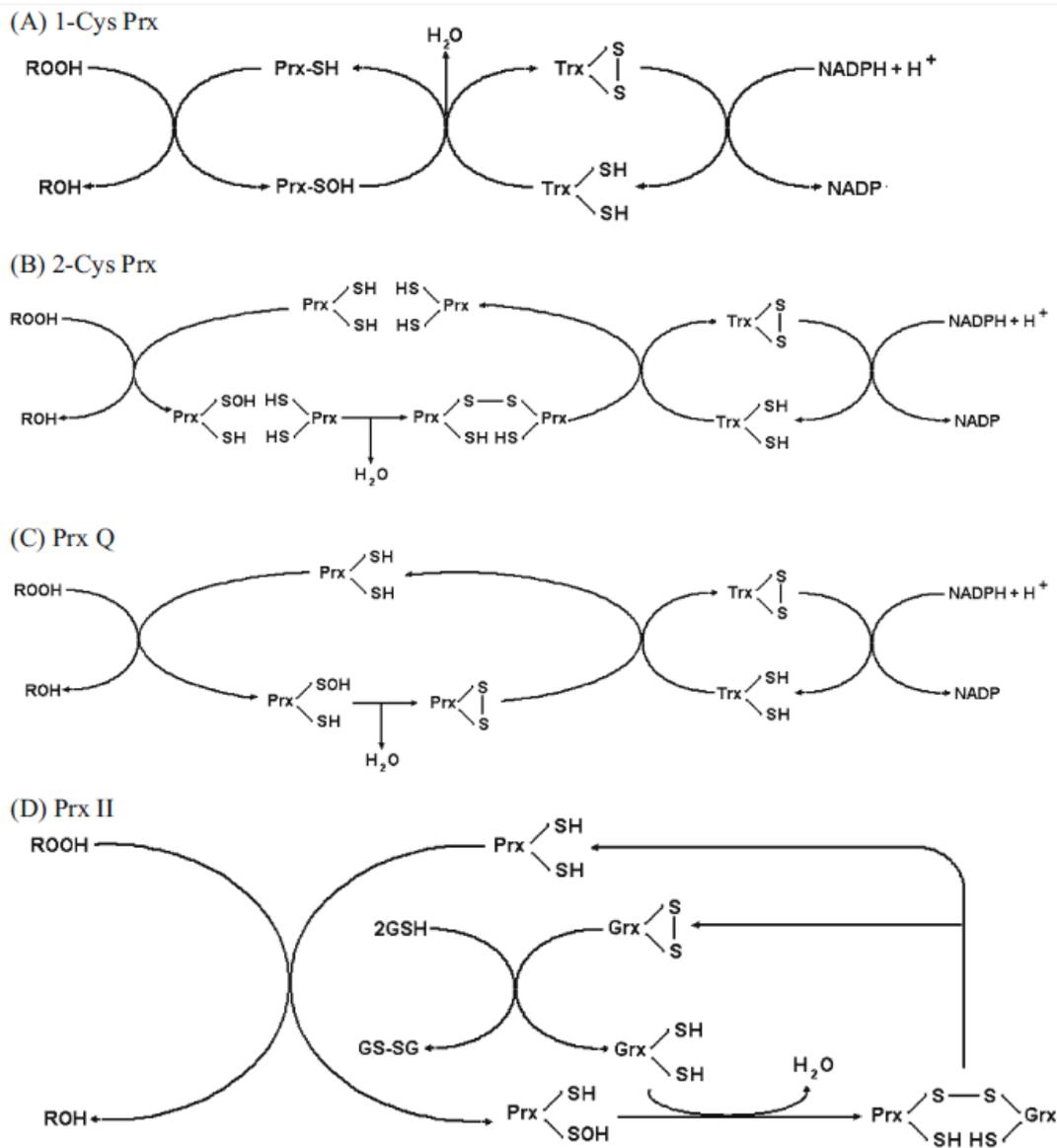
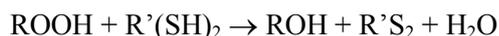


Figure 35 : Mécanismes de détoxication des peroxydes par les peroxirédoxines (Prx) et régénération des formes fonctionnelles de quatre différents types de peroxyrédoxines par la thiorédoxine (Trx) ou la glutarédoxine (Grx): une Prx 1-Cys (A), une Prx 2-Cys (B), C et D : deux formes de Prx 2-Cys atypiques, la Prx Q et la Prx de type II (Tripathi et al, 2009).

1.5.4.6 LES PEROXYRÉDOXINES

Les peroxirédoxines (Prx) sont une superfamille de protéines de type peroxydase thiols-dépendantes impliquées dans la réduction de peroxydes et de peroxinitrites (Pedrajas et al, 2000). Malgré leurs différents mécanismes elles catalysent toutes une réaction du type (Fig.35) (Rouhier & Jacquot, 2002):

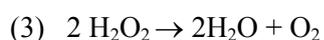
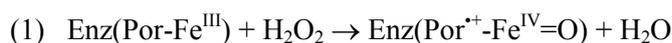


Le centre catalytique des peroxyrédoxines est un résidu cystéinyl qui va réagir avec les peroxydes et s'oxyder en acide sulfénique. Plusieurs protéines, telles que la thiorédoxine et la glutarédoxine, vont permettre de régénérer la forme réduite de la protéine. En plus de leur rôle dans les mécanismes de défense antioxydants, elles permettent également de moduler la signalisation redox.

Elles sont divisées en 3 sous-classes majeures : les Prxs à 1 cystéine, les Prxs à 2 cystéines typiques, les Prxs à 2 cystéines atypiques. Les Prxs à 2 cystéines typiques se retrouvent sous la forme de dimères tandis que les Prxs à 2 cystéines atypiques restent sous une forme monomérique. L'analyse du génome de *P. chrysosporium* permet de mettre en évidence la présence de 7 gènes codants potentiellement pour des Prxs.

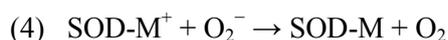
1.5.4.7 LES CATALASES

La catalase (EC 1.11.1.6) est une enzyme permettant de détoxifier le peroxyde d'hydrogène. Elle réagira avec le H_2O_2 selon la réaction 1, formant ainsi une molécule d'eau et un groupement Fe(IV)=O . Cet intermédiaire va à nouveau réagir avec H_2O_2 et libérer une molécule d'eau et une molécule de dioxygène (2) revenant ainsi à son état initial. La somme de ces deux réactions peut être résumée par l'équation 3.



1.5.4.8 LES SUPEROXYDE DISMUTASES

Les Superoxyde-dismutases (SOD) (EC1.15.1.1) catalysent la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ en une forme plus stable et non radicalaire à savoir en H_2O_2 . Comme pour la catalase la réaction se fait en deux étapes (4 et 5) qui peuvent être résumées par l'équation 6.



Elles existent sous plusieurs formes que l'on peut différencier par leur cofacteur métallique et par leur localisation : ainsi chez la levure il existe une Cu/Zn-SOD (SOD1 à cuivre et zinc) cytosolique, et une Mn-SOD (SOD2 à manganèse) strictement mitochondriale. Ces deux types de SOD se retrouvent dans de nombreux organismes, mais de petites différences peuvent être constatées. Ainsi chez l'Homme, il existe une troisième SOD Cu/Zn extracellulaire. Chez *C. albicans* il a été constaté qu'il existe une Mn-SOD cytosolique. Les SOD sont présentes dans tous les organismes aérobies à une exception notable, il s'agit de *Lactobacillus plantarum* qui utilise un mécanisme différent lié à une concentration intracellulaire élevée en manganèse (Archibald & Fridovich, 1982a; Archibald & Fridovich, 1982b).

Chez *P. chrysosporium*, il a été démontré qu'une carence en manganèse permet de stimuler la sécrétion de LiPs ; Cette sécrétion a été reliée à une inactivation de la Mn-SOD (Rothschild et al, 1999). Le contrôle de l'apport en manganèse dans les bioréacteurs est donc un élément clé de la production de LiPs, certainement via l'inactivation de la Mn-SOD.

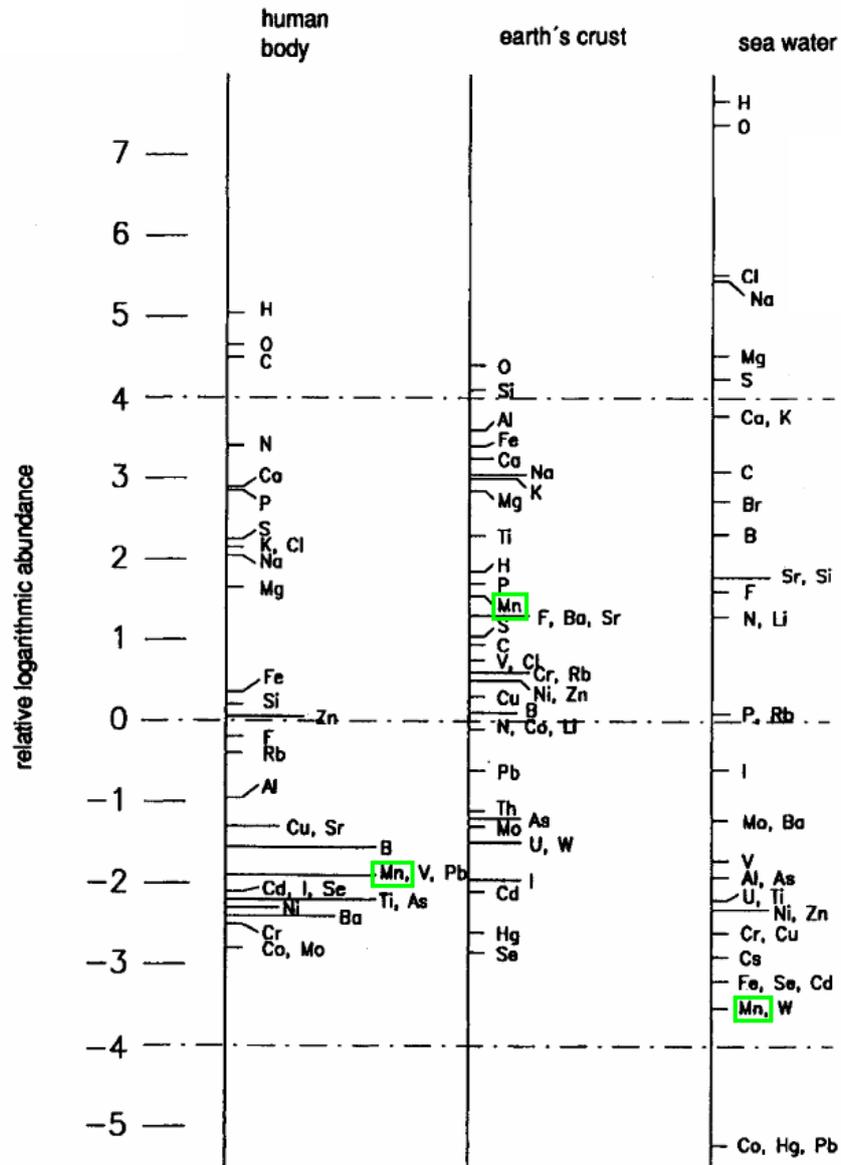


Figure 36 : Abondance relative de différents éléments et en particulier du manganèse (encadré vert) dans le corps humain, la croûte terrestre et les océans. Source : symposium Metal Ions in Biology and Medicine (Sadlik, 2002).

1.6 LE MANGANÈSE

Le manganèse est un élément classé dans la série chimique des métaux de transition selon la classification de Mendeleïev. De symbole Mn et de numéro atomique 25, sa masse atomique relative est proche de 55. Son électronégativité le conduit à former des liaisons ioniques avec des oxydes, des hydroxydes et des carbonates. Son nom proviendrait de Magnesia, une partie de la province grecque de Thessalie. Le manganèse est connu depuis la préhistoire, le dioxyde de manganèse était utilisé en tant que pigment noir. Il a également été utilisé dans la coloration du verre.

Avec une concentration moyenne d'environ 800 ppm dans l'écorce terrestre continentale, le manganèse est un des éléments les plus abondants sur Terre (Wedepohl, 2008). Cependant sa concentration dans le monde du vivant, comme chez l'Homme, est plus faible (Fig.36). Les principaux minerais de manganèse sont la pyrolusite (MnO_2) et la rhodochrosite ($MnCO_3$). Il est également présent à l'état de traces dans les eaux naturelles, à raison d'environ 0,01 ppb dans les océans et de 4 ppb dans les rivières.

Le manganèse entre dans la composition de nombreux alliages dont il accroît l'élasticité, la dureté ainsi que la résistance à l'usure. Les mines utilisées par les Spartiates contenaient vraisemblablement un mélange de fer et de manganèse, ce qui expliquerait l'exceptionnelle dureté de l'acier sparte à l'origine du rayonnement de cette cité vers 500 avant Jésus-Christ. De nos jours, une grande partie (90%) de la production de manganèse est utilisée dans la fabrication de l'acier, le reste entrant dans la composition des piles et de nombreux autres composants électroniques. On le retrouve également dans l'agriculture, en tant qu'engrais, sous la forme de sulfate de manganèse par exemple.

1.6.1 LE MANGANÈSE : UN ÉLÉMENT ESSENTIEL

Le corps d'un homme adulte contient entre 10 et 20 mg de manganèse, ce dernier est nécessaire à une grande variété de fonctions cellulaires. Parmi elles nous pouvons citer celles impliquées dans la formation squelettique, le manganèse étant nécessaire à la croissance et au développement normal des os et du cartilage (Hurley, 1981). Il joue également un rôle dans le métabolisme énergétique. Ainsi, il est nécessaire à des enzymes telles que la pyruvate-carboxylase, la phosphoenolpyruvate carboxykinase ou encore l'isocitrate déshydrogénase. C'est un élément essentiel au fonctionnement de la Mn-SOD qui, comme nous l'avons vu précédemment, est impliquée dans la protection contre les ROS au niveau de la mitochondrie (Culotta et al, 2006). Le manganèse est par ailleurs nécessaire au fonctionnement de l'arginase, une enzyme impliquée dans le cycle de l'urée.

Aucun symptôme bien caractérisé de déficience en manganèse n'a été mis en évidence chez l'Homme, l'alimentation permettant normalement un apport suffisant. Chez les animaux il a été démontré qu'un manque de manganèse est à l'origine de déformation du squelette, d'ataxie et de problème de reproduction (Suttle, 2010). Il n'existe pas d'apport journalier recommandé en manganèse, il semblerait que 0,75 mg soit suffisant, cependant, des apports compris entre 2 et 5 mg par jour sont recommandés par l'US National Research Council (Monsen, 1989). L'homéostasie du manganèse semble principalement assurée par l'excrétion biliaire. Plusieurs maladies ont été caractérisées par de faibles concentrations de Mn sanguin, tels l'épilepsie ou le syndrome de Down, cependant le lien de cause à effet n'a pas été démontré. Il n'existe pas de bons marqueurs d'une carence en manganèse car certaines enzymes fonctionnant avec du manganèse peuvent également utiliser du magnésium par exemple. Des études ont été menées pour corrélérer l'activité de la Mn-SOD et le statut en manganèse, Davis et Greger ont ainsi administré 15 mg de manganèse en complément de l'alimentation quotidienne à des femmes pendant 90 jours et ont mis en évidence une augmentation de l'activité superoxyde dismutase dans les lymphocytes (Davis & Greger, 1992). Cependant, l'activité de la SOD peut être modulée par d'autres facteurs tels que la prise d'alcool ou d'aliments riches en acides gras.

Des études sur des animaux de laboratoire ont mis en en lumière un retard de croissance et de reproduction en condition de carence. Le manganèse semble également nécessaire au cours de la gestation. Des malformations ont ainsi été mises en corrélation avec une carence en manganèse, notamment chez les bovins (de Carvalho, Pita et al 2010). Des effets significatifs sur la production d'acide hyaluronique, d'héparine, et d'autres formes de mucopolysaccharides qui sont

Tableau 2 : Compilation des besoins et limites de toxicité pour différents éléments : Différentes espèces de plantes ont été utilisées et ont permis de déterminer des concentrations foliaires (en milligramme par gramme de matière sèche) minimales et maximales en dehors desquelles la croissance des plantes est compromise (perte de 10% de la croissance optimale) (White & Brown, 2010).

	Quantité requise (mg/g MS)	Concentration toxique (mg/g MS)
Azote (N)	15 – 40	-
Potassium (K)	5 – 40	> 50
Phosphore (P)	2 – 5	> 10
Calcium (Ca)	0.5 – 10	> 100
Magnesium (Mg)	1.5 – 3.5	> 15
Soufre (S)	1.0 – 5	-
Chlore (Cl)	0.1 – 6	4 – 7
Bore (B)	5 – 100 10^{-3}	4 – 7
Fer (Fe)	50 – 150 10^{-3}	0.1 – 1
Manganese (Mn)	10 – 20 10^{-3}	> 0.5
Cuivre (Cu)	1 – 5 10^{-3}	0.2 – 30 10^{-3}
Zinc (Zn)	15 – 30 10^{-3}	100 – 300 10^{-3}
Nickel (Ni)	0.1 10^{-3}	20 – 30 10^{-3}
Molybdène (Mo)	0.1 – 1 10^{-3}	1

importants pour la croissance et l'entretien du tissu conjonctif et du cartilage ont également été rapportés. On reporte également des altérations du métabolisme du glucose et des lipides.

Le manganèse est également utilisé par les microorganismes. Ainsi chez *Borrelia burgdorferi*, qui est le principal agent de la maladie de Lyme, il a été démontré que de nombreuses protéines nécessitant du fer comme cofacteur étaient absentes ou modifiées car ce dernier est limitant lors de l'infection. Ainsi, des enzymes comme la catalase, la citrate synthase ou encore les cytochromes semblent absentes. Dans cet organisme, une SOD cytosolique est présente, cependant, contrairement à la règle générale qui voudrait que cette dernière soit fer-dépendante, elle présente une forte similarité avec celles de *Thermus thermophilus*, *Thermus aquaticus* et *Bordetella pertussis* qui sont manganèse-dépendantes ainsi qu'avec la SOD de *Porphyromonas gingivalis* qui peut fonctionner avec du fer ou du manganèse (Posey & Gherardini, 2000). Il a également été démontré que le manganèse était nécessaire dans la formation de spores et leur germination. Certains organismes comme *L. plantarum* ne possèdent pas de SOD, cependant, cet organisme arrive à se développer en milieu aérobie, en accumulant jusqu'à 30mM de manganèse dans ses cellules. Le potentiel redox du couple Mn^{2+}/Mn^{3+} est diminué quand le manganèse est complexé à des anions comme le lactate ou le succinate, facilitant ainsi les réactions avec l'oxygène radicalaire et le peroxyde d'hydrogène (Archibald & Fridovich, 1982b; Horsburgh et al, 2002; Stadtman et al, 1990).

Le rôle du manganèse dans la nutrition des plantes a également été démontré, ainsi en plus de l'oxygène du carbone et de l'eau, 14 éléments minéraux ont été mis en évidence comme étant indispensables. Parmi ces nutriments certains sont nécessaires en grande quantité : l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et le soufre. Ces éléments sont généralement définis comme étant des macro-éléments. D'autres éléments sont eux aussi nécessaires mais en plus petite quantité, on parle alors de micro-éléments ou d'éléments traces. Le manganèse fait partie des micro-éléments, le tableau 2 récapitule les quantités nécessaires à la croissance des plantes.

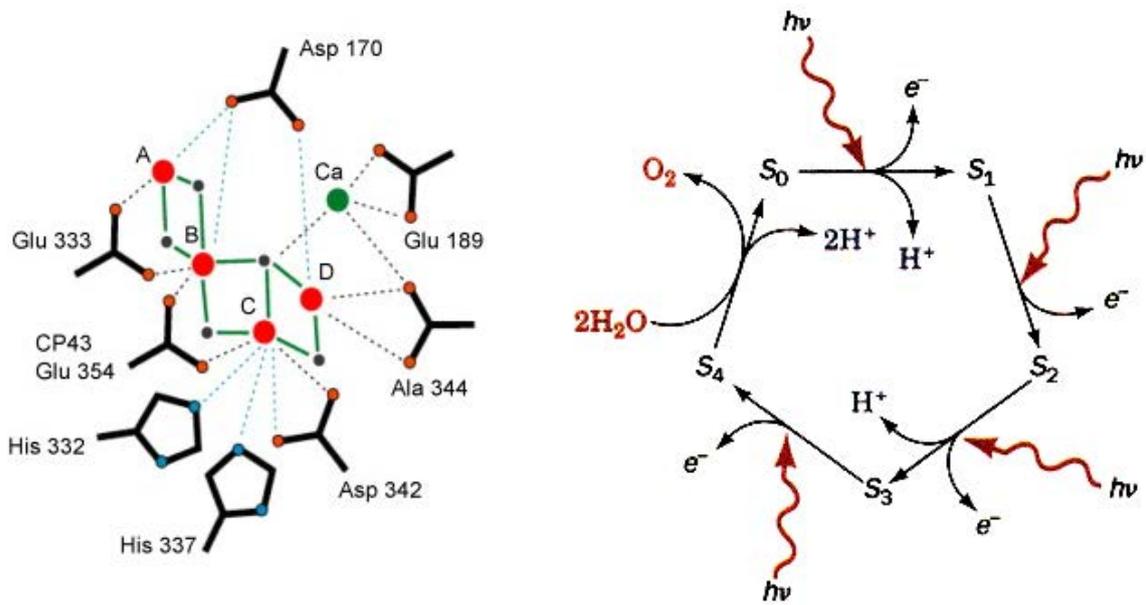
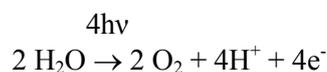


Figure 37 : A) Proposition de structure du manganèse dans l'OEC (Yano). B) modèle de KoK de l'oxydation de l'eau permettant de libérer séquentiellement quatre électrons par absorption de quatre photons (Manchanda et al, 1995).



Figure 38 : Marbrure typique provoquée par une carence en manganèse sur une feuille de vigne.

Une utilisation particulière du manganèse dans les plantes est son utilisation au niveau du photosystème 2. Ainsi, dans le complexe d'oxydation de l'eau ou OEC (pour "Oxygen Evolving Complex"), 4 atomes de manganèse, associés généralement à un atome de calcium, permettent la réduction de l'eau en oxygène (Fig.37) selon la réaction :



La carence en manganèse a donc comme conséquence de bloquer les mécanismes photosynthétiques. Cette restriction a été rapportée pour de nombreux organismes (Gong et al, 2010). La carence en manganèse est fortement documentée dans le cadre de la culture de la vigne où elle engendre le jaunissement du limbe (Fig.38), en particulier dans les parties éloignées des nervures, le manganèse étant un élément peu mobile. Un jaunissement des jeunes feuilles peut également apparaître, voire une chlorose complète du plant dans les cas les plus graves. Au niveau agronomique une carence peut provoquer la formation de grappes plus petites et de moindre qualité.

Les effets de la carence en manganèse ont été observés depuis longtemps. Ainsi Albert, W. B. a constaté en 1931 à Florence (Calorine du Sud) que des cultures d'avoine et de niébé présentant une couleur jaune vive était carencée en manganèse, l'apport de ce dernier permettant de restaurer une croissance normale. De nombreuses études concernant des carences en manganèse et portant sur l'avoine, la fougère ou encore des graminées ont été publiées dans *Nature* dans les années 1940 (Hunter, 1942; Nicholas, 1946; Piper, 1944; Twyman, 1943; Walsh, 1945). Il a ensuite été noté qu'une carence en manganèse induisait des dysfonctionnements au niveau des chloroplastes (Mercer et al, 1962; Spencer & Possingham, 1961).

Un sol carencé en manganèse est généralement défini par une concentration inférieure à 5 mg de Mn extractible à l'EDTA par kg de terre. Cependant, un sol acide ou une compétition entre le manganèse et le fer peuvent le rendre moins biodisponible. C'est pourquoi, une autre solution est de faire une analyse pétiolaire ; dans ce cas la concentration ne doit pas être inférieure à 20 mg/kg de matière sèche. Une modification de l'acidité du sol par la pratique du chaulage peut également provoquer une carence en manganèse. En effet, le pH influence directement la disponibilité des différents minéraux dans le sol (Fig.39). Les plantes utilisent cette propriété et sont capables de relarguer des ions H^+ et des acides organiques lorsqu'elles sont en carence (Rengel & Marschner, 2005). Une étude portant sur *Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en évidence que la formation des racines était modifiée par une carence en manganèse et qu'elle induisait une augmentation du chevelu racinaire (Wei Yang et al, 2008). En cas de carence

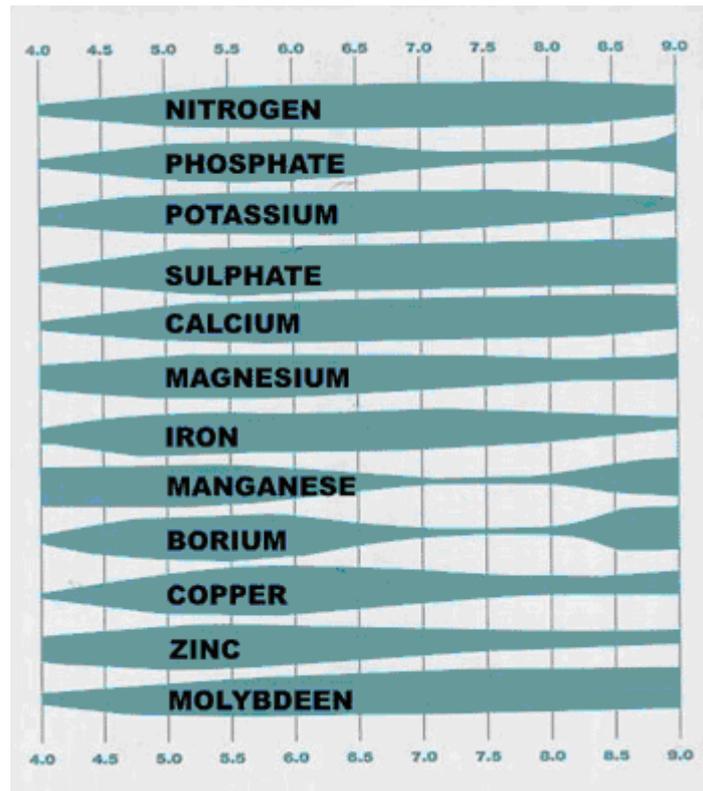


Figure 39: Influence du pH sur la disponibilité de différents éléments pour la nutrition des plantes (Truog, 1946).

la vigne est traitée avec du sulfate de manganèse. L'influence de la pulvérisation de manganèse sur le rendement a également été démontrée chez d'autres plantes comme le coton qui, en particulier s'il est cultivé sur sol calcaire, voit sa production augmentée après traitement. De plus, il a été noté que le traitement augmentait le pourcentage de germination des graines ainsi formées (Dordas, 2009). Il est intéressant de noter que certains antifongiques, comme le mancozèbe, contiennent du manganèse et que des carences ont été observées après diminution de l'utilisation de ces derniers.

1.6.2 LE MANGANÈSE : UN ÉLÉMENT TOXIQUE

A l'inverse du plomb, du cadmium et du mercure qui ont des effets toxiques à toute concentration, le manganèse est nécessaire à l'organisme et ne devient toxique que lorsqu'il est présent en trop grande quantité.

Chez l'Homme il existe une forme aiguë d'intoxication par le manganèse. Cette dernière provient le plus souvent de l'inhalation de fumées ou de poussières contenant des particules de manganèse. Elle se traduit par un syndrome pseudo-grippal qui survient quelques heures après l'exposition. Il existe différentes sources de manganèse dans l'air ainsi, outre des intoxications dues aux particules produites dans l'industrie sidérurgique, on recense des intoxications chez des soudeurs. L'EDTA- Na_2Ca peut être utilisé dans le traitement des intoxications par le manganèse, mais également d'autres métaux, pour lesquels il a une plus grande affinité.

Des intoxications chroniques, provenant essentiellement de l'inhalation pendant plusieurs années de poussières contenant du manganèse, ont été décrites. L'exposition entraîne un syndrome neuropsychiatrique désigné sous le terme de manganisme. Les symptômes présentent de nombreuses ressemblances avec ceux de la maladie de Parkinson. Ainsi le manganisme est caractérisé par des troubles de la mémoire, des hallucinations, des tremblements, des dysfonctionnements de l'écriture et de la prononciation, des troubles de la marche et de l'orientation voire une perte de l'équilibre. Plusieurs études ont mis en évidence qu'une consommation d'eau chargée en manganèse pouvait provoquer des symptômes neurologiques (Kondakis et al, 1989). Il s'agit ici d'intoxication due à des concentrations assez fortes en manganèse dans l'eau, l'absorption gastro-intestinale du manganèse n'étant que d'environ 5% du manganèse ingéré (Finley et al, 1994). L'absorption est influencée par certains facteurs comme le fer et une absorption plus élevée a été observée chez les femmes (Finley et al, 1994) et mise en

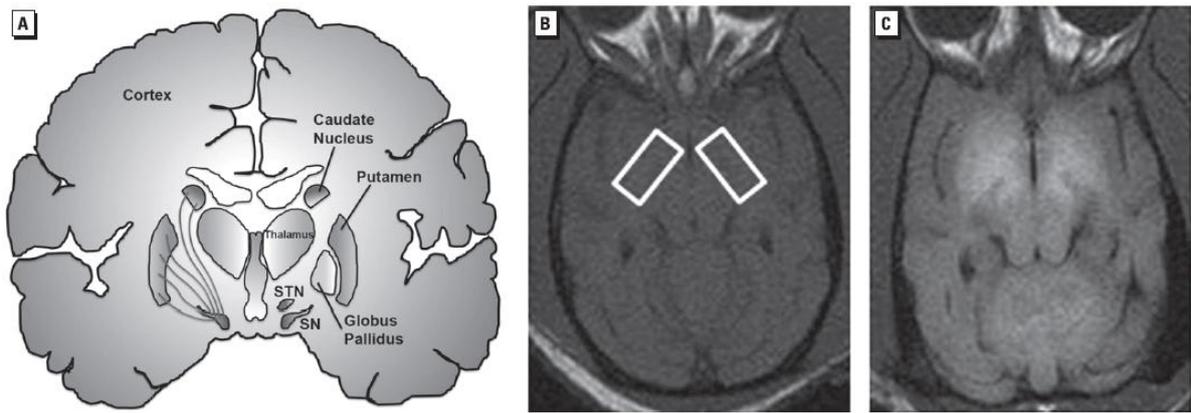


Figure 40 : A : Structure schématique du cerveau et en particulier des glandes basales. B et C : Mise en évidence en IRM d'une intensité plus élevée du signal dans le Globus Pallidus dans le cerveau de primates exposé (C) ou non (B) au manganèse, ceci est dû aux propriétés paramagnétiques du manganèse (Guilarte).

relation avec une concentration plus basse en ferritine (Finley, 1999) et en fer sérique (Baldwin et al, 1999). Une nouvelle drogue, l'éphédronne (methcathinone), retrouvée essentiellement en Europe de l'Est et en Russie, provoque une forme atypique de parkinsonisme résultant de l'utilisation de permanganate de potassium pour sa préparation (de Bie et al, 2007; Sanotsky et al, 2007). Elle est également vendue aux Etats-Unis, cependant, elle y est préparée en utilisant de l'acide chromique et n'engendre pas les problèmes rencontrés en Eurasie (Selikhova et al, 2008; Stepens et al, 2008).

Le manganèse semble induire des problèmes neurologiques en agissant sur les neurones dopaminergiques. Ceci a été confirmé par des expériences menées sur des rats, une corrélation a été mise en évidence entre l'administration de manganèse et une diminution de la dopamine et de l'acide γ -aminobutyrique (Brouillet et al, 1993). L'état rédox semble jouer un rôle important dans les dommages occasionnés par le manganèse, ainsi, il a été démontré que des doses faibles sous sa forme trivalente entraîne une production de ROS bien plus importante que sous sa forme divalente (Ali et al, 1995). Des images en IRM ont révélés que le manganèse s'accumule dans certaines zones du cerveau, en particulier dans le Globus Pallidus (Fig.40). Cette accumulation de manganèse dans le cerveau avait déjà été observée chez des macaques et avait permis de mettre en lumière une accumulation plus importante du manganèse dans le cerveau par rapport aux autres tissus, mais surtout un temps de rétention plus important (Dastur et al, 1971).

De nombreuses recherches portent actuellement sur la barrière hémato-encéphalique afin de comprendre les mécanismes d'entrée du manganèse dans le cerveau impliquant : des transporteurs de manganèse, qui peuvent également transporter le magnésium ou le fer, ou la transferrine (Aschner & Gannon, 1994; Crossgrove et al, 2003; Murphy et al, 1991). A l'inverse de l'influx, peu de donnée sont disponibles concernant l'efflux du manganèse et il semblerait qu'il se fasse plutôt par un mécanisme de diffusion (Yokel et al, 2003).

De nombreuses études portent également sur les conséquences d'une exposition des enfants au manganèse. Ainsi une étude au Canada a permis de mettre en évidence une corrélation entre une hyperactivité chez des enfants et une exposition au manganèse (Bouchard et al, 2007). De plus, différentes études ont faits ressortir une diminution des facultés intellectuelles liées à une intoxication chronique au manganèse (Brown & Foos, 2009; Wasserman et al, 2006; Woolf et al, 2002). Toujours au Canada, il en a été conclu que l'exposition d'enfants au manganèse pouvait provoquer une perte de 6 points de QI par rapport à des sujets non exposés (Bouchard et al, 2011). Les enfants seraient particulièrement sensibles au manganèse car ils l'absorberaient de manière plus efficace et le métaboliseraient de manière différente. Une étude au Bangladesh

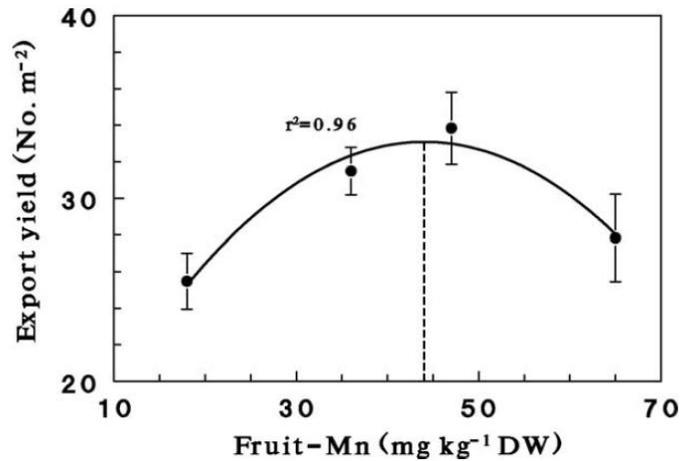


Figure 41 : Effet de la concentration en manganèse sur la production de poivrons par m² (Silber et al, 2009).

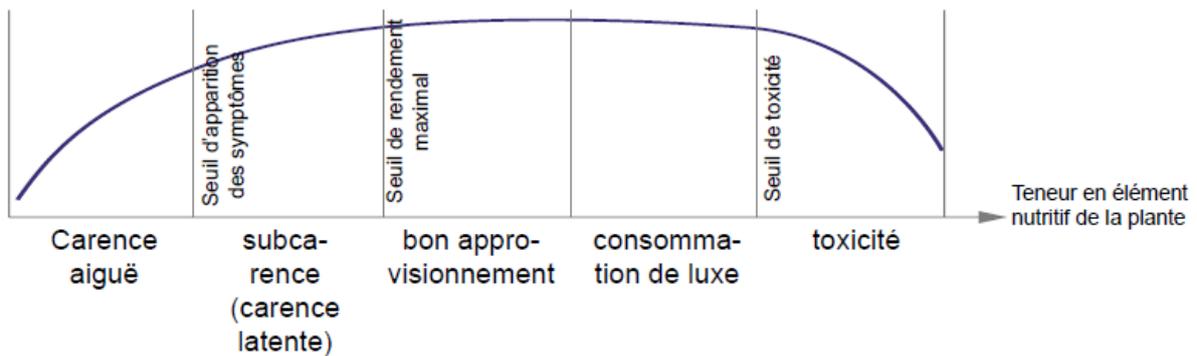


Figure 42 : Effet d'une carence ou d'une exposition trop importante sur la production végétale. La carence aiguë provoque des symptômes de carence visibles ou des mauvais rendements alors qu'une subcarence n'a pas obligatoirement de symptômes de carence visibles mais peut engendrer une diminution du rendement ou une mauvaise qualité. Un bon approvisionnement engendre une croissance optimale alors qu'une consommation de luxe peut, même si la croissance est bonne, entraîner une diminution de la qualité. Une fois le seuil de toxicité atteint, la croissance et la qualité vont être affectées.

a démontré que des enfants recevant une dose trop importante de manganèse avaient 2 à 3 fois plus de risques de mourir durant leur première année (Hafeman et al, 2007).

En 1840, Justus von Liebig formule la loi dite de Liebig, selon laquelle la croissance d'une plante est limitée par l'élément assimilable dont la concentration dans le milieu est la plus faible. Cette loi décrit parfaitement l'effet qu'une carence en manganèse peut engendrer, cependant, elle ne rend pas compte des effets néfastes qu'une concentration trop élevée peut avoir sur une plante. En 1909, Eilhard Alfred Mitscherlich décrit un phénomène qu'il baptisa sous le nom de « Loi des accroissements moins que proportionnels » (ou loi de Mitscherlich). Cette loi décrit le fait que les augmentations de rendement obtenues par application de doses croissantes d'un élément fertilisant sont de plus en plus faibles au fur et à mesure que les doses apportées augmentent et qu'elles finissent par avoir un effet nul voire négatif. Récemment, une étude a permis de mettre en évidence une corrélation entre la production de poivrons et la concentration en manganèse dans le fruit. Cette étude a non seulement mis en évidence une diminution du rendement en cas de carence, mais aussi permis de démontrer l'effet délétère qu'une concentration trop importante en manganèse peut avoir en agronomie (Fig.41) (Silber et al, 2009).

Les plantes peuvent donc souffrir d'une carence en manganèse mais également d'un effet toxique induit par une trop grande biodisponibilité. Ainsi, comme nous l'avons vu auparavant quand le pH du sol devient acide, le manganèse est davantage disponible (Fig.39). Au niveau des plantes, une légère surconcentration (dite également consommation de luxe) ne provoquera pas d'effets importants. En agriculture elle peut cependant entraîner, comme dans le cas du poivron qui a été cité auparavant et ceci malgré une croissance normale, une diminution de la production ou de la qualité. Si la concentration augmente encore, elle passera le seuil de toxicité ce qui se traduira par des symptômes visibles (Fig.42).



Figure 43 : Marbrure caractéristique induite par une surexposition au manganèse sur des feuilles de vigne.

Des concentrations toxiques en manganèse chez les plantes peuvent provoquer un étiolement ou un enroulement du limbe, voire la chute des feuilles (Moroni et al, 2003; Rosas et al, 2007). On constate également une diminution de la longueur des entrenœuds et la présence de points marron sur les feuilles (Fig.43), les tiges et les fruits (Wu Sun, 1994). Ces symptômes se rencontrent généralement si le manganèse dans le sol est à une concentration supérieure à 100 mg/kg ou si la concentration pétiolaire est supérieure à 500 mg/kg de matière sèche.

Une concentration toxique dans les plantes diminue leur croissance. Une déformation des thylakoïdes (Lidon & Teixeira, 2000) et une diminution de la photosynthèse (Kitao et al, 1997) ont été observées. Le manganèse semble bloquer la production de la chlorophylle et engendre l'accumulation de la protoporphyrine IX et de la Mg-protoporphyrine IX monométhyl ester provoquant de ce fait la production de ROS en présence de lumière (Toneva et al, 2002). La toxicité du manganèse provient aussi de la production de ROS qu'il peut directement engendrer via la réaction d'Haber-Weiss. Ironiquement, Lidon et ses collaborateurs ont démontré que, en parallèle des effets négatifs occasionnés le manganèse, ce dernier permet également une augmentation de l'activité de la Mn-SOD (Lidon & Teixeira, 2000).

1.6.3 L'HOMÉOSTASIE AU MANGANÈSE

Bien que les éléments minéraux jouent un rôle nutritionnel important pour les champignons, nous avons vu qu'ils peuvent également être toxiques quand ils sont présents à des doses supérieures à celles requises ou lorsqu'ils ne jouent pas de rôle dans l'activité cellulaire. Ainsi le manganèse est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule mais devient toxique lorsqu'il est présent en concentration trop importante. De manière globale, certains mécanismes vont donc être mis en action pour permettre de réguler finement la concentration en métaux de transition dans les différents compartiments cellulaires afin de subvenir aux besoins. Ces mécanismes vont également permettre d'éviter une trop forte concentration en métaux voir, comme pour le plomb, le mercure ou l'arsenic, d'en éviter la présence pour empêcher que des enzymes ne soient inhibées de manière irréversible par leur liaison au niveau de groupements fonctionnels tels que les groupements sulfhydriles ou d'engendrer la production de ROS (Ercal et al, 2001). Le rôle des métaux de transition est important chez les champignons lignolytiques car ils peuvent potentiellement être utilisés en tant qu'agents de bioremédiation de sites pollués par différents composés, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Cependant,

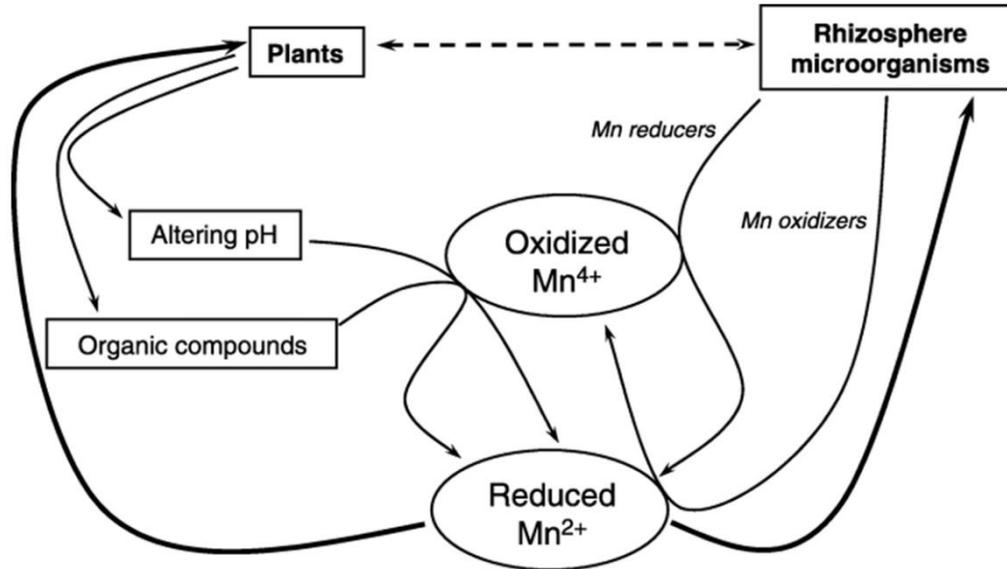


Figure 44 : Mécanismes combinés des plantes et des microorganismes influençant la biodisponibilité du manganèse (Mn) dans la rhizosphère. Les plantes sont capables de modifier le pH (acidification) et de sécréter des composés organiques afin de réduire le manganèse ou libérer le manganèse chélaté. Les microorganismes de la rhizosphère vont également jouer un rôle sur la biodisponibilité du manganèse en permettant sa réduction ou son oxydation (Rengel & Marschner, 2005).

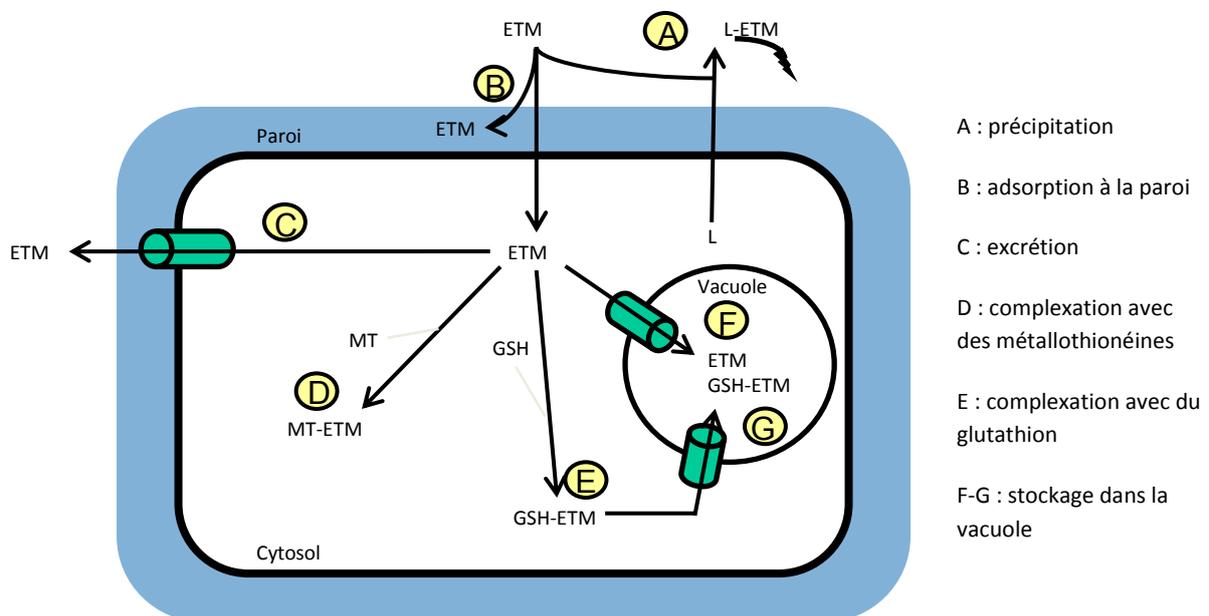


Figure 45 : Principaux systèmes de tolérance aux métaux : ces derniers peuvent être bloqués avant leur entrée dans la cellule par des mécanismes de chélation et de précipitation (A) ou par adsorption sur la paroi (B). Une fois entrés dans la cellule, ils peuvent être dirigés vers un organe comme la vacuole (F) ou être complexés (D et E) et ensuite éventuellement dirigés vers la vacuole (G). Une dernière solution consiste en un système d'efflux qui permettra d'en limiter le niveau intracellulaire (C) (Bellion et al, 2006).

ces pollutions sont souvent accompagnées par des pollutions aux métaux qui peuvent inhiber la production des enzymes.

Les mécanismes de régulation sont d'autant plus importants chez les champignons de la pourriture blanche comme *P. chrysosporium* que les concentrations en métaux sont en général à des niveaux très faibles dans le bois.

Au niveau de la rhizosphère, les plantes sont capables d'excréter des composés afin d'augmenter la biodisponibilité des éléments nutritifs (Rengel, 2002). Ainsi l'étude sur la Luzerne (*Medicago sativa*) a permis de démontrer une augmentation de l'excrétion d'acides comme le citrate en cas de carence en manganèse en corrélation avec une meilleure assimilation (Gherardi & Rengel, 2003). L'état d'oxydation du manganèse joue également un rôle car il est absorbé sous sa forme Mn^{2+} , les espèces présentes au niveau de la rhizosphère vont modifier les capacités d'absorption en réduisant ou en oxydant le manganèse. Ainsi les champignons ectomycorhiziens ou les bactéries comme *Pseudomonas* sont connus pour permettre la réduction du manganèse permettant d'en augmenter ainsi son assimilation (Cairney & Ashford, 1989; Marschner et al, 1991). A l'inverse *Arthrobacter* et *Gaeumannomyces* vont engendrer une oxydation du manganèse et donc le rendre moins disponible (Fig.44) (Bromfield & David, 1976; Rengel, 1994).

Lorsque les métaux sont en quantité trop importante les champignons peuvent mettre en place différents mécanismes qui sont présentés sur la figure 45. Ainsi pour se protéger de concentrations trop importantes en métaux, une première méthode consiste à en limiter l'entrée dans la cellule (Fig.45, A et B), les mécanismes mis en jeu sont généralement rassemblés sous le terme d'évitement. Une deuxième solution, généralement nommée tolérance, consiste à détoxifier les métaux après leur entrée dans la cellule en les complexant ou en les stockant dans des organites comme la vacuole (Fig.45).

1.6.3.1 L'ÉVITEMENT

Il a été démontré que ce système jouait un rôle important dans les mécanismes de protection des plantes contre le manganèse. Ainsi chez *Vigna unguiculata* le manganèse est bloqué dans l'apoplasme par complexation avec des acides organiques (Horst, 1999). Marschner a mis en évidence un autre mécanisme qui consiste en l'oxydation du manganèse par des peroxydases au niveau de la paroi cellulaire des racines (Marschner, 1991). Il a été démontré que l'excrétion de citrate ou d'oxalate permettait de diminuer la biodisponibilité du manganèse et ainsi d'augmenter

la résistance de certains cultivars du Ray-grass (*Lolium perenne*) au manganèse par rapport à des cultivars qui n'en sécrètent pas (Rosas et al, 2011).

Ces mécanismes d'évitement existent aussi chez les champignons. Il a été démontré que la sécrétion d'acide oxalique permettait d'augmenter la résistance au cuivre chez des champignons de la pourriture brune. Ce phénomène a également été retrouvé chez *Yarrowia lipolytica* (Ito et al, 2007). Il a été constaté que *Yarrowia* accumule le cuivre sur la paroi cellulaire. Les mécanismes d'adsorption sur la paroi cellulaire sont largement documentés en particulier chez les champignons mycorhyziens (Bellion et al, 2006; Meharg, 2003).

Ce mécanisme d'adsorption des métaux sur la paroi est aussi utilisé chez *Phellinus weirii*, un phytopathogène. L'accumulation de métaux devient même plus importante dans le mycélium que dans le sol, ce qui pourrait le protéger contre d'autres microorganismes (McDougall & Blanchette, 1996). Chez *Yarrowia*, il a également été constaté que la présence spécifique de manganèse, mais pas de fer par exemple, provoque la production de mélanine. Cette dernière pourrait s'accumuler dans la paroi et y chélater le manganèse (Carreira et al, 1998). Le rôle de protection n'est cependant pas clair, en effet, on rapporte également des réductions de la production en présence de manganèse chez d'autres organismes (West & Strohfus, 1997) ou une augmentation de production en présence de fer uniquement. Le rôle exact de la mélanine n'est pas bien défini bien qu'elle confère une résistance à différents stress comme la dessiccation ou les UV. La mélanine est également nécessaire chez certains champignons pathogènes pour la formation de l'appressorium (Henson et al, 1999).

1.6.3.2 LA TOLÉRANCE

Après l'entrée des métaux dans la cellule, différents mécanismes vont permettre de les répartir en fonction des besoins mais également d'en réguler les concentrations si elles deviennent trop importantes.

Un des mécanismes de régulation des métaux dans la cellule et les organites est l'utilisation de transporteurs. Ceux-ci peuvent être spécifiques pour un métal ou permettre le passage de différents métaux comme nous le verrons par la suite.

Une autre possibilité pour stocker les métaux, tout en empêchant que ces derniers ne génèrent de ROS via la réaction d'Haber-Weiss est de les chélater.

1.6.3.2.1 La chélation

1.6.3.2.1.1 Les métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) ont été découvertes en 1957 par Margoshes et Vallee pour leur capacité à fixer du cadmium (Margoshes, 1957). Elles ont pris le nom de métallothionéines en 1960 en raison de leur capacité à fixer les métaux et de leur richesse en groupements thiols (Kagi & Valee, 1960). Les fonctions connues des MTs incluent des rôles dans la chélation des métaux, mais également dans la croissance et la différenciation cellulaire. Ce sont des protéines intracellulaires caractérisées par leur teneur en cystéine inhabituellement élevée (30%) et le manque d'acides aminés aromatiques. En raison de leur teneur riche en groupement thiol, elles sont capables de se lier avec un certain nombre de métaux toxiques tels que le cadmium, le mercure, le platine et l'argent ou encore avec des métaux essentiels comme le cuivre, le zinc, le fer ou le manganèse. Elles jouent donc un double rôle en protégeant les cellules contre la toxicité des métaux mais également en régulant l'homéostasie des métaux essentiels en permettant leur stockage.

Il a été démontré que les MTs permettent de conférer une résistance au cadmium, au zinc et au cuivre dans des espèces animales, des procaryotes, des végétaux et dans des champignons ainsi que dans le modèle *S. cerevisiae* (Hamer, 1986). Des MTs de plantes ont également permis de restaurer la croissance de cellules sensibles au cuivre chez des mutants de *S. cerevisiae* (Zhou & Goldsbrough, 1994). S'il a été démontré que les MTs jouent un rôle important dans la

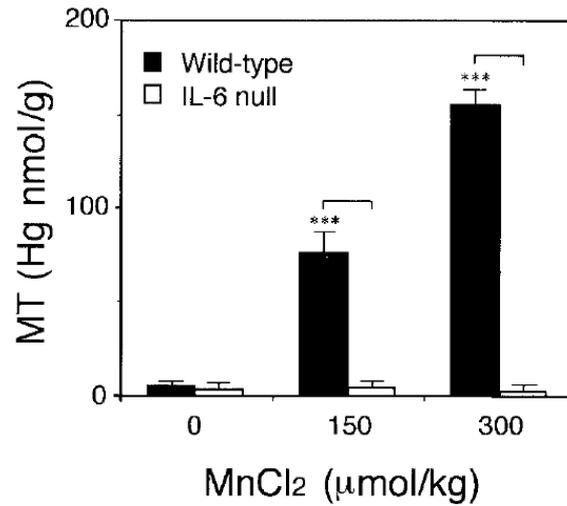


Figure 46 : Concentrations de MTs dans le foie des souris IL-6-nulle et de type sauvage traitées avec du MnCl₂. Les échantillons de foie ont été prélevés 24 h après le traitement. Les concentrations de MTs ont été déterminées par liaison de Hg²⁺ et dosée par absorption atomique (Wu et al, 2010).

chélation de certains métaux, comme le cadmium, le cuivre ou encore le zinc, peu de publications portent sur leur rôle concernant le manganèse. Cependant, chez deux herbacées, la morelle noire (*Solanum nigrum*) et la Vergerette du Canada (*Conyza canadensis*), une corrélation a été démontrée entre une augmentation de la quantité de MTs et un stress induit par une quantité toxique de manganèse (Wu et al, 2010). Chez la souris, l'induction de MTs par le manganèse a été observée. L'administration de $MnCl_2$ à des souris a entraîné l'induction de MTs de manière dose-dépendante dans le foie. Le $MnCl_2$ a provoqué une augmentation spécifique de l'ARNm de l'interleukine-6 dans le foie ainsi qu'une augmentation des taux sériques. Chez un mutant de l'interleukine-6, aucune réponse n'a été observée, mettant en évidence le rôle essentiel de l'interleukine-6 pour l'induction des MTs en présence de manganèse (Fig.46) (Kobayashi et al, 2007).

1.6.3.2.1.2 Le glutathion

Le glutathion (GSH), un composé relativement stable, est présent dans tous les compartiments cellulaires tels que le cytosol, le réticulum endoplasmique, la vacuole ou encore les mitochondries. Il représente l'une des sources majeures de thiols non protéiques chez de nombreux organismes. Le caractère nucléophile du groupement thiol joue un rôle primordial dans la capacité à former des liens avec les métaux et avec des espèces électrophiles. Le GSH est ainsi au cœur d'un système biochimique permettant de protéger les organismes contre diverses agressions telles que le stress oxydatif mais également les métaux lourds (Foyer & Noctor, 2005).

Chez *E. coli*, une étude a permis de montrer l'importance du glutathion dans la protection contre certains métaux. En utilisant différents mutants déficients dans la synthèse du glutathion il a été démontré que le glutathion joue un rôle direct dans la résistance au chrome et au cadmium, à l'inverse il ne semble pas protéger les cellules contre le cuivre et le zinc. Cependant, en utilisant des mutants de transporteurs de cuivre ou de zinc permettant l'efflux de ces deux métaux, il a été constaté une augmentation de la sensibilité des souches double mutantes GSH/transporteurs par rapport aux souches uniquement mutées pour les transporteurs. Il en a été conclu que le glutathion jouait également un rôle dans l'homéostasie de ces métaux, mais que la concentration de ces derniers était régulée via un système d'efflux impliquant des transporteurs spécifiques (Helbig et al, 2008).

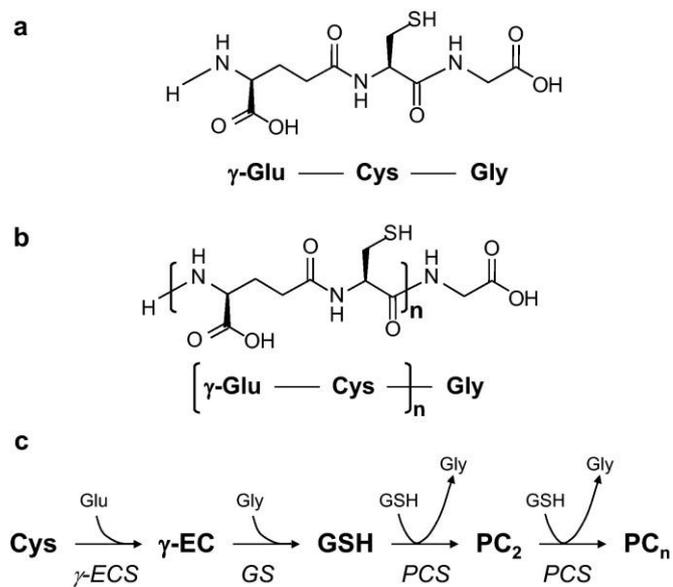


Figure 47 : A: Structure chimique du glutathion; B: Structure chimique d'une phytochélatine ($2 < n < 10$); C Voie de biosynthèse des phytochélatines. Les deux premières enzymes servent à synthétiser du glutathion (γ -EC synthetase (γ -ECS) et glutathione synthetase (GS)) qui sera ensuite utilisé par la phytochélatine synthase (PCS) afin d'allonger la chaîne γ -Glu-Cys en libérant de la glycine (gly) (Brautigam et al, 2009).

Le rôle du glutathion dans la chélation des métaux a également été mis en avant chez les végétaux ainsi que chez des champignons. De nombreuses études portent sur l'implication du glutathion sur la détoxification du cadmium. Ainsi, il a été démontré que la voie de biosynthèse du glutathion était stimulée après exposition au cadmium dans différents organismes comme dans la levure (Vido et al, 2001), dans *Schizosaccharomyces pombe* (Bae & Chen, 2004), dans *Paxillus involutus* (Courbot et al, 2004) ou encore dans *A. thaliana* (Harada et al, 2002; Wójcik & Tukiendorf, 2011). Un mutant de levure a permis de mettre en évidence que le cadmium était stocké dans la vacuole à l'aide du transporteur YCF1 et que la chélation et le transport se faisaient sous la forme Cd-GS₂ (Li et al, 1997). La forme de la chélation peut être dépendante du métal. C'est ainsi que chez *Aspergillus*, l'arsenic est stocké sous la forme AsGS₃ (Canovas et al, 2004).

1.6.3.2.1.3 Les phytochélatines

Le glutathion n'est pas utilisé uniquement sous sa forme libre pour chélater les métaux, il existe un autre système faisant appel à des phytochélatines. Elles ont été initialement découvertes chez *S. pombe* et nommées cadystines (Kondo et al, 1983), puis elles ont pris le nom de phytochélatines après leur isolement à partir d'une suspension cellulaire végétale (Grill et al, 1985). Elles sont composées d'acide glutamique et de cystéine sous la forme (γ -Glu-Cys)_n Gly (Fig.47.B), n étant généralement compris en 2 et 10. Les plantes synthétisent les phytochélatines à partir du glutathion à l'aide d'enzymes, les phytochélatines synthases (Fig.47.C) (EC 2.3.2.15). Cette enzyme est également présente chez certains champignons comme *S. pombe* (Clemens & Simm, 2003) ou *Botrytis edulis* (Collin-Hansen et al, 2007). Cependant elle semble absente chez la plupart des autres champignons même si une voie alternative permet la synthèse de PC sans PC-synthase chez *S. cerevisiae* (Kneer et al, 1992) et la séquestration des complexes ainsi formés dans la vacuole. Ainsi, malgré l'absence de PC-synthase chez la plupart des champignons, des mécanismes utilisant le principe des phytochélatines semblent exister. Dans le cas de *P. ostreatus*, le cadmium et le cuivre semblent être complexés à des molécules de faible poids moléculaire, l'analyse de ces produits met en avant une concentration importante en aspartate, en cystéine et en glycine (Favero et al, 1990). Un composé de 2240 Da composé d'aspartate, de glycine, de glutamate et de sérine permet de chélater le cuivre chez *Grifola frondosa* (Shimaoka et al, 1993). Pour *Phanerochaete* il a été démontré qu'une molécule capable de chélater le cuivre est produite en réponse à ce dernier (Vacchina et al, 2002).

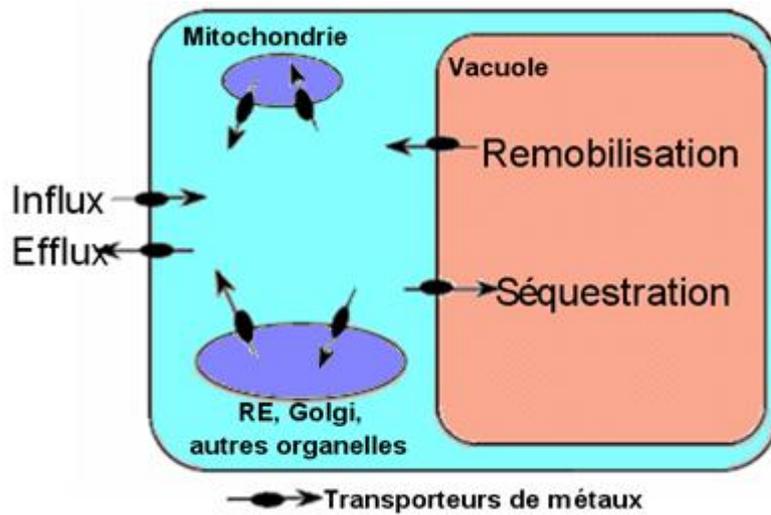


Figure 48 : Rôle des transporteurs à l'échelle cellulaire : Certains transporteurs vont directement influencer la quantité de métaux intracellulaires via un système d'influx/efflux. La distribution sera assurée par des transporteurs présents sur les organelles (mitochondrie, réticulum endoplasmique...). En cas d'absorption trop importante les métaux peuvent être séquestrés dans la vacuole et peuvent être remobilisés en cas de carence.

Cependant dans la même étude trois autres organismes, *Schizophyllum commune*, *Daedalea quercina* et *P. ostreatus* n'ont pas produit de composé pour chélater le cuivre suggérant que, chez les champignons lignivores, le cuivre était principalement adsorbé sur la paroi.

1.6.3.2.2 Les transporteurs de manganèse :

Les mécanismes vus auparavant sont des mécanismes de détoxification des métaux qui permettent de réguler globalement les métaux dans l'organisme, sans pour autant permettre une répartition spécifique dans les organites ou une absorption en cas de besoin. A l'inverse les transporteurs permettent la distribution, la séquestration dans un organite précis ou l'efflux des métaux.

Comme tous les organismes vivants les champignons ont besoin de métaux de transition, comme le fer, le manganèse, le zinc, le cuivre, le nickel et le cobalt pour assurer des fonctions métaboliques vitales. Du fait de leur capacité à gagner ou à céder des électrons, ces métaux servent de cofacteurs pour des enzymes aussi variées que les protéases, les superoxyde-dismutases et un grand nombre de nucléases. Pour la même raison, ils jouent des rôles cruciaux dans les chaînes de transfert d'électrons intervenant dans les mitochondries. Par ailleurs, du fait de leur propriété de coordination multiple, on les retrouve dans des structures complexes basées sur un noyau porphyrique où elles peuvent permettre de transporter l'oxygène comme dans l'hémoglobine ou jouer un rôle de cofacteur, aussi nommé groupement prosthétique, comme dans la chlorophylle ou les cytochrome-oxydases.

Les métaux sont véhiculés via des transporteurs qui sont des protéines à plusieurs domaines transmembranaires permettant le passage au travers des membranes lipidiques. Les transporteurs de métaux peuvent jouer des rôles très contrastés à l'échelle de la cellule (Fig.48) :

- Au niveau de la membrane plasmique pour permettre l'influx de métaux dont la cellule a besoin ou l'efflux de métaux présents en excès.
- Au niveau des organites dans lesquels leur présence est essentielle, comme dans les mitochondries où les métaux jouent des rôles dans les transferts d'électrons.
- Au niveau de la vacuole où les transporteurs de métaux peuvent jouer un rôle soit dans la détoxification en favorisant la séquestration des métaux, soit dans la remobilisation des métaux en cas de carence.

Les mouvements cellulaires de manganèse sont dus à des transporteurs de différentes familles. Une recherche bioinformatique a été réalisée afin de trouver les principaux transporteurs de manganèse, notamment en recherchant les orthologues de transporteurs présents chez *S. cerevisiae*.

1.6.3.2.2.1 SMF1 et SMF2

SMF1 et SMF2 (*Suppressor of Mitochondria import Function*) font partie d'une famille de transporteurs nommée NRAMP (TC 2.A.55). Le nom NRAMP (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*) provient d'une étude qui a permis de le classer initialement comme un déterminant génétique de la sensibilité aux bactéries pathogènes intracellulaires chez la souris (Vidal et al, 1993). Cependant, il a fallu attendre plusieurs années avant que la fonction de transporteur de métaux des protéines codées par ces gènes ne soit soupçonnée. Il a d'abord été montré que *SMF1*, un homologue de NRAMP chez la levure intervient dans le transport du manganèse (Supek et al, 1996). Chez le rat, *DCT1* (pour Divalent-Cation Transporter) a été isolé et caractérisé fonctionnellement sur la base de sa capacité à transporter le fer (Gunshin et al, 1997). En parallèle un mutant de *Drosophila melanogaster*, *malvolio* muté dans le gène *mvl*, a été caractérisé comme ayant des troubles du comportement gustatif. Il a été déterminé que le gène *mvl* code une protéine ayant une forte homologie de séquence avec les NRAMP (Rodrigues et al, 1995). Sur la base des résultats obtenus chez la levure, des cations ont été ajoutés dans le milieu de culture du mutant *malvolio*. L'apport de manganèse ou de fer a ainsi permis de restaurer le comportement gustatif tandis que l'ajout d'autres cations, comme le magnésium ou le calcium, a été sans effet, voire a induit une inhibition comme pour le zinc et ceci même en présence de manganèse (Orgad et al, 1998).

La famille de protéines NRAMP est aussi bien présente dans les organismes procaryotes que dans les eucaryotes (Cellier & Gros, 2004). *S. cerevisiae* possède trois représentants de la famille NRAMP, nommés SMF1, 2 et 3. Il a été démontré que SMF1, qui est une protéine plasmalemmique, joue un rôle dans le transport du manganèse et du fer via un flux de protons (Chen et al, 1999; Supek et al, 1996). SMF2 joue également un rôle dans le transport du manganèse, cependant il semble localisé au niveau de vésicules. Il a été démontré que cette protéine joue un rôle primordial dans le transfert du manganèse vers la mitochondrie (Luk & Culotta, 2001). SMF3 est une protéine vacuolaire impliquée spécifiquement dans le transport du fer et régulée de manière différente de SFM1 et 2 (Portnoy et al, 2002).

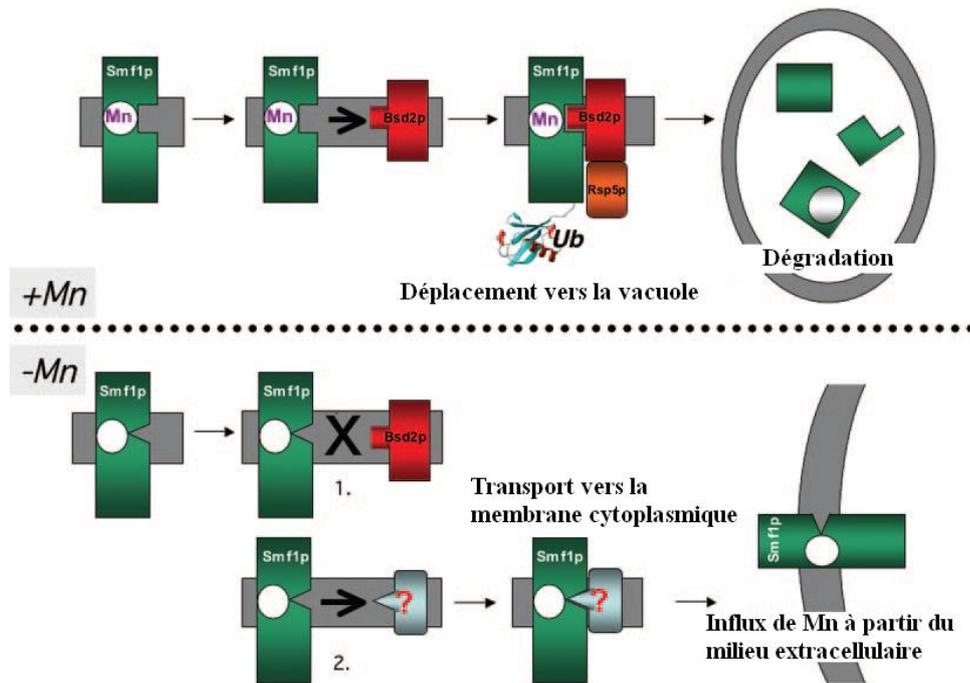


Figure 49 : Modèle de régulation de la localisation de SMF1 par le manganèse : En présence de manganèse BSD2 reconnaît une conformation particulière de SMF1, ce qui va permettre le recrutement de RSP5, une ubiquitine ligase entraînant son acheminement vers la vacuole pour y être dégradée. Une carence en manganèse ne permet plus l'ubiquitination de SMF1 qui sera alors déplacé vers la membrane cytoplasmique afin de favoriser l'influx de manganèse (Culotta et al, 2005).

Récemment le rôle de SMF1 et 2 a été étudié dans une souche *sod1Δ* et a permis de mettre en évidence l'accumulation du manganèse par ces deux protéines (Reddi et al, 2009), ainsi que le rôle de BSD2 déjà mis en avant dans la régulation de l'entrée du manganèse dans la cellule (Liu & Culotta, 1999). En dehors de leur rôle en tant que transporteur de haute affinité de manganèse et de fer, les NRAMPs peuvent également prendre en charge d'autres métaux dicationiques. L'inactivation de BSD2 conduit à une suraccumulation des protéines SMF1 et 2, provoquant une accumulation plus importante de cadmium et de cuivre via SMF1 et de cobalt via SMF2 (Liu et al, 1997). On retrouve ce phénomène chez d'autres espèces. Ainsi, chez *A. thaliana*, la surexpression de NRAMP6 exacerbe la sensibilité au cadmium (Cailliatte et al, 2009). De même, l'expression de TcNRAMP3 de *Thlaspi caerulescens* chez la levure augmente la sensibilité au cadmium (Wei et al, 2009). Chez l'Homme il a été démontré que NRAMP2 est également en mesure de prendre en charge le cadmium en fonction du pH (Okubo et al, 2003). Certains NRAMP peuvent encore prendre en charge des cations trivalents. Ainsi NRAT1, un NRAMP du riz a la capacité de prendre en charge l'aluminium (Xia et al, 2010).

Le système de régulation de ces transporteurs est particulier ne s'effectuant pas de manière transcriptionnelle mais de manière post-translationnelle. En effet, des souches de *S. cerevisiae* cultivées en condition riche, voire toxique en manganèse, expriment la même quantité d'ARNm que des souches cultivées en condition pauvre en manganèse. En absence de manganèse SMF1 est présent à la surface cellulaire et SMF2 au niveau de vésicules. A l'inverse, en présence de manganèse, les transporteurs se trouvent essentiellement dans le lumen de la vacuole pour y être dégradés (Liu and Culotta 1999). Les protéines sont dirigées vers la vacuole à partir de l'appareil de Golgi via un mécanisme semblable à celui de la carboxypeptidase Y (Bryant & Stevens, 1998; Eguez et al, 2004). La présence de manganèse permet probablement la reconnaissance d'un motif spécifique par BSD2, qui permet de diriger les protéines ayant un mauvais repliement, mais également certaines protéines correctement formées comme les carboxypeptidases S et Y vers la vacuole (Bryant & Stevens, 1998).

En l'absence de manganèse ce repliement ne serait plus reconnu par BSD2. SMF1 sera relocalisé vers le plasmalemma, certainement en étant reconnu par une autre protéine car chez le mutant *bsd2Δ*, SMF1 s'accumule dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi en présence de manganèse (Fig.49) (Culotta et al, 2005).

1.6.3.2.2.2 *PHO84*

Lorsque la quantité de manganèse devient toxique, les protéines SMF1 et 2 sont dirigées vers la vacuole. Cependant le manganèse pourra encore pénétrer dans la cellule via un autre transporteur : PHO84 (PHosphate metabolism). C'est un transporteur de la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily) (TC 2.A.1) qui comprend également de nombreux transporteurs de sucres (HXT). Il a d'abord été déterminé que *pho84* code un transporteur plasmalemmique impliqué dans l'absorption de haute affinité du phosphate inorganique (Bun-Ya et al, 1991). Il a ensuite été mis en relief que ce transport nécessite un gradient de protons et que la présence de certains métaux, comme le manganèse ou le cobalt, était nécessaire à l'influx de phosphate et que le transport de ce dernier pouvait être inhibé par de l'EDTA (Fristedt et al, 1999). Un modèle faisant intervenir le transfert de complexes MeHPO_4 a ainsi été proposé. Ce rôle a été confirmé et il a été démontré qu'une souche *pho84Δ* accumulait moins de manganèse que la souche sauvage et ceci particulièrement lorsque la concentration extracellulaire devient importante. L'utilisation d'une souche double mutante *smf1Δ smf2 Δ* a permis de montrer que le manganèse transporté par PHO84 est biologiquement actif et peut être intégré dans des enzymes manganèse-dépendantes comme la SOD2 (Jensen et al, 2003). Il en a été conclu que PHO84 permettait le transport du manganèse sur une large gamme de concentration.

L'import du manganèse dans le cas de *S. cerevisiae* semble impliquer des transporteurs de la famille NRAMP (SMF 1 et SMF2) et de la famille MFS (PHO84). Même si SMF1 et 2 présentent un système de régulation post-transcriptionnelle, aucun de ces transporteurs n'est directement régulé par le manganèse dans la levure et ceci malgré leur rôle dans son absorption.

1.6.3.2.2.3 *CCC1*

CCC1 (Cross-Complements Ca^{2+}) est un membre de la famille Vit (TC 2.A.89) et a été initialement isolé comme un gène permettant de compléter la sensibilité au calcium dans une souche mutante de *csg1* (Fu et al, 1994). Il a ensuite été démontré que CCC1 était à même de diminuer la sensibilité au manganèse d'une souche ultrasensible, *pmr1Δ*, et que le mécanisme de résistance se ferait via un système de séquestration (Lapinskas et al, 1996). Il a ensuite été démontré que CCC1 pouvait prévenir l'accumulation de fer au niveau mitochondrial dans la souche *yfh1Δ*, suggérant un rôle dans l'homéostasie de ce dernier. Cette hypothèse a été confortée par le fait que la surexpression de *ccc1* entraîne l'activation du facteur de transcription AFT1 qui contrôle l'expression de FET3/FTR1, un complexe de haute affinité impliqué dans l'import du fer dans la cellule (Chen & Kaplan, 2000). Ces travaux ont été confirmés par l'analyse de vacuoles isolées afin de déterminer leur contenance en fer et par immunolocalisation de la protéine CCC1 (Li et al, 2001). La séquestration ou un tout autre moyen de détoxification est nécessaire lorsque la concentration en métal devient trop importante, cependant un pool doit rester disponible pour les enzymes qui l'utilisent comme cofacteur. Ainsi l'expression de CCC1 est spécifiquement régulée par la concentration en fer via un mécanisme faisant intervenir YAP5 (Li et al, 2008).

Des orthologues de CCC1 ont été caractérisés dans les bactéries et les plantes mais semblent être absents chez les mammifères. Chez *Arabidopsis*, VIT1 semble nécessaire pour le stockage du fer dans les graines (Kim et al, 2006). Un orthologue a également été trouvé chez la tulipe et permet de compléter la souche de levure *ccc1Δ*. Son rôle dans la tulipe est cependant particulier car son expression est spécifiquement localisée dans les pétales et engendre un changement de couleur du pourpre vers le bleu dans les cellules l'exprimant (Momonoi et al, 2009).

Chez la levure aucun autre transporteur n'a été caractérisé pour le stockage du manganèse dans la vacuole. De plus il ne semble pas y avoir de transporteur impliqué dans le relargage de ce dernier dans le cytoplasme. Il pourrait donc se faire via un transporteur impliqué dans la remobilisation d'un autre métal.

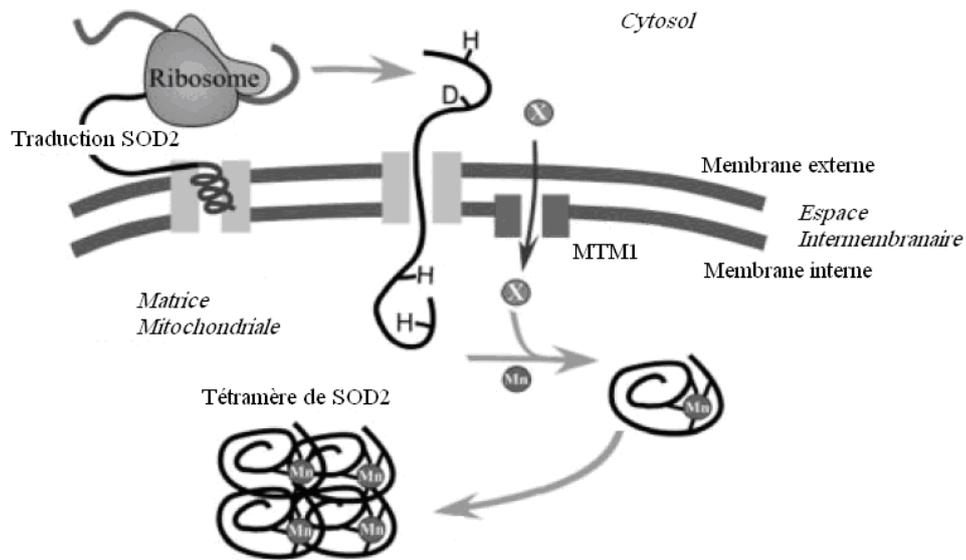


Figure 50 : Modèle proposé pour l'activation post-traductionnelle de la SOD2 : Les ribosomes nécessaires pour la traduction sont associés à la membrane mitochondriale externe, ce qui faciliterait l'importation co-traductionnelle de la SOD2 dans les mitochondries. La protéine acquerra son cofacteur avant ou pendant le repliement du polypeptide et nécessite l'intervention de MTM1. Le substrat précis de MTM1 n'est pas connu (encadré X), mais cela pourrait être le manganèse lui-même ou un soluté qui facilite l'insertion du manganèse. Le manganèse se lie avec la SOD2 via trois Histidine (H) et un Aspartate (D). Après l'insertion du manganèse, les monomères s'associent pour former l'enzyme active sous sa forme tétramérique (Luk et al, 2005).

1.6.3.2.2.4 *MTM1*

Outre son stockage lorsqu'il est en concentration trop importante, le manganèse peut également être délivré dans des organites où il est nécessaire à l'activité d'enzymes qui l'utilisent comme cofacteur. *MTM1* (Manganèse Trafficking protein for Mitochondrial SOD2, TC 2.A.29) est un transporteur de la famille MCF (Mitochondrial Carrier Family) qui a été caractérisé comme étant nécessaire à l'activation de la superoxyde-dismutase mitochondriale (SOD2) (Luk et al, 2003). Cette dernière nécessite du manganèse comme cofacteur pour pouvoir être active.

La mitochondrie possède deux membranes, des pores dans la membrane externe permettent le passage du manganèse par simple diffusion, alors que le passage à travers la membrane interne nécessite un transporteur. *MTM1* est le seul transporteur de la famille MCF qui a été identifié comme rendant la SOD inactive suite à sa délétion. Les mutants de *MTM1* présentent une quantité normale de SOD ce qui montre que le transporteur n'est pas impliqué dans la régulation de la protéine. Cependant les mutants *mtm1Δ* accumulent des quantités de fer et de manganèse bien plus élevées au niveau de la mitochondrie. Cette accumulation de manganèse paraît contradictoire au vu de la diminution de l'activité de la SOD. Il en avait été déduit que *MTM1* n'est pas un transporteur de manganèse. Des études récentes suggèrent cependant que *MTM1* serait tout de même directement lié à l'activation de la Mn-SOD, soit par une activité chaperonne permettant le bon repliement de la protéine pour acquérir son cofacteur, soit par l'insertion du manganèse dans le site actif de la SOD directement (Luk et al, 2005) ou via une chaperonne qui prendrait en charge le manganèse à la sortie du transporteur pour permettre son insertion dans le site actif au moment du passage de la Mn-SOD dans la matrice mitochondriale (Fig.50).

1.6.3.2.2.5 PMR1

PMR1 est un transporteur de la famille des P-ATPase (TC 3.A.3) que l'on retrouve également chez les animaux sous le nom de SPCA (Secretory Pathway Ca^{2+} ATPases). Il a été initialement caractérisé comme un transporteur dont la mutation entraîne un défaut de glycosylation des protéines (Rudolph et al, 1989) et il a été démontré qu'il était certainement un transporteur de calcium (Antebi & Fink, 1992). Son rôle dans le transport du manganèse n'a été découvert que plus tard, la délétion de PMR1 permettant de supprimer la sensibilité de souches déficientes pour les SODs via un mécanisme entraînant l'accumulation de manganèse dans la cellule (Lapinskas et al, 1995). Le double rôle dans le transport de Ca^{2+} et de Mn^{2+} par PMR1 a été démontré par Dürr. Ainsi, la délétion de PMR1 provoque les effets combinés qui peuvent être induits par la carence en Ca^{2+} ou en Mn^{2+} , à savoir respectivement la sécrétion de carboxypeptidase Y et la glycosylation des protéines (Durr et al, 1998). Différentes études ont permis de caractériser les acides aminés nécessaires à l'activité de la pompe et à la spécificité du substrat transporté. Ainsi des mutations sur un motif « EF-hand » entraînent l'inhibition du transport du Ca^{2+} , alors que l'effet est limité sur le transport du Mn^{2+} (Wei et al, 1999). D'autres mutations ont également été caractérisées et ont permis de relever la nécessité des résidus nécessaires au transport des deux ions, mais également des résidus dont la mutation n'affecte que le transport d'un des deux éléments (Mandal et al, 2003; Mandal et al, 2000).

Des orthologues de PMR ont été caractérisés dans d'autres organismes comme *Aspergillus fumigatus*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* (Agaphonov et al, 2007; Feng et al, 2011; Soriani et al, 2005). Dans ce dernier organisme la délétion de PMR1 a permis une augmentation de la sécrétion de prochymosine dans le milieu extracellulaire. Des orthologues de PMR1 ont également été trouvés chez *Caenorhabditis elegans*, chez le rat et chez l'Homme où des mutations dans *atp2c1*, qui code hSPCA1, l'orthologue du gène *pmr1* de *S. cerevisiae*, sont à l'origine de la maladie de Hailey-Hailey. L'expression de hSPCA1 dans la levure permet de compléter la délétion de PMR1 (Ton et al, 2002).

PMR1 semble être la voie principale de sécrétion du manganèse lorsque ce dernier est présent en trop grande quantité. Il a été récemment montré que PMR1 pourrait également protéger les cellules contre le cadmium via sa sécrétion (Lauer Júnior et al, 2008). Ce métal qui peut entrer via des transporteurs de manganèse (NRAMP) pourrait donc aussi être sécrété via un transporteur de manganèse.

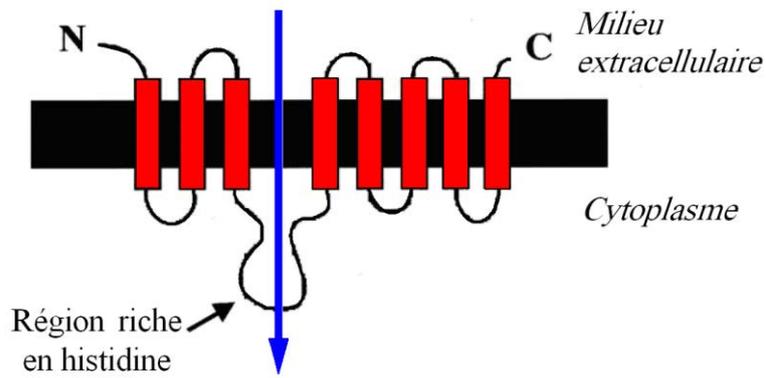


Figure 51 : Topologie des transporteurs de type Zip (Guerinot, 2000).

1.6.3.2.2.1 ATX2

ATX2 (Antioxydant 2) est un transporteur de la famille des ZIP. L'appellation ZIP ou 'Zrt-, Irt-like Protein' provient des premières caractérisations de deux transporteurs ZIP : Irt1 pour le transport du fer chez *A. thaliana* et Zrt1 pour le transport du zinc chez la levure *S. cerevisiae*. Les transporteurs ZIP possèdent généralement 8 domaines transmembranaires et une région riche en histidine localisée sur une boucle cytoplasmique qui serait impliquée dans la régulation du transporteur (Fig.51) (Eide, 2006; Guerinot, 2000). Une centaine de membres de la famille ZIP appartenant aux différents règnes du vivant ont été identifiés à ce jour.

Il n'y a que chez la levure que le fonctionnement des protéines ZIP est entièrement élucidé (Gaither & Eide, 2001). Cinq gènes ZIP ont ainsi été identifiés. Le gène *zrt1* code un transporteur de zinc de haute affinité qui est localisé sur la membrane plasmique (Zhao & Eide, 1996). Le gène *zrt2* code un transporteur de faible affinité pour le zinc lui aussi localisé sur la membrane plasmique (Zhao & Eide, 1996). Le gène *zrt3* code un transporteur localisé au niveau de la vacuole qui permet la remobilisation du zinc. Deux autres transporteurs de type ZIP sont situés sur des membranes internes de la cellule. Le premier, LIV1, est lui aussi un transporteur de zinc et est présent au niveau du réticulum endoplasmique (Kumánovics et al, 2006). Quant au second, ATX2, il est localisé au niveau des vésicules de l'appareil de Golgi. Il joue un rôle important dans l'homéostasie au manganèse puisqu'il permet de le recycler, faute de quoi il serait sécrété (Lin & Culotta, 1996).

Les protéines de type ZIP permettant le transport de manganèse sont présentes chez d'autres organismes. Ainsi chez *E. coli*, ZupT est un transporteur de la famille ZIP capable d'engendrer l'influx de Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , il présente donc une faible spécificité de substrat (Taudte & Grass, 2010). Chez *Arabidopsis* 15 gènes codant des transporteurs ont été identifiés, atIRT1 est une protéine plasmalemmique régulée par la présence de fer, cependant elle permet aussi le transport de zinc et de manganèse. Sa mutation peut être complétée par atIRT2 qui permet également le transport de fer et de zinc, mais pas celui du manganèse (Hall & Williams, 2003; Korshunova et al, 1999).

Récemment une étude chez *Thlaspi japonicum* portant sur deux ZIPs, TjZNT1 et TjZNT2 respectivement impliqués dans le transport du zinc et du manganèse, a permis de mettre en évidence l'importance de la région N-terminale par rapport à la spécificité de substrat. En effet, ces deux protéines présentent une forte homologie à l'exception de la région N-terminale de TjZNT2 qui possède une extension de 36 acides aminés par rapport à TjZNT1. La production de protéines chimères a permis de mettre en évidence que l'ajout de la région N-terminale de

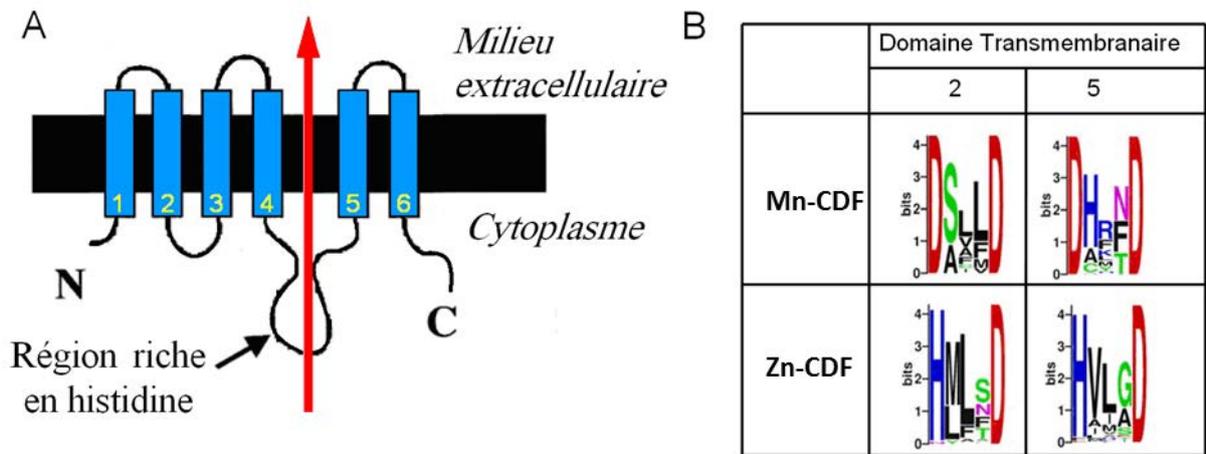


Figure 52 : A) Topologie des transporteurs de type CDF (Eide, 2006). B) Séquences consensus des domaines transmembranaires II et V (Montanini et al, 2007).

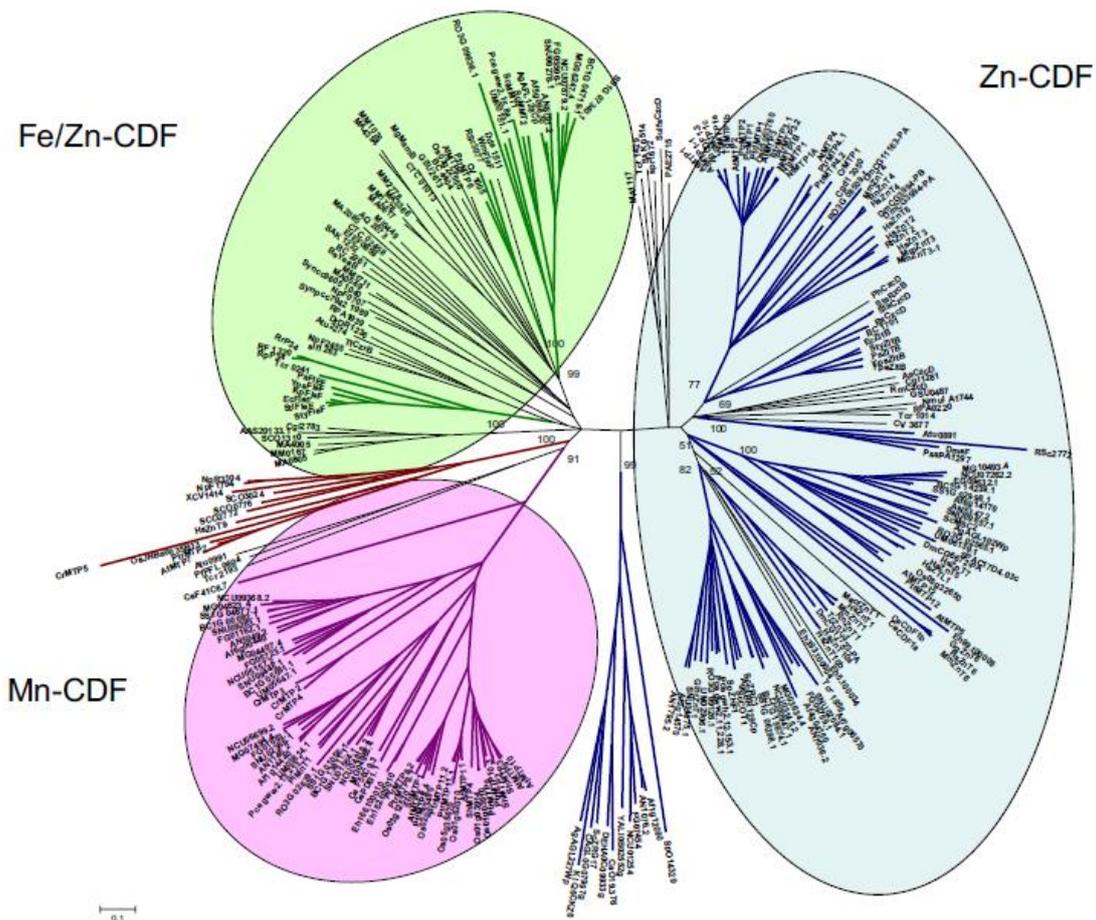


Figure 53 : Arbre phylogénétique de la famille des CDF : Les CDF sont impliqués dans le transport de métaux comme le fer ou le zinc mais également dans le transport du manganèse (Mn-CDF), ces derniers forment un clade particulier (Montanini et al, 2007).

TjZNT2 sur TjZNT1 altérerait fortement la capacité à transporter le zinc. A l'inverse la suppression de cette partie de protéine sur TjZNT2 permet à ce dernier de prendre en charge le zinc au détriment du transport du manganèse. La région N-terminale joue donc un rôle très capital dans la sélectivité du substrat (Nishida et al, 2011).

1.6.3.2.2.2 CDF:

Les transporteurs de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) sont impliqués dans le transport de différents cations. Ces derniers sont présents dans de nombreux organismes où ils sont impliqués dans la tolérance aux métaux. Il a été déterminé qu'ils pouvaient également transporter du manganèse (Montanini et al, 2007).

Les CDFs ont généralement six domaines transmembranaires et possèdent une région riche en histidines entre les domaines transmembranaires IV et V (Fig.52, A) (Hall & Williams, 2003; Montanini et al, 2007). Il existe trois familles majeures de CDF que l'on peut séparer selon le substrat qu'ils transportent. La première famille est spécifique du zinc, la deuxième peut transporter le fer et le zinc alors que la dernière famille est spécifique du manganèse (Fig.53). Ces différences se retrouvent au niveau de séquences consensus présentes dans le deuxième et le cinquième domaine transmembranaire. Les transporteurs de fer et de zinc possèdent une séquence consensus contenant une histidine et un aspartate séparés par trois acides aminés (HXXXD) alors que pour les transporteurs de manganèse il s'agit de deux aspartates (DXXXD) (Fig.52, B) (Montanini et al, 2007).

Chez *S. cerevisiae*, six protéines CDF ont été caractérisées : ZRC1 et COT1 sont des transporteurs localisés au niveau de la vacuole et confèrent aux cellules une résistance contre de fortes concentrations en zinc (ZRC1, COT1) et en cobalt (COT1) en permettant leur séquestration dans la vacuole. MSC2 semble être liée à la distribution cellulaire du zinc dans le noyau (Li & Kaplan, 2001). MMT1 et MMT2 sont des transporteurs mitochondriaux qui prennent en charge le fer (Li & Kaplan, 2001). Enfin plus récemment une sixième protéine CDF (ZRG17) a été caractérisée (Ellis et al, 2005). Elle est localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et réaliserait des interactions protéine-protéine avec MSC2. Ces différents transporteurs CDF participent ainsi à l'homéostasie du zinc et du fer dans les cellules en les redistribuant vers différentes organelles.

Bien qu'aucun transporteur de la famille des CDFs impliqué dans les mouvements de manganèse ne soit présent chez *S. cerevisiae*, il a été démontré qu'ils semblent présents dans de nombreuses espèces appartenant à différents règnes du vivant. En effet ils semblent présents

dans des espèces fongiques (Montanini et al, 2007). Les premiers CDFs impliqués dans le transport du manganèse ont été identifiés chez la luzerne du Brésil, *Stylosanthes hamata*. L'expression d'un de ces transporteurs, ShMTP8, a permis de rendre des souches de levures sensibles et des plantules d'*Arabidopsis* plus résistantes au manganèse (Delhaize et al, 2003). Il a également été déterminé que ce transporteur était localisé sur le tonoplaste. Une autre étude chez *Arabidopsis* a permis de mettre en évidence que AtMTP11 était également un transporteur de manganèse. Ce dernier serait plutôt localisé dans des compartiments pré-vacuolaires (Delhaize et al, 2007). Un Mn-CDF a également été caractérisé chez *Streptococcus pneumoniae*, nommé mntE. La délétion de ce dernier rend la souche sensible au manganèse mais pas aux autres métaux. La mutation de ce transporteur n'a pas que des effets négatifs, car il a été démontré qu'une suraccumulation de manganèse induite par sa délétion pouvait être à l'origine d'une résistance accrue à des stress oxydatifs (Rosch et al, 2009). Une analyse bioinformatique a permis la mise en évidence d'un transporteur de type CDF ayant la signature des transporteurs de manganèse chez *P. chrysosporium*.

1.7 OBJECTIFS

Le but de cette thèse est de voir si une corrélation peut être trouvée entre l'activité lignine peroxydase et une différence d'expression au niveau des transporteurs de manganèse. La production de LIPs étant corrélée avec une carence en manganèse, il pourrait y avoir surexpression des transporteurs impliqués dans l'influx de manganèse ou une inhibition de ceux qui seraient en charge de son efflux ou de sa séquestration. Enfin un transporteur comme MMT1 pourrait être surexprimé afin d'essayer de palier localement à un manque en manganèse.

A ce jour, *S.cerevisiae* est le seul organisme fongique où le rôle des transporteurs de manganèse a été caractérisé. Nous nous proposons donc de vérifier si les connaissances acquises sur ce sujet « Modèle » peuvent être transposables chez d'autres organismes comme chez *P. chrysosporium*.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL

2.1.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

2.1.1.1 PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM

La souche de *Phanerochaete chrysosporium* utilisée dans cette étude est la souche RP78. Cette souche est homocaryotique et a été séquencée en 2004. Les résultats du séquençage et de l'annotation du génome de cette souche sont disponibles sur le site internet du Joint Genome Institute (<http://genome.jgi.doe.gov/Phchr1/Phchr1.home.html>).

2.1.1.2 ESCHERICHIA COLI

La souche DH5 α d'*Escherichia coli* est utilisée couramment en laboratoire pour le clonage et la multiplication de plasmides. Elle permet notamment d'obtenir un taux de transformation élevé (jusqu'à 10⁸ CFU/ μ g d'ADN). Son génotype est le suivant : F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ* ⁻.

2.1.1.3 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Afin d'étudier la fonction des gènes d'intérêt clonés, nous avons utilisé des souches de levures déficientes de *S. cerevisiae*. Elles proviennent de la banque EUROSCARF (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional analyses) qui est une banque contenant des mutants de délétion systématique pour la plupart des gènes de *S. cerevisiae*. EUROSCARF est une initiative européenne basée en Allemagne ayant pour but de collecter et de regrouper les souches issues de trois différents programmes: BMBF (325 gènes délétés) (Entian et al, 1999), EUROFAN I (800 gènes délétés) (Wach et al, 1994) et EUROFAN II qui est un programme

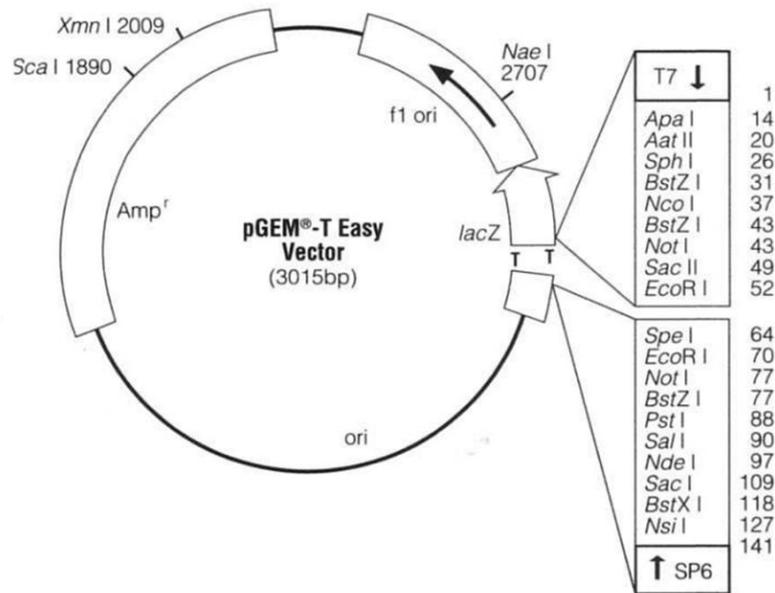


Figure 54 : Vecteur d'expression pGEM-T Easy : Ce plasmide contient une origine de réplication du phage f1 et un multisite de clonage localisé dans le gène *lacZ* permettant une sélection blanc/bleu des clones ayant intégré un fragment d'ADN.

mondial de délétion systématique des gènes de *S. cerevisiae* (Winzeler et al, 1999). La banque EUROSCARF regroupant les résultats de différents programmes, il est possible dans certains cas d'obtenir une délétion dans plusieurs fonds génétiques. Il est à noter que toutes les souches utilisées au cours de cette étude proviennent du programme EUROFAN II dans lequel les gènes de la levure ont été délétés et remplacés par le gène *KANMX4* entraînant une résistance à la drogue G418 (généticine). De même toutes les souches utilisées proviennent de la souche de référence BY4741 et sont donc auxotrophes pour trois acides aminés (histidine, leucine et méthionine) et pour l'uracile.

Ces souches sont conservées au laboratoire en stock glycérol à -80°C.

2.1.2 PLASMIDES ET VECTEURS D'EXPRESSION.

2.1.2.1 LE PLASMIDE PGEM®-T EASY.

Le plasmide pGEM-T Easy (3015 pb) (Promega) est un vecteur de réplication qui a été conçu afin de cloner facilement des produits de PCR. Ce vecteur est fourni sous forme ouverte, coupé par EcoRV et additionné de thymidine sortantes aux extrémités 3' terminales. Il permettra donc de cloner directement un fragment d'ADN amplifié par PCR avec une polymérase ajoutant une déoxy-adénosine 5' sortante. La plupart des polymérases haute-fidélité n'ajoutent pas cette adénosine à cause de l'activité 5'>3' exonucléase, il est ainsi nécessaire d'adényler le fragment d'ADN après purification. Lors de clonage par PCR haute-fidélité cette étape a été réalisée en utilisant la Taq polymérase du fournisseur Biolabs. Ce plasmide contient une origine de réplication du phage f1 et un site de clonage multiple (MCS) localisé dans le gène *lacZ* (Fig.54) permettant une sélection blanc/bleu des clones positifs. Le vecteur pGEM-T Easy contient aussi les promoteurs pour les ARN polymérases T7 et SP6 de part et d'autre du MCS. L'utilisation d'oligonucléotides complémentaires à ces séquences permettra de vérifier la présence et le sens d'insertion des gènes d'intérêt dans le site de clonage par PCR.

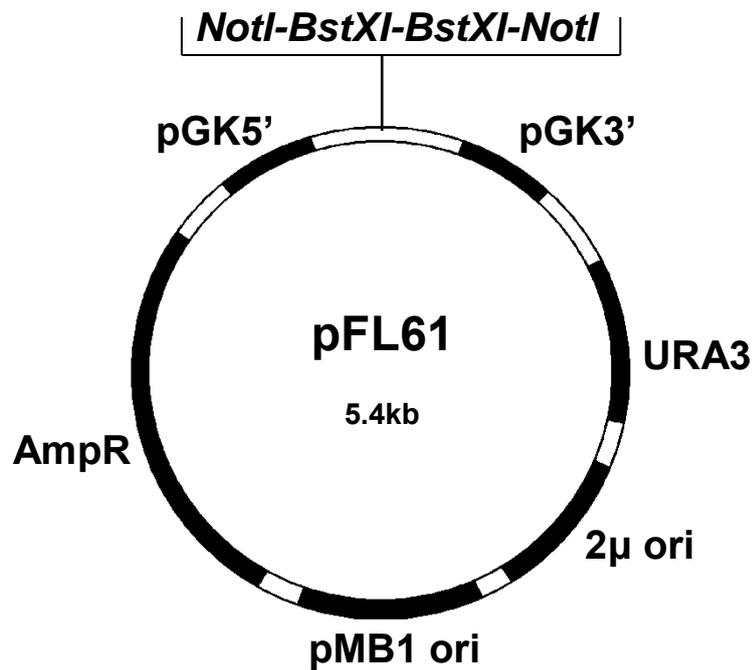


Figure 55 : Vecteur d'expression pFL61 : Ce plasmide possède le gène de résistance bactérien à l'ampicilline ainsi que le gène URA3 permettant de compléter les souches de levure auxotrophe à l'uracile. En outre, il possède des sites de clonages NotI et BstXI en aval du promoteur de la phosphoglycérokinase de *S. cerevisiae* permettant une expression constitutive du gène inséré entre ces sites.

2.1.2.2 LE PLASMIDE D'EXPRESSION PFL61

C'est un plasmide navette qui peut se répliquer aussi bien dans *E. coli* que dans *S. cerevisiae* car il possède une origine de répllication pour chaque organisme (Fig.55) (Minet et al, 1992). Ce plasmide possède le gène AmpR permettant la résistance à l'ampicilline dans *E. coli* et le gène URA3 qui permettra la sélection des transformants de levures sur un milieu dépourvu d'uracile. Le site de clonage contient le site de restriction *NotI*, ce site de clonage étant situé en aval d'un promoteur constitutif fort, à savoir, le promoteur de la phosphoglycerokinase de *S. cerevisiae*. Le vecteur pGEM-T Easy contenant des sites *NotI* de part et d'autre du site de clonage, il suffira de le digérer avec *NotI* pour libérer des inserts flanqués à ses extrémités de sites *NotI*. Ces inserts pourront ensuite être ligués avec le plasmide pFL61 également digéré par *NotI*. Afin d'augmenter l'efficacité de ligation une étape de déphosphorylation du plasmide pFL61 est cependant nécessaire pour empêcher ce dernier de se religuer sur lui-même. La cassette de clonage est entourée par les sites reconnus par les amorces L2 et R2. Afin que les gènes d'intérêts soient effectivement exprimés dans *S. cerevisiae*, il faut que l'insert soit orienté dans le bon sens. Ceci sera confirmé par PCR : le bon sens d'insertion devant donner une amplification d'un fragment d'ADN de longueur recherchée en utilisant le couple d'amorces **L2/amorce antisens du gène d'intérêt** ou le couple **amorce sens du gène d'intérêt/R2**. Ces combinaisons permettent ainsi de vérifier que le fragment d'ADN cloné dans ce vecteur a été ligué dans le bon sens. Ce plasmide a été utilisé pour exprimer les différents gènes d'intérêt dans la levure.

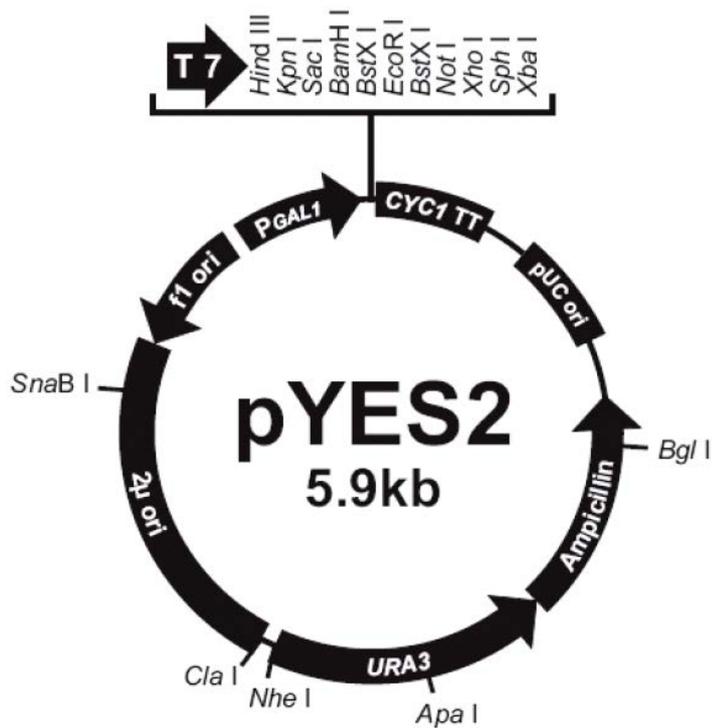


Figure 56 : Vecteur d'expression pYES2 : Ce plasmide possède le gène de résistance bactérien à l'ampicilline ainsi que le gène URA3 permettant de compléter les souches de levure auxotrophe à l'uracile. Le site multiple de clonage est situé en aval du promoteur de la galactosidase de *S. cerevisiae* afin de stimuler l'expression des gènes d'intérêt par l'ajout galactose.

2.1.2.3 LES PLASMIDES PYES2 ET PYES2GFP

Le plasmide pYES2 (5,9 kb) (Invitrogen) (Fig.56) est également un vecteur navette. Il permet l'expression des gènes d'intérêt dans *Saccharomyces cerevisiae*. Il possède un site de clonage multiple situé en aval du promoteur GAL1 inductible par le galactose permettant le contrôle de l'expression des gènes d'intérêt. Il possède par ailleurs un signal de terminaison de transcription CYC1 permettant la stabilisation des ARNm. Ce plasmide contient le gène AmpR permettant la résistance à l'ampicilline dans *E. coli* et le gène URA3 qui permettra la sélection des levures transformées. Il contient plusieurs origines de répllication pour maintenir un haut nombre de copies dans différents types d'organismes. pUC ori est l'origine de la répllication bactérienne tandis que l'origine de répllication 2 μ permet la multiplication du plasmide dans la levure. Le plasmide pYES2-GFP a été obtenu en intégrant la phase codante de la GFP au niveau du site *XbaI* du plasmide pYES2 (Blaudez et al, 2003).

Les gènes ont été insérés dans ces vecteurs en les amplifiant avec des amorces contenant les sites de restriction *HindIII* pour l'amorce sens et *BamHI* pour l'amorce antisens. Pour le clonage dans le plasmide pYES2-GFP le codon stop a été retiré du gène d'intérêt et l'amorce a été construite afin de conserver le même cadre de lecture entre les phases codantes des gènes d'intérêt et de la GFP.

Tableau 3 : Composition du milieu de sporulation

Composé	Quantité (pour 1 L)
Glucose	10 g
Extrait de malt	10 g
Peptone	2 g
Extrait de levure	2 g
Asparagine	1 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g
Chlorhydrate de thiamine	1 mg
Agar	20 g

Tableau 4 : Composition de la solution d'éléments traces

Composé	Quantité (pour 1 L)
Nitrilotriacétate (dilué dans 800 ml d'eau)	1,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	3 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂	0,1 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
CuCl ₂	0,1 g
AlK SO ₄ 12H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
NaMoO ₄ 2H ₂ O	10 mg

2.2 MÉTHODES

2.2.1 CONDITIONS DE CULTURE

2.2.1.1 PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM

2.2.1.1.1 Maintenance du mycélium

La souche de *Phanerochaete chrysosporium* RP78 est maintenue en boîte de Pétri sur un milieu de culture composé de malt (40g/l) et d'agar (30g/l), le pH étant ajusté à 4,8 à l'aide d'acide chlorhydrique. Ce milieu est ensuite stérilisé à l'autoclave pendant 20 min puis coulé stérilement dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont inoculées par l'ajout d'un explant issu de cultures mères de mycélium et ensuite incubées à 20°C.

2.2.1.1.2 Milieu de sporulation

La production de spores est réalisée en prélevant des explants qui seront mis en culture sur un milieu de sporulation dont la composition est donnée dans le tableau 3. Afin d'ensemencer le milieu de production des LiPs les spores sont récupérées et séparées du mycélium sur filtre Miracloth (Calbiochem).

2.2.1.1.1 Milieu de culture

Le milieu de culture pour la production des lignines peroxydases est un milieu de culture liquide et dérive du milieu Tien and Kirk (Tien & Kirk, 1988). Ce milieu de culture peut être carencé en manganèse rendant ainsi la superoxyde dismutase inactive (Rothschild et al, 1999). Le milieu de culture est composé d'une solution d'éléments traces (Tableau 4), d'un milieu de base (Tableau 5) et d'autres composés qui peuvent être préparés sous la forme de solutions mères (Tableau 6). Dans ce dernier tableau les solutions écrites en gras sont stérilisées par autoclavage, celles en italique doivent être filtrées (filtre millipore MILLEX 0,22µm).

Tableau 5 : Composition du milieu de base

Composé	Quantité (pour 1L)
KH ₂ PO ₄	20 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	5 g
CaCl ₂	1 g
Solution d'éléments traces	100 ml

Tableau 6 : Composition du milieu de culture (pour 1l)

Composé	Quantité
Glucose 10% (M/V)	100 ml
Tampon acétate de sodium 50mM pH4,5 (acide acétique)	100 ml
Tartrate d'ammonium 100mM	24 ml
Tween 20 à 1%	50 ml
Eau stérile	356 ml
<i>Milieu de base</i>	100 ml
<i>Thiamine (5mg/50ml)</i>	10 ml
<i>Alcool veratryl 4mM</i>	100 ml
<i>Solution d'éléments traces</i>	60 ml
<i>Spores à une DO₆₅₀=0,5 soit 2,5.10⁶Cellule/ml</i>	100 ml

Tableau 7 : Composition du milieu LB et LB-Amp

Composé	Concentration finale dans le milieu
Bacto-Tryptone	20 g.l ⁻¹
Extrait de levure	10 g.l ⁻¹
Glucose	20 g.l ⁻¹
Agar	20 g.l ⁻¹
Autoclavage	20 minutes à 120°C
Ampicilline	Rien ou 100 µg/ml

La solution de spores est obtenue à partir de cultures sur milieu de sporulation. La culture est reprise dans de l'eau stérile et passée sur filtre Miracloth. La solution de spores est diluée afin d'obtenir une densité optique de 0,5 à 650 nm. La culture se fait sous agitation à 170 rotations par minute et à une température de 37°C. Un volume total de 100 ml est utilisé par Erlenmeyer de 250 ml. Des témoins avec manganèse peuvent être réalisés en ajoutant 1ml d'une solution de chlorure de manganèse (222.5 mg/50 mL) pour 100ml de culture (concentration finale d'environ 225 µM de Mn).

2.2.1.2 E. COLI

Le milieu de culture pour la croissance de la souche DH5α est le milieu Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al, 1989) (Tableau 9). Les transformants obtenus après choc thermique sont sélectionnés sur milieu LB additionné d'ampicilline (LB-Amp) (Tableau 9). L'ampicilline est un agent bactériostatique servant de marqueur de sélection et permettant la croissance des cellules d'*E. coli* qui ont été transformées par nos plasmides. Les transformants seront ensuite repiqués sur LBamp afin de conserver la pression de sélection. Les clones peuvent être conservés dans du glycérol à 20%, stockés à -80°C. Des cultures liquides seront réalisées afin de produire les plasmides.

Tableau 8 : Composition du milieu YPD.

Composé	Concentration finale dans le milieu
Yeast extract	20 g.l ⁻¹
Peptone	10 g.l ⁻¹
Glucose	20 g.l ⁻¹
Agar (si milieu solide)	20 g.l ⁻¹
Autoclavage	20 minutes à 120°C

Tableau 9 : Composition du milieu SD-URA.

Composé	Concentration finale dans le milieu
YNB (Yeast Nitrogen base) sans acide aminés et sans NH ₄ ⁺	1,7 g.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g.l ⁻¹
Synthetic Drop-out without uracile (Sigma)	1,98 g.l ⁻¹
Source de carbone (glucose ou galactose)	20 g.l ⁻¹
Agar (si milieu solide)	20 g.l ⁻¹
Autoclavage	20 minutes à 120°C

2.2.1.3 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Les souches mutantes de *S. cerevisiae* doivent être cultivées sur milieu complet du fait de leurs auxotrophies, elles sont donc repiquées sur milieu YPD-Agar (Tableau 8).

Après transformation, les levures seront cultivées sur un milieu synthétique dépourvu d'uracile et nommé SD-URA. Le pH de ce milieu est ajusté à 5,8 avant d'ajouter l'agar et d'être autoclavé (Tableau 9). Les clones obtenus pourront croître sur ce milieu car l'uracile pourra être synthétisé grâce à l'expression du gène URA3 porté par le plasmide. En fonction de la sensibilité des mutants le milieu pourra être additionné de métaux et/ou d'un autre agent de sélection, afin de vérifier si nos gènes d'intérêt confèrent une résistance. Le glucose pourra être remplacé par du galactose dans le cas de transformation par le plasmide pYES2 afin d'activer la transcription des gènes d'intérêt qui sont régulés par le promoteur pGAL1. Il est à noter qu'un milieu spécial basé sur du YNB sans phosphate (Qbiogene) a été utilisé lors de l'étude des transporteurs dans la souche *pho84Δ*.

2.2.2 MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.2.2.1 EXTRACTION D'ACIDES NUCLÉIQUES

2.2.2.1.1 Extraction d'ARN totaux

Des pelotons du champignon issus de cultures liquides sont récupérés et congelés immédiatement en utilisant de l'azote liquide. L'extraction des ARN de mycélium est réalisée à l'aide du kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen) à partir d'environ 100 mg de mycélium. Le mycélium est broyé à l'aide d'un broyeur à billes (MM Retsch 300, Qiagen), puis l'extraction est faite selon le protocole standard en prenant soin d'utiliser du tampon RLC, contenant du chlorure de guanidine, conformément aux recommandations du fournisseur. De plus 20 mg.ml⁻¹ de polyéthylène glycol (PEG 6000) sont ajoutés et mis à fondre dans le tampon RLC avant l'ajout de β-mercaptoethanol afin de précipiter les composés phénoliques et les polysaccharides (Gehrig et al, 2000).

Afin de s'assurer de ne pas avoir de contamination par de l'ADN génomique à l'issue de cette phase d'extraction, une étape de digestion de l'ADN contaminant par la DNase I (Rnase free) (Qiagen) est incorporée dans les étapes de purification conformément aux recommandations du fournisseur. Les ARNs obtenus sont repris dans 40 µl d'eau RNase free. La concentration en ARN est estimée par spectrophotométrie (Bio Photometer, Eppendorf), une unité de DO à 260 nm correspondant à 40µg/ml d'ARN. Le risque de contamination par d'autres composés pourra être déterminé à l'aide du rapport DO_{260/280nm} qui permet d'estimer s'il y a contamination par des protéines. Idéalement le rapport devra être compris en 1,8 et 2, une valeur inférieure à 1,7 indiquant une contamination. De même, le rapport DO_{260/230nm} permet d'estimer s'il y a contamination par des composants organiques ou des sels chaotropiques. Les ARNs seront ensuite congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C.

La qualité des ARNs est également vérifiée sur gel d'agarose à 1%. Les ARNs ribosomiques (ARNr) représentent environ 80% des ARNs totaux et en effectuant un dépôt de 1µg d'ARN les ARNr 28S et 18S apparaissent comme deux bandes intenses. Comme gage de qualité des ARN extraits, la bande correspondant aux ARNr 28S doit être approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARNr 18S (Sambrook et al, 1989), tout en notant l'absence de dégradation (smear) de ceux-ci.

2.2.2.1.2 Extraction d'ADN génomique

2.2.2.1.2.1 Extraction d'ADN génomique via un kit commercial

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit « DNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen) à partir de 200 mg de tissu préalablement congelé et lyophilisé puis broyé à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch MM 300). La qualité est contrôlée sur gel d'agarose à 1% où l'ADN génomique doit apparaître sous forme d'une bande large, de taille comprise entre 20 et 25 kb.

2.2.2.1.2.2 Extraction d'ADN génomique par la méthode CTAB

Du mycélium préalablement congelé et lyophilisé est broyé à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch MM 300). 650µl de solution contenant du CTAB sont ajoutés ainsi que 10µl de protéinase K (20mg/ml). Le mélange est mis à incuber pendant 45 minutes à 65°C. Un volume de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25/24/1, V/V/V) est ajouté avant centrifugation à 14 000 rpm pendant 15 minutes. La phase supérieure est reprise dans un nouveau tube Eppendorf et 1µl de Rnase A (40µl/ml) est ajouté. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Une extraction au phénol-chloroforme est ensuite effectuée et la phase supérieure est reprise dans 2 fois son volume d'éthanol à 95% préalablement refroidi à -20°C. De l'acétate de sodium (3M, pH 5.2) est ajouté, à raison d'un dixième du volume du mélange, avant de le placer à -20°C pendant une nuit. Le lendemain une centrifugation (14 000 rpm pendant 20 minutes) est effectuée afin de culotter les acides nucléiques. Le surnageant est éliminé et 500µl d'éthanol à 70% sont ajoutés afin d'éliminer les derniers contaminants. Après une centrifugation de 5 minutes à 14 000 rpm le surnageant est éliminé et le culot d'acides nucléiques est mis à sécher, pour éliminer toute trace d'éthanol. 50µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6-8) est ajouté pour remettre en suspension et conserver l'ADN.

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1330, A1340, A1460, A1465 AND A1470.

Quick
PROTOCOL

Centrifugation Protocol

Production of Cleared Lysate

1. Pellet 1–10ml of overnight culture for 5 minutes.
2. Thoroughly resuspend pellet with 250µl of Cell Resuspension Solution.
3. Add 250µl of Cell Lysis Solution to each sample; invert 4 times to mix.
4. Add 10µl of Alkaline Protease Solution; invert 4 times to mix. Incubate 5 minutes at room temperature.
5. Add 350µl of Neutralization Solution; invert 4 times to mix.
6. Centrifuge at top speed for 10 minutes at room temperature.

Binding of Plasmid DNA

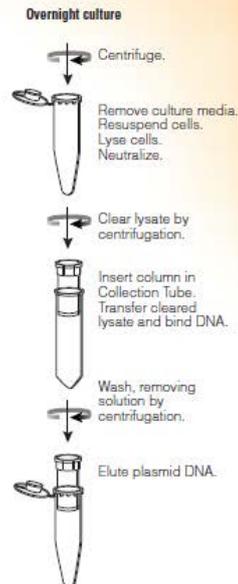
7. Insert Spin Column into Collection Tube.
8. Decant cleared lysate into Spin Column.
9. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature. Discard flowthrough, and reinsert Column into Collection Tube.

Washing

10. Add 750µl of Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at top speed for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert column into Collection Tube.
11. Repeat Step 10 with 250µl of Wash Solution.
12. Centrifuge at top speed for 2 minutes at room temperature.

Elution

13. Transfer Spin Column to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube, being careful not to transfer any of the Column Wash Solution with the Spin Column. If the Spin Column has Column Wash Solution associated with it, centrifuge again for 1 minute at top speed, then transfer the Spin Column to a new, sterile 1.5ml microcentrifuge tube.
14. Add 100µl of Nuclease-Free Water to the Spin Column. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature.
15. Discard column, and store DNA at –20°C or below.



Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB225, available online at: www.promega.com



ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 • Fax 608-277-2601

©1999, 2001, 2002, 2005, 2009 Promega Corporation. All Rights Reserved.



Promega

Printed in USA. Revised 12/09
Part #9FB004

Figure 57 : Protocole simplifié d'extraction d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne.

2.2.2.1.3 Extraction d'ADN plasmidique

Une colonie bactérienne est mise en culture pendant une nuit à 37°C et sous agitation dans 10 ml de LBamp. Le lendemain elle est centrifugée à 4000 rpm pendant 5 minutes. L'ADN plasmidique est ensuite extrait et purifié à l'aide du kit Wizard® + SV Minipreps (Promega) suivant le protocole décrit par le fournisseur (Fig.57). Puis les plasmides sont élués avec 100 µL d'eau dépourvue de DNase. La concentration des ADN est mesurée par spectrophotométrie et donne généralement un rendement supérieur à 500 ng µl⁻¹. Une unité de DO à 260 nm correspond à 50µg.mL⁻¹ d'ADN. La qualité de l'extraction est estimée à l'aide du rapport DO_{260/280nm}. L'extrait plasmidique peut ensuite être conservé à -20°C.

2.2.2.2 SÉPARATION D'ADN PAR ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE

La séparation d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose a été utilisée lors de différentes expériences, que ce soit lors de la purification d'ADN, de dépôts de produits de digestion, ou pour les expériences de RT-PCR.

Un gel d'agarose contient typiquement 1 g d'agarose pour 100 ml de solution TBE. Selon la taille de l'ADN à visualiser cette concentration peut varier à la hausse, 2 g pour les petits fragments d'ADN, ou à la baisse, 0,8 g pour les plasmides faisant plus de 5 kb. L'agarose est dissout par chauffage dans le tampon TBE. Après avoir légèrement refroidi le mélange, du BET (stock à 10 mg/ml) est ajouté à raison de 2 µl/100 ml de solution d'agarose. De la solution de dépôt (Euromedex) est ajoutée aux produits de PCR. La migration s'effectue dans une cuve d'électrophorèse horizontale (Sub-Cell GT, Biorad), à un voltage généralement compris entre 70 et 90 V.

Après migration l'ADN est visualisé grâce à un transilluminateur ou à l'aide d'un Gel Doc XR (Biorad), ce dernier permettant la quantification de l'intensité des bandes d'ADN via le logiciel Quantity One (Biorad). Dans le cas d'un clonage les bandes d'intérêts peuvent être découpées et récupérées dans un tube Eppendorf pour être ensuite purifiées.

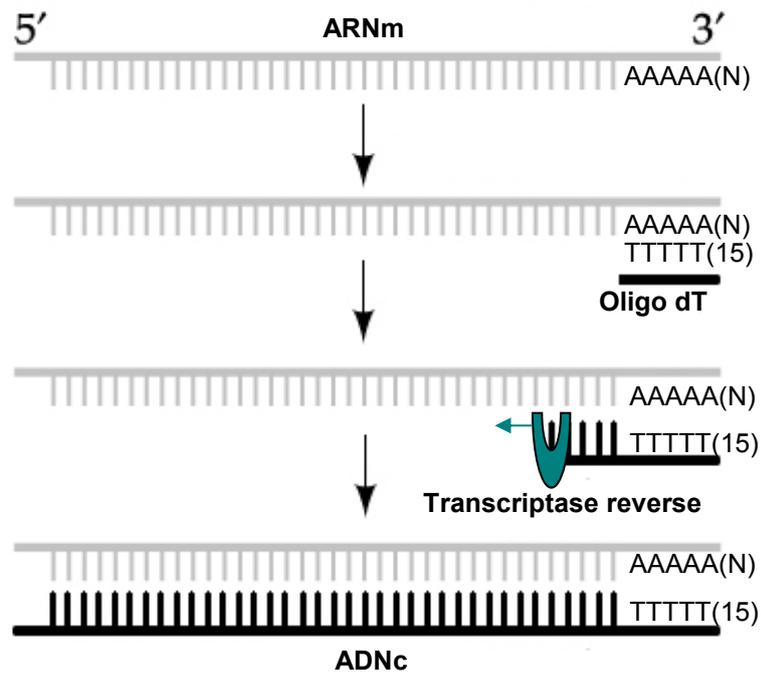


Figure 58 : Principe de la réverse transcription. La queue polyA de l'ARNm est utilisée comme site de fixation d'une amorce polyT qui permettra à la réverse transcriptase de former un brin d'ADN complémentaire au brin d'ARN.

2.2.2.3 PURIFICATION D'ADN À PARTIR D'UN GEL D'AGAROSE

Après séparation sur gel d'agarose les ADNc amplifiés peuvent être purifiés sur colonne en utilisant le kit GENE CLEAN[®] Turbo. Selon les recommandations du fournisseur les bandes d'agarose contenant l'ADN d'intérêt sont coupées et placées dans un tube Eppendorf avec 100 µl de tampon (Turbo Salt Solution) pour 100 mg de gel. Le mélange est incubé à 55°C pendant 5 minutes puis déposé sur colonne (Turbo Cartridge) et centrifugé à 14 000 rpm pendant 30 secondes. L'éluat est jeté et 500 µl de solution de lavage (Turbo Wash) sont ajoutés sur la colonne avant de répéter l'étape de centrifugation. Afin d'éluer les ADNc 40 µl d'eau DNase free sont ajoutés sur la colonne et incubés 5 minutes à température ambiante. Une dernière étape de centrifugation permet de récupérer les bandes d'intérêt.

2.2.2.4 TRANSCRIPTION RÉVERSE

Cette méthode permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARN totaux. La reverse transcriptase est une ADN polymérase ARN dépendante, afin d'amplifier les ARNm des amorces oligo dT seront ajoutées au mélange réactionnel (Fig.58). Les ARN messagers sont convertis en ADNc en utilisant le kit Masterscript[™] (5PRIME) selon les instructions du fournisseur. Pour les analyses de RT-PCR, 1 µg d'ARN totaux sont utilisés par essai de rétro-transcription. La réaction débute par la dénaturation de 1 µg d'ARN en les incubant avec le mix de dNTP et les oligo dT pendant 5 minutes à 65°C. Le mélange est ensuite rapidement refroidi pour éviter la reformation de structures secondaires. A ce moment un deuxième mix est ajouté contenant de la reverse transcriptase, le tampon adapté à la réaction et un inhibiteur de RNase. La synthèse des brins d'ADN complémentaires se déroule à 42°C pendant 1h30 et est arrêtée par chauffage de l'échantillon à 85°C pendant 5 min. Les ADNc sont ensuite refroidis et stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

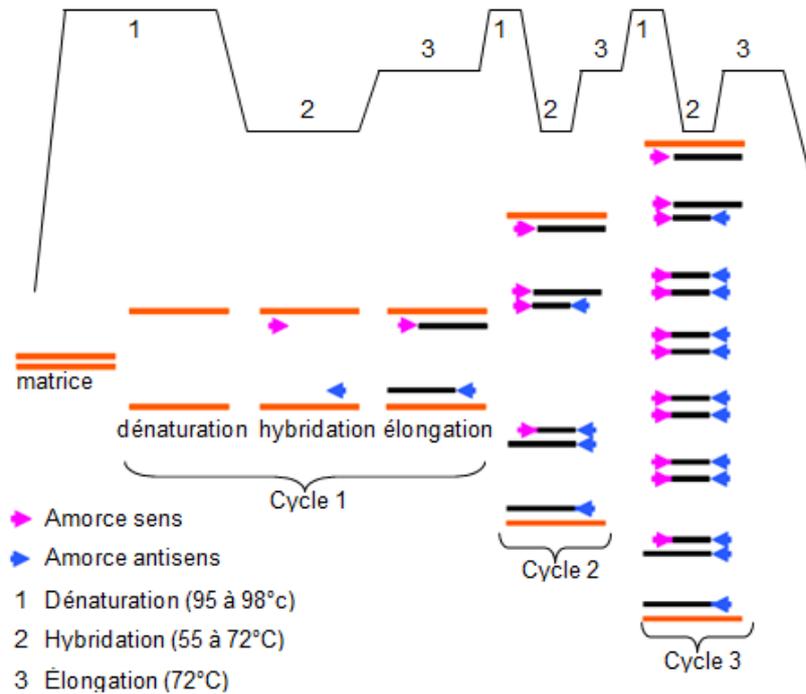


Figure 59 : Principe de la PCR : Elle permet l'amplification en plusieurs cycles des gènes d'intérêt grâce aux amorces préalablement définies. Chaque cycle est composé de trois étapes, la première correspondant à la dénaturation initiale des brins d'ADN ce qui permettra de déshybrider les doubles brins d'ADN. L'étape suivante permettra l'hybridation spécifique des amorces en sélectionnant une température thermodynamiquement favorable. Après hybridation de l'amorce une troisième étape à 72°C va permettre l'élongation à partir des amorces des brins complémentaires aux ADN matrices grâce à une polymérase.

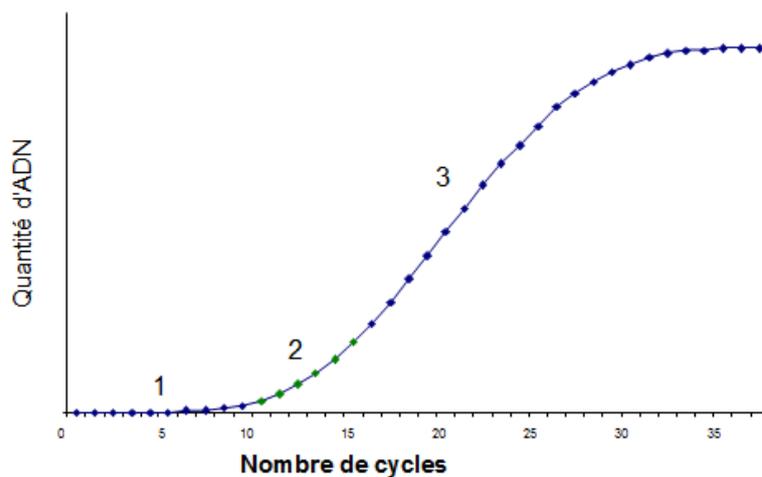


Figure 60 : Le nombre de cycles devra être déterminée, afin que la quantité d'ADN soit suffisante (2). Dans le cas contraire elle pourrait être trop faible (1) ou être saturante par rapport à la capacité de la polymérase ajoutée dans le milieu mais également pour l'appareil en charge de la quantification (3).

2.2.2.5 AMPLIFICATION PAR PCR

2.2.2.5.1 PCR classique

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est une technique enzymatique, développée dans les années 1980 (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al, 1985), qui permet de sélectionner et d'amplifier une séquence d'ADN spécifique *in vitro* à l'aide d'une ADN polymérase ADN dépendante thermostable. Classiquement une réaction se fait dans un volume réactionnel final de 25 µl. Cette réaction est basée sur la répétition cyclique de 3 étapes (Fig.59). La réaction est initiée par une dénaturation initiale à 95°C durant 1 minute suivie d'un nombre variable de cycles:

- de dénaturation de l'ADN matrice par la chaleur, généralement à 95°C pendant 30 secondes,
- d'hybridation d'un couple d'amorces (oligonucléotides) spécifiques sens et antisens à une température généralement comprise entre 55 et 72°C pendant 30 secondes,
- d'élongation des amorces par l'ADN polymérase dans le sens 5'-3' à 72°C. Le temps d'élongation dépend de la longueur de l'ADN à amplifier et est généralement de 1 min/kb.

2.2.2.5.2 Mesure du taux de transcrits par RT-PCR

Pour la RT-PCR 0,5 µl d'ADNc matrice est utilisée pour la réaction de PCR. Le nombre de cycles de PCR a été optimisé pour chaque gène (Annexe 1) afin d'être dans les conditions permettant de quantifier les ADNc obtenus et d'établir s'il y a une différence au niveau de l'expression des gènes. Il faut ainsi se situer en début de phase exponentielle car avant celle-ci le bruit de fond sera trop important pour pouvoir quantifier les ADNc et après, la polymérase pourrait devenir un facteur limitant (Fig.60). Deux contrôles internes ont été utilisés, à savoir un couple d'amorces s'hybridant sur l'ADNc d'un gène codant pour l'actine ainsi qu'un couple amplifiant l'ADNc de la glycéraldéhyde 3'phosphate déshydrogénase (GPD). Les résultats sont quantifiés et rapportés au taux d'expression du gène de l'actine, des résultats similaires sont obtenus en rapportant le taux d'expression de ces gènes sur celui de la GPD.

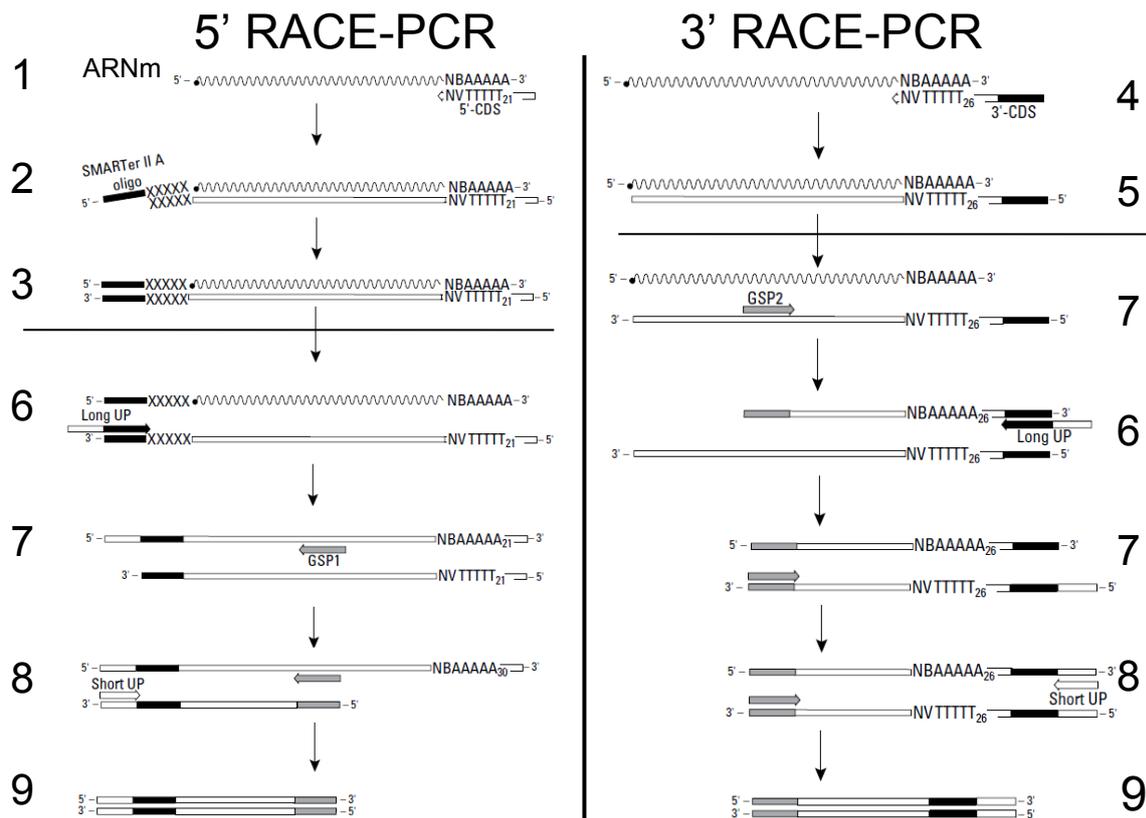


Figure 61 : Principe de la RACE-PCR sur des ARNm

Les premières étapes diffèrent en fonction de l'extrémité de l'ARNm à amplifier :

- 5' RACE-PCR : La première étape consiste en la transcription inverse à l'aide d'oligo dT (1) avec ajout de nucléotides (poly dC) au niveau de l'extrémité 3' néoformée par une activité terminale transférase. Cette séquence permet l'hybridation d'un oligonucléotide : le SMARTer II A (2) ce qui permettra, via une activité DNA polymérase DNA dépendante, d'amplifier la séquence complémentaire à l'oligo SMARTer II A (3). Ce mix est prêt à l'emploi et peut être stocké à -20°C.
- 3' RACE-PCR : La première étape consiste en la transcription inverse à l'aide d'une amorce contenant une séquence qui servira de matrice à l'amorce antisens. Cette dernière contient une séquence polyT qui permettra l'accroche sur la queue polyA des ARNm (1). La reverse transcriptase servira à produire le brin complémentaire à l'ARNm (5). Ce mix est prêt à l'emploi et peut être stocké à -20°C.

Les étapes d'amplification sont basées sur le même principe à savoir : une PCR avec une amorce interne du gène (nommé GSP1 et GSP2 sur le schéma) (7) et un mélange d'oligonucléotides complémentaires à la séquence SMART afin d'obtenir un ADNc double-brin. Le mélange d'oligonucléotides contient deux amorces : la Long UP (Universal Primer) (6) et, en quantité plus importante (×5) la Short UP (8) afin de permettre un enrichissement plus important de l'ADN cible, la Short UP ne se fixant pas sur les ADNc matrices de début de réaction.

2.2.2.5.3 PCR sur colonie

C'est une technique qui permet d'amplifier de façon simple de l'ADN (génomique ou plasmidique) de microorganismes en inoculant le milieu réactionnel de la PCR avec ces derniers. L'étape de dénaturation initiale est généralement allongée, ainsi elle sera de 5 minutes au lieu de 1 minute pour une PCR classique.

Afin de vérifier si les transformants contiennent bien la construction plasmidique qui nous intéresse, une colonie est piquée avec un cône de pipette et mis dans 10 µl d'eau. 5 µl sont repris sur LBamp afin de conserver la colonie, les 5 µl restants servent de matrice pour la PCR colonie.

2.2.2.5.4 PCR haute-fidélité

Le fonctionnement de la PCR haute-fidélité est identique à la technique de PCR classique cependant la polymérase utilisée devra être plus fidèle. Cette fidélité passe par une activité correctrice (3'→5' exonucléase). Cette propriété rend ces enzymes généralement plus lentes (2 min/kb). Dans le cadre de cette étude plusieurs polymérases ont été utilisées Pfu (Promega), Herculase® II (Agilent), Advantage® 2 (Clontech), Phusion® (Finzymes). Seule la Phusion DNA polymérase sera décrite, la majorité des clonages ayant été réalisée avec cette enzyme, celle-ci présentant certains avantages. Cette enzyme est effectivement plus stable à haute température ce qui permet de réduire l'étape de dénaturation, à 10 secondes à 98°C au lieu de 30 secondes à 95°C pour la plupart des autres enzymes. La Phusion a été modifiée par ajout d'un domaine de liaison à l'ADN, permettant d'augmenter la processivité de l'enzyme. La vitesse d'élongation passe de 15 à 30 s/kb rendant cette enzyme particulièrement intéressante pour l'amplification d'ADNc pleine longueur.

2.2.2.5.5 RACE-PCR

La race-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) est une réaction qui permet d'amplifier les extrémités des ARNs et ceci sans nécessité de connaître la séquence complète des gènes. Cette technique permettra donc de vérifier, à l'aide d'amorces internes aux gènes d'intérêt, la position de la méthionine d'initiation et/ou la position du codon stop (Fig.61) en amplifiant les

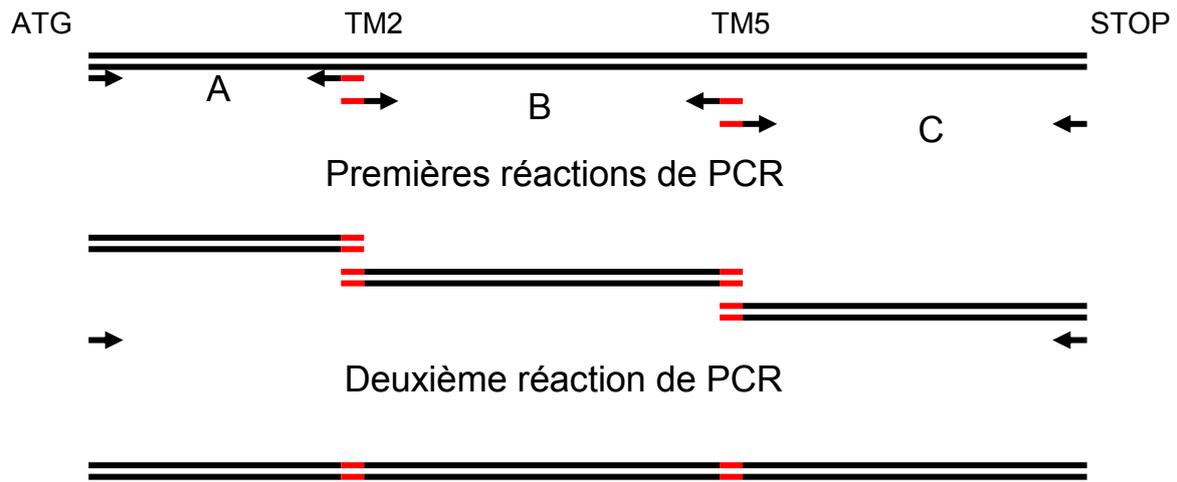


Figure 62 : Principe de la mutagenèse dirigé par la technique SOE PCR. Une première étape consiste à amplifier de manière séparée des brins d'ADN contenant la ou les mutations à insérer. Dans le cas de la mutation du gène MnT des modifications ont été apportées au niveau des domaines transmembranaires 2 et 5 (TM2 et TM5) nécessitant 3 réactions de PCR afin de générer un fragment bordé par la méthionine d'initiation (ATG) et le domaine TM2 (A), un fragment bordé par les domaines TM2 et TM5 (B) et un fragment bordé par le domaine TM5 et le codon STOP (C). Les fragments servent ensuite de matrice pour une réaction PCR capable de régénérer un brin d'ADN complet portant les mutations souhaitées.

régions 5' et 3'UTR (Untranslated Region). Le kit SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) a été utilisé dans cette étude selon le protocole recommandé par le fournisseur pour l'amplification de séquences d'ARNm. Un mélange d'ARNs extraits à partir de cultures mises en conditions de carence en manganèse ou non a été utilisé comme matrice pour les réactions de réverse transcription.

2.2.2.5.6 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée permet de muter une séquence d'ADN à un endroit précis. Elle permet de mettre en évidence l'importance d'un ou de plusieurs acides aminés essentiels pour la fonction d'une protéine donnée. La technique utilisée est basée sur la technique dite de « Splicing by Overlap Extension PCR (SOE PCR) » qui permet de fusionner des fragments d'ADN, ces derniers s'hybridant entre eux grâce à des séquences complémentaires. Une première série de PCR est réalisée sur le fragment à modifier en utilisant des oligonucléotides mutés (Fig.62). Les fragments obtenus sont ensuite liés entre eux à l'aide de leurs séquences chevauchantes et amplifiés à l'aide des amorces ATG/STOP. Les amorces utilisées sont répertoriées en annexe 1.

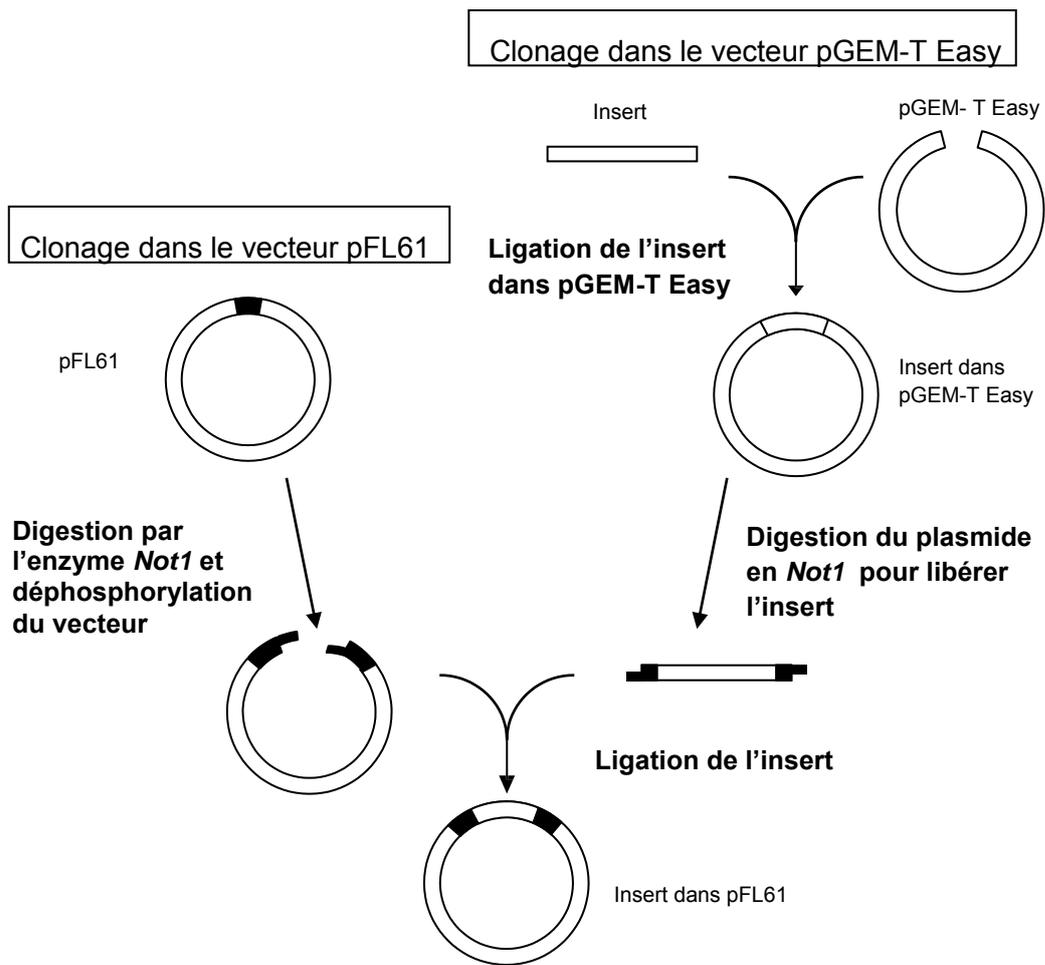


Figure 63 : Principe du clonage d'un insert dans le plasmide pGEM-T Easy et sous clonage dans le vecteur pFL61.

2.2.2.6 TECHNIQUES DE CLONAGE

2.2.2.6.1 Clonage dans le plasmide pGEM®-T Easy.

Les fragments de PCR sont clonés dans le pGEM-T Easy après ajout d'une déoxyadénosine 5' sortante (si la polymérase ne la génère pas) et purification sur colonne. Les fragments amplifiés sont insérés dans le pGEM®-T Easy par une étape de ligation, qui consiste en la formation *in vitro* de nouvelles liaisons phosphodiester entre les extrémités 5' et 3' des fragments d'ADN et du plasmide. La quantité d'insert à utiliser par rapport au plasmide est généralement plus élevée, avec un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3 pour 1. La quantité d'insert à utiliser lors de cette étape est donnée par la formule :

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

Le mélange de ligation peut contenir jusqu'à 7 µL du produit de PCR, complétés avec 1 µL de tampon de ligation 10x, 1 µL du vecteur pGEM-T Easy et 1 µL de T4 DNA ligase. Pour un rendement optimal il est incubé durant une nuit à 4°C mais 2 heures à température ambiante.

2.2.2.6.2 Clonage dans le plasmide pFL61

2.2.2.6.2.1 Préparation du vecteur

1 µg de plasmide pFL61 est digéré en utilisant l'enzyme de restriction *NotI* (Promega) dans un volume final de 20 µl contenant 2 µl de tampon de restriction, 2 µl de BSA et 1 µl d'enzyme de restriction. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures. Le plasmide ainsi ouvert sera ensuite déphosphorylé à l'aide d'une phosphatase alcaline (Calf Intestine alkaline Phosphatase (Promega)) à 37°C pendant 3 heures afin d'empêcher une possible ligation sur lui-même. Il sera ensuite purifié sur colonne et repris dans de l'eau stérile.

2.2.2.6.2.2 Préparation de l'insert

1 à 4 µg de plasmide pGEM[®]-T Easy portant les fragments d'ADNc d'intérêt sont digérés par l'enzyme de restriction *NotI* pendant 2 heures et déposés sur gel d'agarose. La bande correspondant à l'insert est récupérée et purifiée sur colonne.

2.2.2.6.2.3 Ligation

La ligation dans le vecteur pFL61 se fait à 4°C durant une nuit dans un volume final de 10 µl contenant 20 à 50 ng de vecteur, le fragment à cloner (dans un ratio molaire de 3/1), 1 µl de T4 DNA ligase et 1 µl du tampon de réaction préconisé par le fournisseur (Promega).

2.2.2.6.3 Clonage dans les plasmides pYES2 et pYES2-GFP

1 à 4 µg de plasmide pGEM[®]-T Easy portant les fragments d'ADNc d'intérêt sont digérés par les enzymes de restriction (*HindIII* et *BamHI* dans la majorité des cas) pendant 2 heures. Le plasmide pYES2 est également digéré par les mêmes enzymes. Le produit des deux réactions est déposé sur gel et purifié sur colonne. La ligation dans le vecteur pYES2 suit les mêmes conditions que celles utilisées pour le vecteur pFL61.

Tableau 10 : Composition des milieux SOB et SOC (pour 1l).

Composé	Quantité (SOB)	Quantité (SOC)
Bacto Tryptone	20 g	20 g
Yeast extract	5 g	5 g
NaCl	0,58 g	0,58 g
KCl	0,2 g	0,2 g
Autoclavage	20 minutes à 120°C	
Glucose 20% (M/V)	-	10 ml
Solution 1M MgCl ₂ , 1M MgSO ₄ (filtré)	10 ml	10 ml

Tableau 11 : Composition du milieu TB (pour 500 ml).

Composé	Quantité
HEPES	1,19 g
CaCl ₂	1,1 g
KCl	9,32 g
Ajuster le pH à 6,7 avec KOH	
MnCl ₂	5,44 g

2.2.2.7 TECHNIQUES DE TRANSFORMATION

2.2.2.7.1 Transformation de bactéries

2.2.2.7.1.1 Préparation de bactéries chimiocompétentes

La technique de transformation, dérivée d'une méthode mise au point par Inoué (Inoue et al, 1990) a nécessité quelques modifications. Les bactéries sont cultivées dans 100 ml de milieu SOB (Tableau X). Lorsque la DO_{600nm} est égale à 0,6, la culture est refroidie dans de la glace et centrifugée à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont reprises dans 80 ml de tampon de transformation glacé TB (Tableau 10) puis remises dans la glace avant une centrifugation identique à la précédente. Les ions Ca^{2+} neutralisent les charges négatives de la membrane bactérienne et du plasmide, favorisant son adhésion sur la membrane plasmalemmique. Le culot est repris dans 20 ml de TB et 1,5 ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO). Après une incubation de 10 minutes à 4°C, la préparation de bactéries compétentes est terminée. Des *aliquots* de 50 µl de la suspension bactérienne sont ensuite congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C.

2.2.2.7.1.2 Transformation de bactéries par choc thermique

Un *aliquot* de la préparation de bactéries chimiocompétentes est utilisé par transformation, il est mis à décongeler dans de la glace et 1 à 5 µL de la préparation de plasmides sont ensuite ajoutés. L'ensemble est incubé 30 minutes dans de la glace afin de stabiliser les mouvements moléculaires dans la membrane bactérienne et permettre la fixation des plasmides sur les membranes. Les cellules vont ensuite subir un choc thermique à 42°C pendant 1 minute, ce qui va permettre la formation de micropores permettant l'entrée du plasmide dans la cellule bactérienne. Les cellules sont alors incubées 2 minutes dans de la glace avant d'être additionnées de 400 µl de milieu SOC (tableau 11). Elles seront placées 1 heure à 37°C sous agitation, pour favoriser la régénération des membranes bactériennes ainsi que l'expression du gène de résistance à l'antibiotique qui permettra la sélection des transformants. Après cette étape de régénération, les bactéries sont étalées sur du milieu solide LBamp et incubées une nuit à 37°C. Les cellules ayant intégré le plasmide formeront alors des colonies.

Tableau 12 : Composition des solutions mères pour la transformation de levures.

Composé	Concentration
Solution TE 10X :	
Tris-HCl pH 7,5	100 mM
EDTA	10 mM
Solution AcLi 10X :	
Acétate de lithium pH 7,5	1 M
Solution PEG :	
Polyéthylèneglycol 4000	50%

Tableau 13 : Composition des milieux TE/AcLi et TE/AcLi/PEG (pour 100 ml).

Composé	TE/AcLi	TE/AcLi/PEG
Solution TE 10X	10 ml	10 ml
Solution AcLi 10X	10 ml	10 ml
Solution PEG	-	80 ml
H ₂ O	80 ml	-

Tableau 14 : Composition du milieu de transformation.

Composé	TE/AcLi
Cellules de levure compétentes	50 µl
ADN « carrier »	5 µl
Plasmide	1 µg
TE/AcLi/PEG	300 µl

2.2.2.7.2 Transformation de levures

Les levures sont rendues compétentes par la technique de préparation à l'acétate de lithium (Ito et al, 1983) et sont immédiatement transformées (Gietz et al, 1992). Une culture de levure est inoculée dans 50 ml de milieu YPD et incubée à 30°C sous agitation à 150 rpm. Lorsque la DO_{600nm} atteint la valeur de 0,6, la culture est centrifugée pendant 10 minutes à 4 000 rpm. Les cellules sont lavées deux fois dans 1 ml d'eau stérile. Le culot de cellules sera repris dans 1 ml de la solution Tris EDTA/Acétate de lithium pH 7,5 (TE/AcLi) et lavé deux fois. Les cellules sont finalement reprises dans 500 µl de tampon TE/AcLi et peuvent être transformées par choc thermique.

Pour la transformation 50 µl de cellules compétentes sont mises en contact avec 5 µl d'ADN « carrier » (ADN de sperme de saumon soniqué à 10 mg/ml), 1 µg de plasmide et 300 µl d'une solution TE/AcLi/PEG (Tableaux 12, 13 et 14). Le mélange est incubé pendant 30 minutes sous agitation (150 rpm) à 30°C. Les cellules subissent ensuite un choc thermique de 15 minutes à 42°C, avant d'être centrifugées pour éliminer le PEG et sont remises en suspension dans 400 µl d'eau stérile. Elles sont alors étalées sur milieu SD-URA solide et incubées plusieurs jours à 30°C.

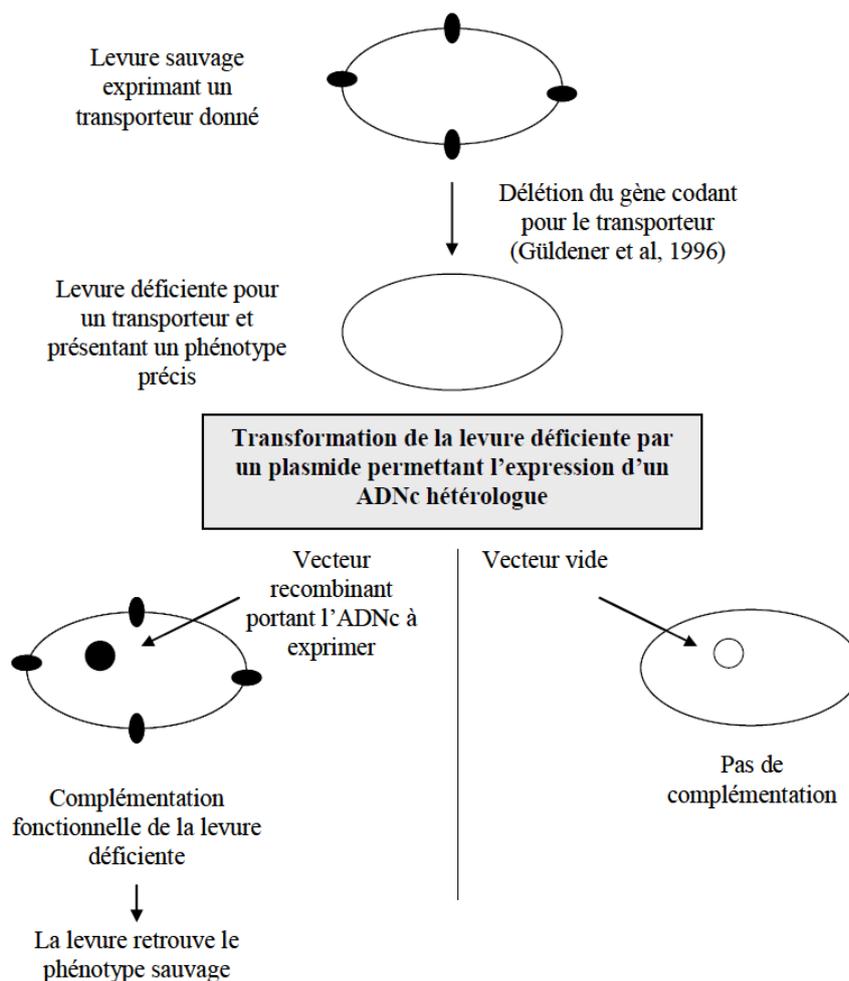


Figure 64 : Principe de la complémentation fonctionnelle de levures déficientes.

Tableau 15: Milieux utilisés pour la mise en évidence de la complémentation fonctionnelle en levure. Tous les milieux sont basés sur un milieu SD-URA sauf le milieu sans lysine.

Souche	Milieu de test / phénotype
BY4741	- / phenotype sauvage
<i>pmr1</i> Δ	0 à 50 mM Mn / sensibilité accrue
<i>ycf1</i> Δ	0 à 50 μ M Cd / sensibilité accrue
<i>yap1</i> Δ	0 à 50 μ M Cd / sensibilité accrue
<i>zrc1</i> Δ	0 à 20 mM Zn / sensibilité accrue
<i>cot1</i> Δ	0 à 2 mM Co / sensibilité accrue
<i>cup2</i> Δ	0 à 200 μ M Cu / sensibilité accrue
<i>ccc1</i> Δ	0 à 5.5 mM Fe / sensibilité accrue
<i>sod1</i> Δ	Milieu sans lysine / perte de croissance Paraquat / sensibilité accrue
<i>pho84</i> Δ	0 à 60 mM Mn / sensibilité diminuée 0 à 200 μ M Pi / croissance réduite

2.2.2.8 COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE EN LEVURE

Le principe de la complémentation fonctionnelle de levure déficiente par un plasmide permettant l'expression d'un ADNc hétérologue est décrite sur la figure 64. Les levures transformées par les différents gènes d'intérêt ont été cultivées pendant 3 à 5 jours sur des milieux permettant de mettre en évidence une complémentation fonctionnelle par le gène porté par le plasmide (Tableau 15). Sur chaque boîte, la souche sauvage BY4741 et la souche délétée, toutes deux transformées par le vecteur vide, sont utilisées comme témoins respectivement positif et négatif.

2.2.2.9 TECHNIQUES DE LOCALISATION SUBCELLULAIRE

Pour obtenir des informations concernant la localisation intra-cellulaire des transporteurs, les gènes sont clonés dans le vecteur pYES2 en fusion avec la GFP. La transformation est effectuée dans les souches délétées qui ont permis de mettre en évidence une complémentation fonctionnelle. Les transformants obtenus ont été testés sur SD-URA galactose, afin de s'assurer que la protéine de fusion ainsi obtenue est fonctionnelle. Des cellules de levure poussant dans du SD-URA galactose liquide sont déposées sur une lame de microscopie (lorsque la $DO_{600\text{ nm}}$ de la culture est comprise entre 0,6 et 1). Pour marquer certains organites, des fluorophores sont utilisés. Le composé CMAC-Arg (Molecular Probes) va pénétrer dans la vacuole et émettre une fluorescence au niveau du lumen de celle-ci. Le CMAC-Arg est ajouté à la solution de cellules à la concentration de 50 μ M pendant 5 minutes, les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du milieu SD-URA galactose (centrifugation à 4 000 rpm pendant 4 minutes) avant visualisation au microscope à fluorescence. Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Kapuscinski, 1995) est utilisé en tant que contre-marqueur pour identifier le noyau. Ce composé se fixe en effet au niveau de l'ADN. Le DAPI est ajouté à la solution de cellules à la concentration de 300 nM (solution stock diluée dans du PBS) pendant 20 secondes, les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du milieu SD-URA galactose (centrifugation à 4 000 rpm pendant 4 minutes) avant visualisation au microscope à fluorescence.

Pour la visualisation, la lame est montée sur un microscope droit Nikon Eclipse 200 (Nikon). La Green Fluorescence Protein (GFP) est excitée à l'aide d'un filtre transmettant de 465 à 495 nm et l'émission de la fluorescence GFP est recueillie après passage à travers un filtre laissant passer toutes les longueurs d'ondes comprises entre 510 et 555 nm. Pour la visualisation des organites marqués par le CMAC-Arg et le DAPI, l'excitation se fait par les UV (340 à 380 nm), la lumière recueillie étant comprise entre 435 et 485 nm.

Les images sont acquises et numérisées avec un appareil photo numérique (Nikon D80) fixé sur le microscope et piloté par le logiciel Nikon Capture Version 3.0.

2.2.2.10 MESURE DE L'ACTIVITÉ LIGNINE PEROXYDASE

L'activité peroxydase se mesure par l'oxydation de l'alcool veratryl en veratryl aldéhyde, ce dernier présente un pic d'absorbance à 310 nm et permet donc de suivre et de quantifier la réaction. Le milieu réactionnel est obtenu en prélevant du milieu de culture qui est ajouté à un mélange réactionnel dont la composition est donnée ci-dessous :

- 90 µl d'eau distillée
- 195 µl de tampon succinate 128mM pH 3
- 200 µl de milieu de culture
- 10 µl d'alcool veratryl 10mM

La réaction est amorcée par ajout de 5µl de peroxyde d'hydrogène 100Mm.

2.2.2.11 DOSAGE DE LA QUANTITÉ DE MÉTAUX PAR ICP-AES

L'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry) est une méthode basée sur un échange d'énergie entre un plasma d'argon avec les atomes présents dans la solution à analyser. En retournant à un état moins énergétique, ces atomes émettront des radiations dont les longueurs d'ondes sont caractéristiques de l'élément dosé. La spectrométrie d'émission plasma permet de doser la plupart des éléments à des concentrations de l'ordre de 1 µg/l, soit de l'ordre de la partie par milliard en masse. Les analyses en ICP-AES ont été réalisées par P. Richaud au CEA de Cadarache.

Pour être analysées, des cellules de levure cultivées en présence de métaux sont centrifugées à 4000 rpm pendant 5 min avant d'être lavées 3 fois avec une solution de lavage (10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 6,5), puis une fois à l'eau ultra pure. Les échantillons sont ensuite mis à sécher pendant 2 jours à 60 °C avant d'être minéralisés à l'aide d'acide nitrique et analysés par ICP-AES.

Tableau 16 : Classification des organismes étudiés.

Organisme	Division	Sous-Division	Classe	Ordre	Famille
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae
<i>Candida albicans</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomycota	Taphrinomycotina	Schizosaccharomycetes	Schizosaccharomycetales	Schizosaccharomycetaceae
<i>Aspergillus nidulans</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae
<i>Coccidioides immitis</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Euascomycetes	Onygenales	Onygenaceae
<i>Botrytis cinerea</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Leotiomycetes	Helotiales	Sclerotiniaceae
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae
<i>Magnaporthe grisea</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Sordariomycetes	<i>incertae sedis</i>	Magnaporthaceae
<i>Neurospora crassa</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Sordariomycetes	Sordariales	Sordariaceae
<i>Alternaria brassicicola</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Dothideomycetes	Dothideales	Mycosphaerellaceae
<i>Ustilago maydis</i>	Basidiomycota	Ustilagomycotina	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae
<i>Coprinus cinereus</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricoide
<i>Laccaria bicolor</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Hydnangiaceae
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Pleurotaceae
<i>Schizophyllum commune</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	Schizophyllaceae
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Basidiomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae
<i>Postia placenta</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Basidiomycetes	Polyporales	Fomitopsidaceae
<i>Heterobasidion annosum</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Basidiomycetes	Russulales	Bondarzewiaceae
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae
<i>Tremella mesenterica</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae
<i>Puccinia graminis</i>	Basidiomycota	Pucciniomycotina	Pucciniomycetes	Pucciniales	Pucciniaceae
<i>Melampsora laris-populina</i>	Basidiomycota	Pucciniomycotina	Pucciniomycetes	Uredinales	Melampsoraceae
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Basidiomycota	Pucciniomycotina	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae
<i>Rhizopus oryzae</i>	Zygomycota	Mucoromycotina	Mucoromycetes	Mucorales	Mucoraceae
<i>Batrachomyces dendrobatidis</i>	Chytridiomycota	Chytridiomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	-

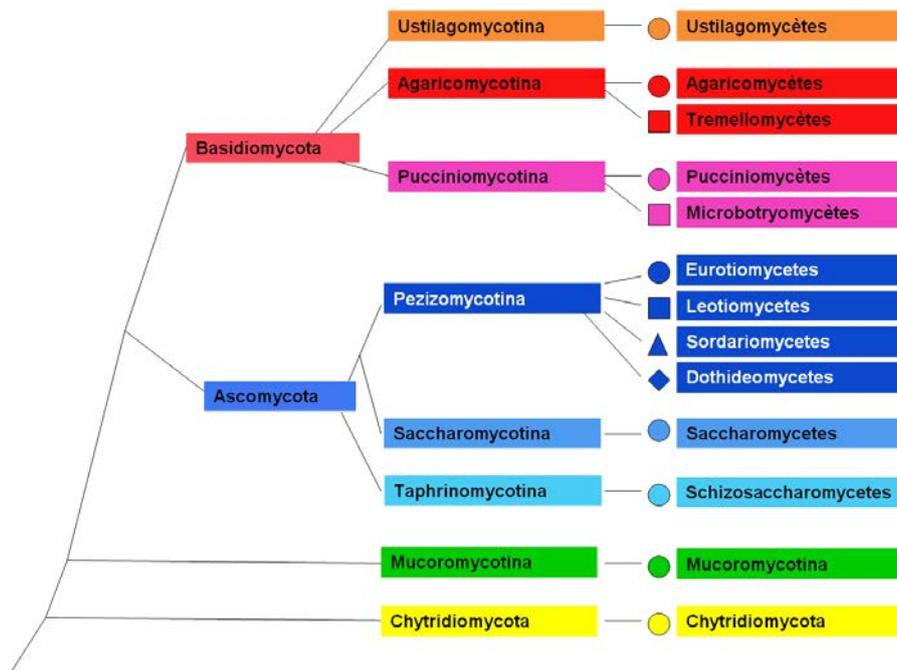


Figure 65 : Classification phylogénétique des organismes étudiés. Les sous-divisions et les classes sont différenciées respectivement par des couleurs et des formes différentes.

3 RÉSULTATS

Les résultats de cette étude sont divisés en différents chapitres correspondant aux différentes familles de transporteurs. Les chapitres présentent notamment une phylogénie des transporteurs de manganèse de différents organismes fongiques. 26 génomes représentant le règne fongique (Tableau 16) ont été utilisés pour générer les arbres phylogénétiques présents dans cette étude. Les informations concernant les séquences et les numéros d'accèsion ont été reportés en annexe 1. Des génomes supplémentaires ont également été étudiés afin de confirmer si l'absence de certains transporteurs pouvait être confirmée au niveau de l'ordre ou de la famille à laquelle appartiennent certains organismes. Le résultat de cette recherche a été exposé en fonction de la classification phylogénétique des organismes (James et al, 2006; Wang et al, 2009b). Les sous-divisions possèdent une couleur spécifique, les classes sont singularisées par une forme différente. Un arbre basé sur l'arbre présent sur le site du JGI (<http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>) et reprenant cette convention est présenté en figure 65.

L'expression des transporteurs de manganèse a été suivie en carence ou non en manganèse selon le mode de culture de Tien and Kirk (Tien & Kirk, 1988) en utilisant des cultures liquides sous agitation. Malheureusement, aucun changement important du niveau d'expression des transporteurs n'a été initialement observé. Nous avons donc choisi de partir de cultures carencées en manganèse et de n'ajouter ce dernier qu'après 4 jours, c'est-à-dire juste avant le début de la sécrétion des lignine-peroxydases. Des cultures avec ajout de KCl à la même concentration servent de témoin. L'activité LiP a été mesurée à différents temps et du mycélium a été récupéré afin de procéder à une extraction d'ARN. Nous pouvons observer sur la figure 66 que, malgré l'ajout plus tardif du manganèse, la sécrétion de LiPs est inhibée en sa présence.

Lorsque cela a été possible les transporteurs ont également été clonés afin d'être analysés par des techniques de complémentation fonctionnelle en système levure et de localisation à l'aide du système rapporteur GFP.

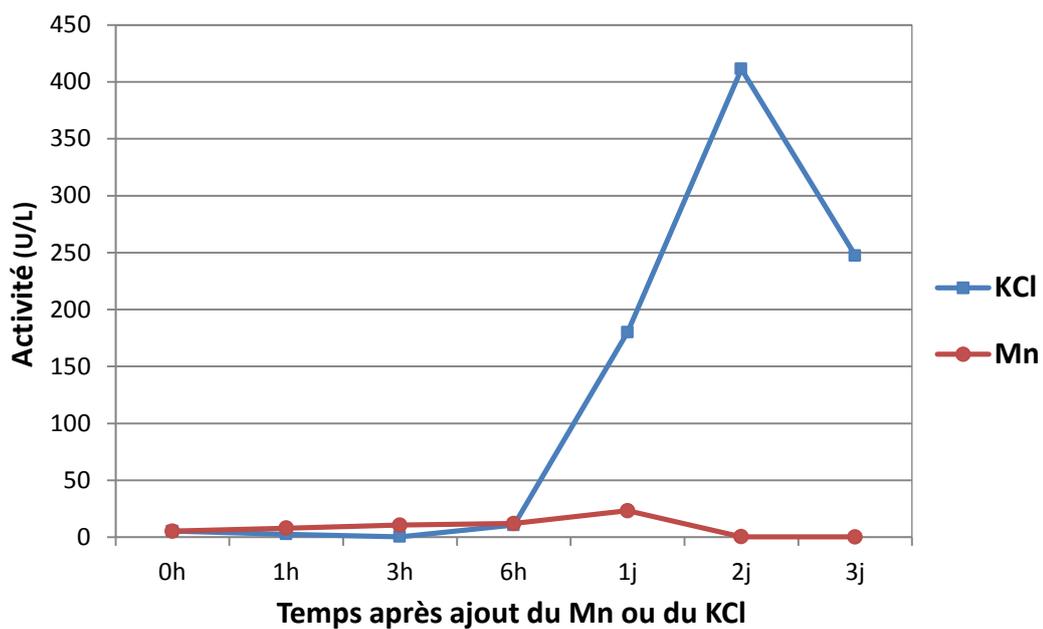


Figure 66 : Activité lignine-peroxydase de cultures de *Phanerochaete chrysosporium* additionnées de manganèse ou de chlorure de potassium 4 jours après la mise en culture.

Espèce	NRAMP (SMF)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	●
<i>Candida albicans</i>	4	●
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	●
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	●
<i>Coccidioides immitis</i>	1	●
<i>Botrytis cinerea</i>	1	■
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	▲
<i>Magnaporthe grisea</i>	0	▲
<i>Neurospora crassa</i>	2	▲
<i>Alternaria brassicicola</i>	0	◆
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1	◆
<i>Ustilago maydis</i>	1	●
<i>Coprinus cinereus</i>	1	●
<i>Laccaria bicolor</i>	1	●
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2	●
<i>Schizophyllum commune</i>	1	●
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2	●
<i>Postia placenta</i>	2	●
<i>Heterobasidion annosum</i>	2	●
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	■
<i>Tremella mesenterica</i>	1	■
<i>Puccinia graminis</i>	5	●
<i>Melampsora larici-populina</i>	4	●
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	■
<i>Rhizopus oryzae</i>	4	●
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	1	●
Total	45	

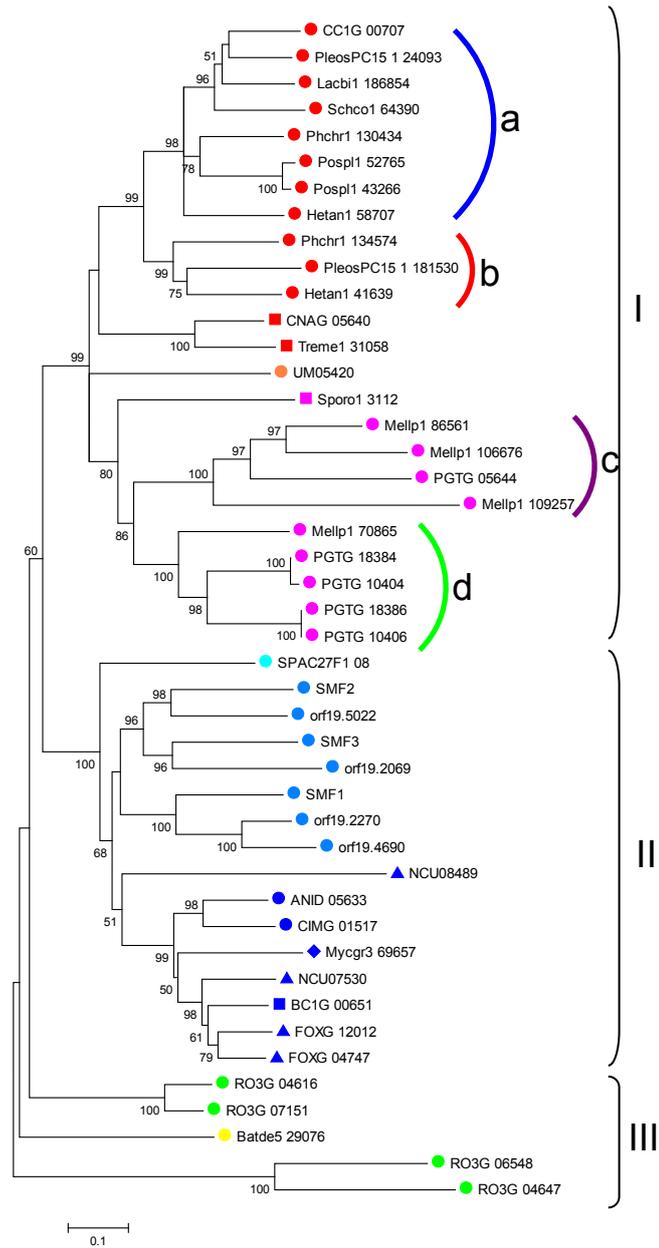


Figure 67 : Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs de type NRAMPs. Le tableau présent dans la figure reprend le nombre de transporteurs présents chez chaque organisme. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstrap ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions.

3.1 FAMILLE SMF (NRAMP, TC 2.A.55)

La famille NRAMP constitue une classe de transporteurs d'ions métalliques qui sont présents dans tout le règne du vivant, ainsi, on les retrouve aussi bien chez les bactéries que chez l'Homme. Les transporteurs de type NRAMP peuvent être localisés sur la membrane cellulaire ou dans des vésicules intracellulaires (Nevo & Nelson, 2006). Ils servent à la translocation d'un large éventail de métaux divalents comme Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} (Nevo & Nelson, 2006) mais également dans certains cas des métaux trivalents comme Al^{3+} (Xia et al, 2010) à travers les membranes vers le cytosol par un système impliquant le couplage du flux de métaux à un gradient de protons. Chez *S. cerevisiae*, SMF1 et SMF2 (*Suppressor of Mitochondria import Function*) permettent l'absorption du Mn^{2+} qui est nécessaire pour activer les enzymes Mn^{2+} dépendantes comme la Mn-SOD, une enzyme mitochondriale impliquée dans la protection contre le stress oxydatif. Chez *S. cerevisiae*, SMF1 fonctionne à la surface des cellules et joue un rôle dans l'absorption du manganèse tandis que SMF2 réside sur les membranes de vésicules intracellulaires (Culotta et al, 2005). Un troisième transporteur, SMF3, n'est pas impliqué dans les mouvements de Mn^{2+} mais semble plutôt impliqué dans la remobilisation du Fe^{2+} à partir de la vacuole (Portnoy et al, 2002).

3.1.1 ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE DES NRAMP FONGIQUES

L'analyse de la famille des NRAMPs (Annexe 2) permet de mettre en évidence leur présence dans les génomes de la plupart des espèces analysées, à l'exception de *M. grisea* et *A. brassicicola* (Pleosporale) (Fig.67). Lorsqu'ils sont présents, le nombre de NRAMPs est généralement de 1 ou 2 mais peut monter jusqu'à 5 comme chez *P. graminis*. La répartition des NRAMPs dans l'arbre suit parfaitement la classification phylogénétique avec les Basidiomycota dans le cluster I, les Ascomycota dans le cluster II tandis que ceux de *R. oryzae* et *B. dendrobatidis* sont à part (cluster III). La répartition selon la phylogénie, qui respecte les phylums dans les clusters I et II, ne permet pas de déterminer si les NRAMPs des différents organismes sont des orthologues de SMF1, 2 ou 3 de *S. cerevisiae* à l'exception de *C. albicans*. En effet, chez ce dernier, qui possède 4 NRAMPs, l'arbre phylogénétique laisse à penser qu'il y a 1 orthologue de SMF2 et de SMF3, les 2 NRAMPs restants semblant être des orthologues de SMF1.

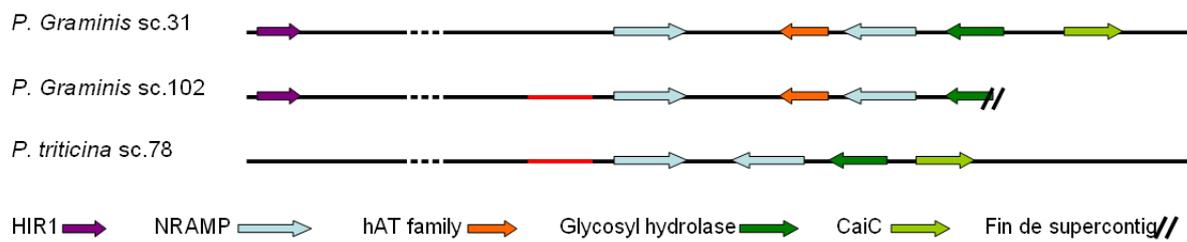


Figure 68 : Conservation schématique de la synténie entre *P. graminis* et *P. triticina*. Nous pouvons constater que les mêmes gènes semblent colocaliser dans les deux espèces. De plus, nous pouvons constater que les NRAMPs des scaffold 31 et 102 sont certainement le résultat d'un évènement de duplication génique ; cet évènement a été confirmé dans de nombreuses publications. Les signatures des gènes sont symbolisées par des flèches de couleurs différentes.

Deux espèces ne possèdent pas de NRAMPs, *M. grisea* (Magnaporthales) et *A. brassicicola* (Pleosporales). L'absence de NRAMP dans le génome de *M. grisea* a été confirmée dans des espèces apparentées. Ainsi chez *M. poae*, qui provoque une maladie estivale nommée en anglais "Summer Patch" et également connue sous le nom de maladie de l'œil de grenouille, ainsi que chez *Gaeumannomyces graminis*, un agent pathogène des céréales, tous deux membres de la famille des Magnaporthaceae, il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence de gènes de la famille NRAMPs. Il est donc possible que cette famille de protéines soit absente de cet ordre. L'étude d'autres Pleosporales qui sont donc phylogénétiquement proches de *A. brassicicola*, à savoir *Stagonospora nodorum*, *Cochliobolus heterostrophus* et *Pyrenophora tritici-repentis* a permis de mettre en évidence que si les NRAMPs sont bien absents du génome de *S. nodorum*, en revanche *C. heterostrophus* et *P. tritici-repentis* possèdent tous deux 1 NRAMP. Ainsi contrairement au cas de l'ordre des Magnaporthales qui ne semble pas posséder de NRAMPs, certaines Pleosporales en contiennent, ce qui peut indiquer une perte plus tardive au cours de la spéciation.

L'étude des 5 NRAMPs de *P. graminis* montre que 4 protéines (PGTG : 10404, 10406, 18384, 18386) sont regroupées dans la même sous-branche avec une protéine de *M. larici-populina* (Mellp1 70865) (Fig.67 sous-cluster I.d) tandis que la dernière (PGTG : 05644) est localisée dans une autre sous-branche avec 3 protéines de *M. larici-populina* (Fig.67 sous-cluster I.c). Le positionnement dans le même sous-embranchement suggère que ces protéines ont une origine commune. L'étude du génome de *P. graminis* nous permet de mettre en évidence qu'un gène est localisé sur le supercontig 11, il s'agit de PGTG : 05644 tandis que les quatre autres gènes sont regroupés deux par deux tête-bêche sur les supercontigs 31 et 102. Les gènes sont distants d'environ 9.8 kB sur le supercontig 31 et de 7.2 kB sur le 102. Dans les deux cas, ils sont séparés par une région dont la signature est spécifique de la superfamille des hAT, un élément transposable (Fig. 68). L'analyse de la synténie permet de mettre en avant qu'une glycosyl hydrolase est également située à côté des NRAMPs sur les deux supercontigs. La présence de zones mal séquencées complique l'étude de la synténie, cependant, une protéine de type HIR1, jouant un rôle dans la régulation de l'expression des histones, est présente sur les deux contigs et est distante d'environ 53 et 57 kB des NRAMPs respectivement sur les supercontigs 31 et 102. Ces données semblent suggérer qu'une partie du génome de cet organisme a été dupliquée. L'analyse d'une espèce proche, *P. triticina* ne révèle par BLAST la présence que de 3 NRAMPs, dont deux sont regroupés sur le supercontig 78. L'étude de ce supercontig met en évidence que les deux NRAMPs ne sont distants que de 1,2 kB et que l'espace entre les deux NRAMPs ne contient pas la signature hAT. Nous retrouvons cependant

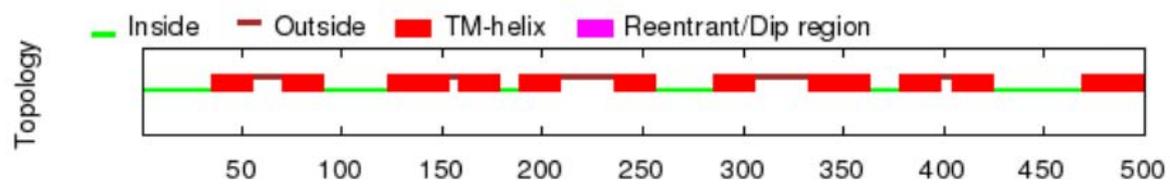


Figure 69 : Prédiction de la structure de SMFb obtenue à l'aide du programme OCTOPUS. Comme pour la plupart des NRAMPs, 11 domaines transmembranaires sont prédits.

une glycosyl hydrolase et un gène avec un motif CaiC qui était également présente sur le supercontig 31 de *P. graminis*. A l'inverse, le gène de la protéine de type HIR1 ne semble pas présent sur le supercontig 78. Une recherche bioinformatique permet de mettre en évidence qu'il est localisé sur le supercontig 137. Ces données semblent suggérer qu'un premier évènement de duplication segmentale inverse est à l'origine de la disposition tête-bêche de NRAMPs dans le genre *Puccinia* et qu'un évènement de duplication a eu lieu chez *P. graminis* après l'insertion du gène de la protéine ayant la signature hAT.

Nous pouvons constater qu'au niveau des Agaricomycètes, deux sous-branches semblent également se singulariser. Une sous-branche (Fig.67 sous-cluster I.a) contient au minimum 1 NRAMP de chaque organisme tandis que la deuxième sous-branche (I.b), ne regroupe que 3 organismes, à savoir : *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* et *H. annosum*. Ceci semble montrer qu'au cours de l'évolution et de la spéciation de ces organismes une pression de sélection plus importante a été exercée sur les orthologues de la sous-branche I.a par rapport à la sous-branche I.b. La présence d'un seul représentant de NRAMP dans une espèce donnée soulève la question de sa spécificité de substrat, car si *S. cerevisiae* possède 2 NRAMPs, SMF1 et SMF2, qui transportent le Mn^{2+} et le Fe^{2+} et 1 NRAMP (SMF3) spécifique du Fe^{2+} , *S. pombe* ne possède qu'un seul NRAMP. Ce dernier a été cloné et il a été démontré qu'il est impliqué dans le transport de Mn^{2+} (Maeda et al, 2004).

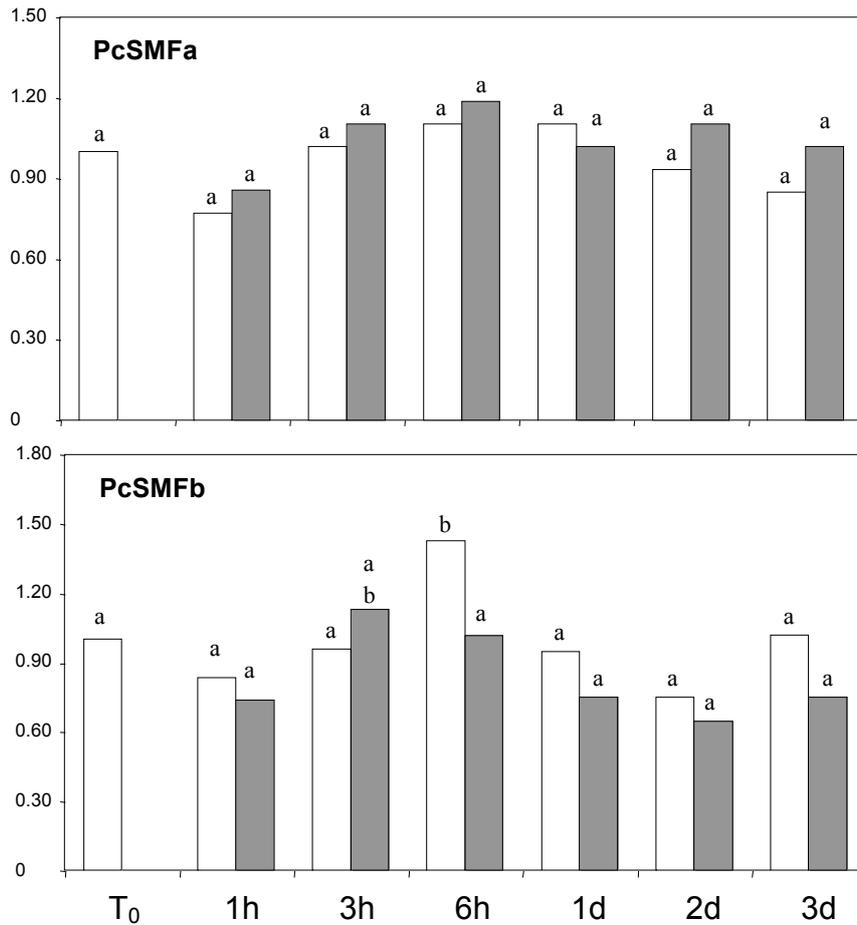


Figure 70 : Expression des NRAMPs de *Phanerochaete chrysosporium* en présence (barres grises) ou en absence de manganèse (barres blanches) dans le milieu de culture. L'expression des NRAMPs a été normalisée par rapport à l'expression de la Gpd. Des résultats identiques sont obtenus en normalisant par rapport à l'expression de l'actine. Une lettre différente indique une différence statistiquement significative avec une Pvalue $\leq 0,05$.

	- Mn ²⁺				Mn ²⁺ 5mM				Mn ²⁺ 20mM				Fe ²⁺ 1mM			
	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j
SMFa	[Expression data for SMFa]															
SMFb	[Expression data for SMFb]															
Gpd	[Expression data for Gpd]															
Act	[Expression data for Act]															

Figure 71 : Expression des NRAMPs de *Phanerochaete chrysosporium* en fonction des métaux ajoutés dans le milieu. L'expression a été étudiée en présence de différentes concentrations de Mn²⁺ (5 et 20 mM) ou de Fe²⁺ (1 mM).

3.1.2 EXPRESSION DES TRANSPORTEURS

Nous avons suivi l'expression des deux NRAMPs de *P. chrysosporium* sur milieu supplémenté ou non en manganèse. Pour ce faire, des spores ont étéensemencées dans du milieu de Tien and Kirk carencé en manganèse. Les spores sont mises en culture pendant 4 jours avant d'être complémenteés ou non avec du manganèse. Le suivi de l'expression de ces gènes est rendu compliqué du fait de la présence d'un épissage alternatif en particulier pour SMFb qui présente un épissage alternatif particulièrement dans la région 3' de son ARNm donnant lieu, après clonage, à des formes tronquées de la protéine ne possédant donc pas la structure prédite de ces protéines (Fig.69) Pour pallier à ce problème, des amorces permettant d'amplifier une séquence de la région 5' ont été utilisées. L'expression des NRAMPs est alors suivie au cours du temps. Nous pouvons constater sur la figure 70 que, malgré de petites variations, l'expression des NRAMPs ne semble pas varier de façon significative durant l'expérience.

La différence d'expression des NRAMPs entre le milieu avec et sans Mn^{2+} étant faible, nous avons testé d'autres concentration de Mn^{2+} , à savoir 5 et 20 mM, ainsi qu'une concentration en Fe^{2+} de 1 mM, la protéine SMF3 de *S. cerevisiae* étant spécifique du fer et régulée par ce dernier. Nous pouvons constater que SMFa (Phchr 130434) ne semble pas présenter de variation d'expression (Fig.71). A l'inverse, l'expression de SMFb (Phchr 134574) semble varier en particulier lors du traitement avec du Fe^{2+} . L'absence apparente de régulation de SMFa permet de poser l'hypothèse d'un rôle identique aux protéines SMF1 ou SMF2 de *S. cerevisiae* tandis que SMFb pourrait jouer un rôle dans les transferts intracellulaires de Fe^{2+} . Tous les Agaricomycètes que nous avons étudiés semblent posséder un orthologue de SMFa suggérant que le rôle de SMFb est moins vital et n'est conservé que dans certaines conditions. Cette hypothèse nécessitera le clonage des NRAMPs afin de vérifier s'ils complémenteent les souches de levure délétées ainsi que leur localisation subcellulaire.

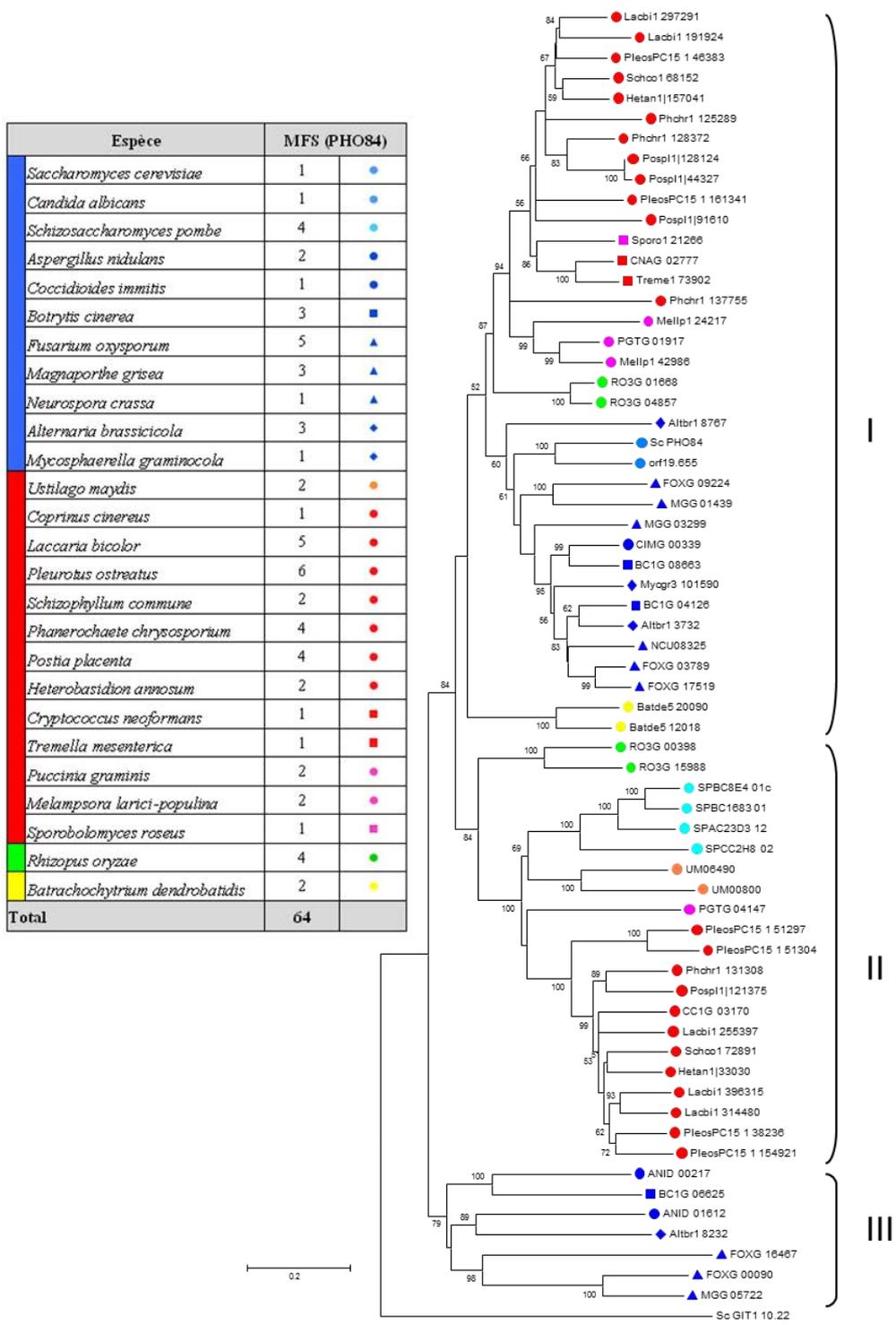


Figure 72 : Arbre phylogénétique présentant les orthologues de PHO84 de *S. cerevisiae*. Le tableau présent dans la figure reprend le nombre de transporteurs présent pour chaque organisme. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions. Git1, un transporteur de la superfamille des MFS, a été utilisé comme outgroup.

3.2 FAMILLE PHO84 (MFS, TC 2.A.1.)

La protéine PHO84 appartient à une famille de symports impliqués dans le transfert couplé de phosphate et de protons. Elle appartient à la superfamille des MFS (Major Facilitator Superfamily, TC 2.A.1) et a été isolée sur sa capacité à transporter le phosphate (Bun-Ya et al, 1991). Il a ensuite été démontré que son activité pouvait être inhibée par l'EDTA (Fristedt et al, 1999) ce qui a conduit à proposer un modèle faisant intervenir le transfert de complexes MeHPO_4 . Son rôle dans l'homéostasie au Mn^{2+} a ensuite été démontré (Jensen et al, 2003). PHO84 semble être le principal transporteur impliqué dans l'absorption de Mn^{2+} lorsque la concentration de ce dernier est importante voire toxique.

3.2.1 ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE DES PHO84 FONGIQUES

L'étude phylogénétique de 26 espèces de champignons permet de comptabiliser 63 gènes codant des transporteurs apparentés à PHO84 (Annexe 2). Ces transporteurs sont présents dans tous les organismes étudiés et ont été soumis à de multiples événements de duplication. Ainsi, *F. oxysporum*, un Sordariomycète, présente cinq orthologues de PHO84. Le nombre d'orthologues semble plus important dans le groupe des Agaricomycètes avec plus de 3 orthologues en moyenne et un maximum de six orthologues potentiels chez *P. ostreatus*.

L'analyse phylogénétique des orthologues de PHO84 montre une divergence en trois groupes. Le groupe I se compose de membres de toutes les classes analysées à l'exception des Ustilagomycètes et des Schizosaccharomycètes (Fig.72). Le groupe II est principalement composé des Basidiomycota mais possède également des représentants des Schizosaccharomycètes (Taphrinomycotina) et des Mucoromycotina. Le groupe III ne possède que des Ascomycota et plus précisément des membres du sous-embranchement des Pezizomycotina.

Deux gènes sont présents dans le génome du Chytridiomycotina, *B. dendrobatidis*. Ces derniers sont dans le cluster I sur la figure 72, cependant, lors de la construction de l'arbre phylogénétique par MEGA ils peuvent également être associés au cluster II ce qui explique l'absence de bootstrap supérieur à 50 sur la branche portant ces deux protéines. A l'inverse de *B. dendrobatidis*, *R. oryzae*, un membre des Mucoromycotina, possède 4 protéines qui sont

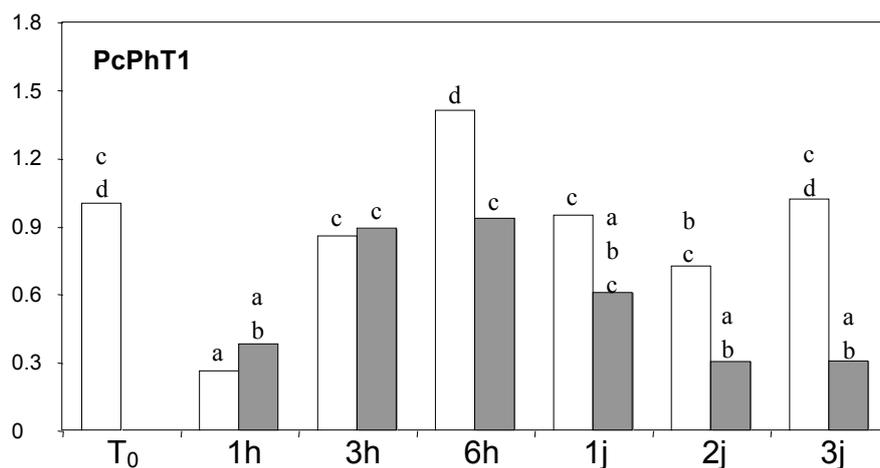


Figure 73 : Expression de PcPhT1 de *Phanerochaete chrysosporium* en présence (barres grises) ou en absence de manganèse (barres blanches) dans le milieu de culture L'expression de PcPhT1 a été normalisée par rapport à l'expression de la Gpd. Des résultats identiques sont obtenus en normalisant par rapport à l'expression de l'actine. Une lettre différente indique une différence statistiquement significative avec une $P\text{value} \leq 0,05$.

clairement réparties de manière équitable entre les deux clusters. L'analyse du génome de *R. oryzae* a révélé que celui-ci a subi un événement de duplication concernant une grande partie de son génome (Ma et al, 2009), ce qui conduit à penser qu'il est fort probable que les autres membres des Mucoromycotina ne possèdent que 2 orthologues de PHO84. L'analyse de deux autres membres des Mucoromycotina, *Mucor circinelloides* et *Phycomyces blakesleeanus* révèle en fait la présence de 3 orthologues chez *M. circinelloides* (Mucci1 : 91574, 93558 et 90484) et chez *P. blakesleeanus* (Phyb11 : 33813, 22787 et 56638). Si ces organismes sont ajoutés dans notre analyse phylogénétique, nous retrouvons une protéine de chaque organisme (Mucci1 : 90484 et Phyb11 : 22787) dans le cluster I, les deux autres étant situées dans le cluster II.

Il est intéressant de constater que *R. oryzae*, *M. circinelloides* et *P. blakesleeanus* possèdent des protéines dans les clusters I et II. Ce phylum étant également considéré comme une forme ancestrale de champignons (Tanabe et al, 2005) nous pouvons supposer que les orthologues du cluster II ont disparu au cours de l'évolution chez les Ascomycota à l'exception notable de chez *S. pombe*. Ce dernier ne possède en revanche pas de représentants dans le cluster I. La situation est différente pour les Basidiomycota dont les organismes possèdent en général un représentant dans chaque cluster, même si ce n'est pas toujours le cas, comme pour *U. maydis* (Ustilagomycotina) et *C. cinereus* (Agaricomycotina) qui ne sont présents que dans le cluster II, ou à l'inverse pour *M. larici-populina* (Pucciniomycotina), *C. neoformans* et *T. mesenterica* (Tremellomycètes) présents uniquement dans le cluster I. En dehors des Basidiomycota cités précédemment tous les membres de cet embranchement possèdent au moins une protéine dans les 2 clusters.

3.2.2 EXPRESSION DE PCPhT1

Initialement un seul gène de *P. chrysosporium* a été étudié il s'agit de Phchr1:128372, il sera nommé PcPhT1 par la suite. L'expression de PcPhT1 a été mesurée comme décrit précédemment. Bien que certaines variations statistiquement significatives des niveaux de transcription aient été observées au cours de l'expérience, seuls les échantillons 6h et 3j ont montré des différences entre les deux traitements, avec une diminution de l'expression lorsque la culture est complétement en Mn^{2+} (Fig.73).

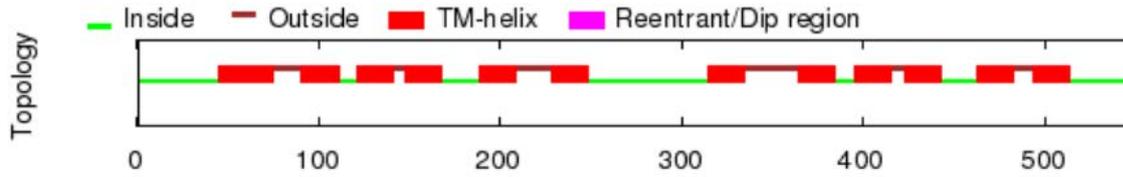


Figure 74 : Prédiction de structure de la protéine PhT1 de *P. chrysosporium* obtenue à l'aide du programme OCTOPUS.

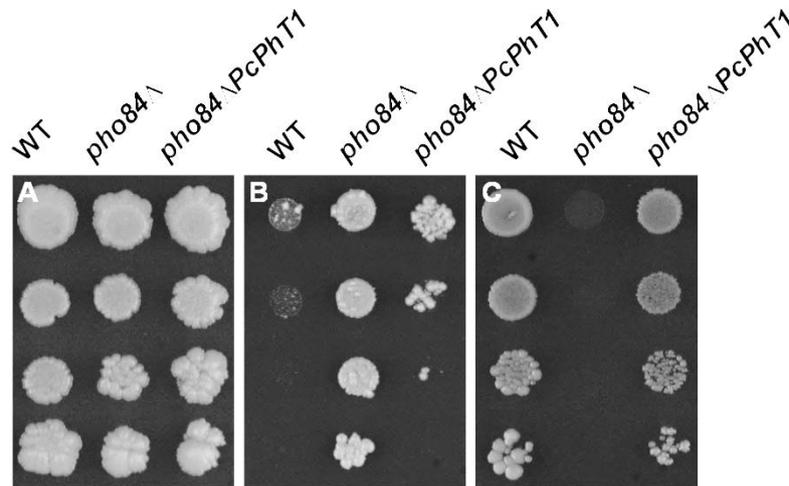


Figure 75 : Test de complémentation de la souche *pho84Δ* par PcPhT1. La souche *pho84Δ* a été transformée avec le vecteur pFL61 vide ou avec le vecteur pFL61 portant PcPhT1. Des dilutions successives ont été mises à pousser sur un milieu non sélectif (A), un milieu contenant 45 mM de Mn (B) et un milieu contenant seulement 100 μ M de phosphate (C). La souche sauvage (WT) transformée avec le pFL61 vide sert de témoin.

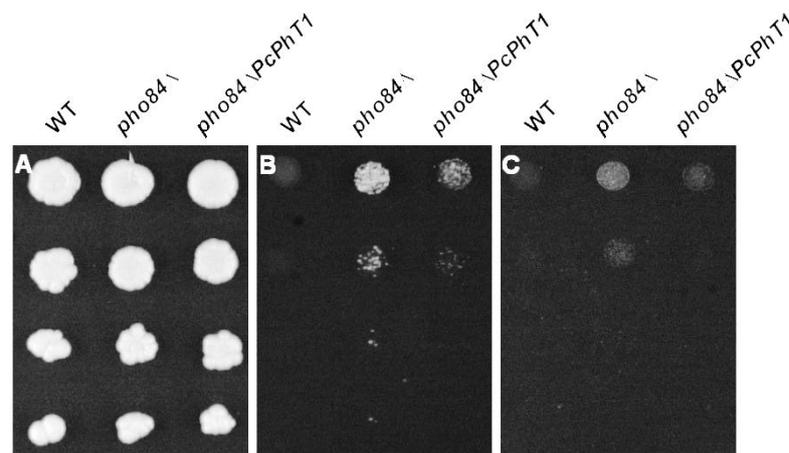


Figure 76 : Test de complémentation de la souche *pho84Δ* par PcPhT1. La souche *pho84Δ* a été transformée avec le vecteur pFL61 vide ou avec le vecteur pFL61 portant PcPhT1. Des dilutions successives ont été mises à pousser sur un milieu non sélectif (A), un milieu contenant 7,5 mM de Cobalt (B) et un milieu contenant 3 mM de cuivre (C). La souche sauvage (WT) transformée avec le pFL61 vide sert de témoin.

3.2.3 COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE DE *PHO84*

PcPhT1 a été cloné dans le vecteur pGEMT easy, l'analyse de la séquence protéique déduite de l'ADNc a permis de déterminer qu'il s'agit d'une protéine de 548 acides aminés possédant 12 domaines transmembranaires potentiels (Fig. 74).

PcPhT1 a été sous-cloné dans le vecteur pFL61 et exprimé dans la souche mutante *pho84Δ*. Cette souche présente un double intérêt PHO84 jouant un rôle dans l'absorption du phosphate et du manganèse (Jensen et al, 2003). Cette protéine est donc nécessaire pour la croissance lorsque la concentration en phosphate est faible et à l'inverse a un effet délétère lorsque la concentration en manganèse devient importante. Ces deux paramètres ont donc été étudiés dans la souche *pho84Δ*.

Un premier test en goutte sur milieu SD -URA complémenté avec des teneurs croissantes en manganèse a permis de mettre en évidence que le phénotype de résistance associé à la délétion de PHO84 par rapport à la souche sauvage pouvait être inhibé par l'expression de PcPhT1. Ainsi la figure 75 montre que la croissance de la souche sauvage est complètement inhibée à 45 mM de Mn^{2+} alors que la souche *pho84Δ* se développe encore correctement. L'expression de PcPhT1 diminue fortement la capacité de croissance en présence de manganèse suggérant un rôle de ce dernier dans l'homéostasie au Mn^{2+} .

Nous avons vu précédemment que PHO84 joue également un rôle dans l'import de Pi (Bun-Ya et al, 1991). Un test en goutte a aussi été réalisé afin de vérifier si PcPhT1 était capable de compléter la délétion de PHO84 dans la levure. Nous pouvons constater sur la figure 75 que la croissance de *pho84Δ* est inhibée sur un substrat contenant seulement 50 μM de Pi, cette dernière n'est rétablie qu'à partir de 250 μM , à l'inverse la souche sauvage possède une croissance normale. Lorsque PcPhT1 est exprimé, la croissance est restaurée même lorsque la quantité de phosphate est faible.

Ces résultats montrent que PcPhT1 semble jouer un rôle identique à PHO84 dans le transport de complexes $MeHPO_4$. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé d'autres métaux pour lesquels la délétion de PHO84 permet d'améliorer la résistance (Fig.76). Nous pouvons constater que la délétion de PHO84 permet une meilleure croissance sur un milieu contenant du cobalt ou du cuivre par rapport à la souche sauvage. Comme dans le cas du manganèse l'introduction de PcPhT1 restaure la sensibilité de la souche *pho84Δ*. Ceci permet de confirmer que PcPhT1 est capable de prendre en charge d'autres métaux et que son rôle semble être identique à la protéine PHO84 de *S. cerevisiae*.

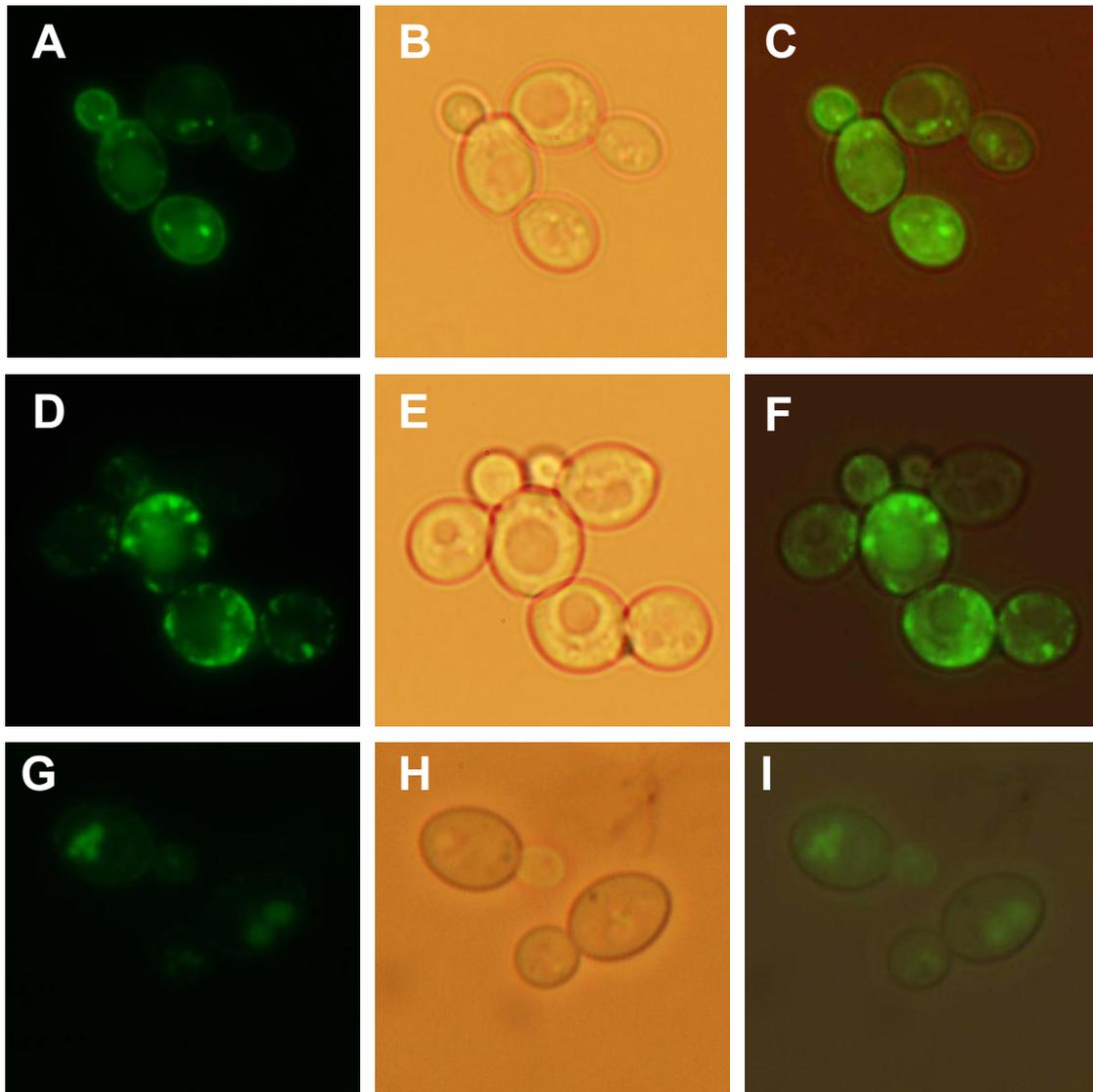


Figure 77 : Image en microscopie à fluorescence (A,D,G), en DIC (B,E,H) et superposition de ces deux images (C,F,I) de la protéine de fusion PcPhT1-GFP après une nuit en culture liquide (A,B,C) à faible concentration en phosphate inorganique ($250\mu\text{M}$) ainsi que 30 (D,E,F) et 60 (G,H,I) minutes après addition de 1mM de phosphate.

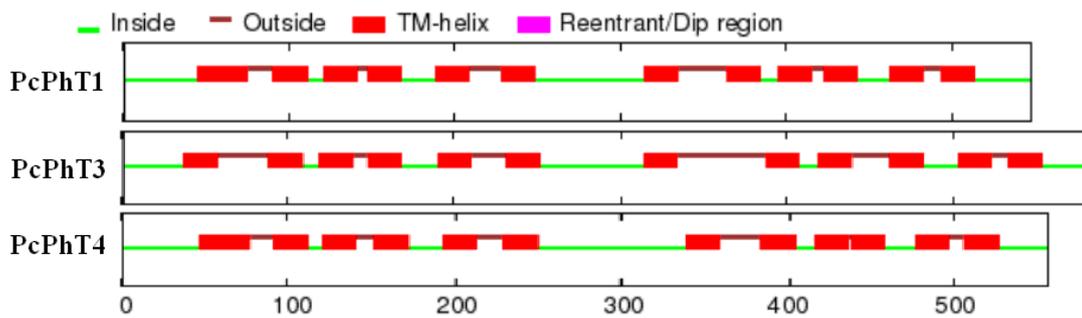


Figure 78 : Prédictions de la structure des protéines PcPhT1, PcPhT3 et PcPhT4 obtenues à l'aide du programme OCTOPUS.

3.2.4 LOCALISATION INTRACELLULAIRE

Afin de déterminer sa localisation intracellulaire, PcPhT1 a été fusionné à la GFP en le clonant dans le plasmide pYES2-GFP. Lorsque la souche *pho84*Δ portant le plasmide ainsi obtenu est mise en culture durant une nuit dans du SD –URA contenant du galactose comme source de carbone et une faible quantité de phosphate, à savoir 250 μM de Pi au moment de la mise en culture, la fluorescence est principalement localisée au niveau de la membrane plasmalemmique (Fig.77 A, B et C). En ajoutant du phosphate afin d'obtenir une concentration de 1 mM de Pi nous pouvons constater qu'après 15 minutes (Fig.77 D, E et F) la fluorescence n'est plus répartie de manière homogène sur la membrane plasmalemmique mais semble plutôt être sous la forme de spots qui pourraient être des vésicules d'endocytose naissantes et des vésicules intracellulaires. Après 30 minutes la fluorescence est majoritairement localisée au niveau de la vacuole. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment qui ont permis de mettre en évidence que l'expression, la localisation et la dégradation de PHO84 pouvaient être régulées par la présence de phosphate (Mouillon & Persson, 2005; Petersson et al, 1999).

L'ensemble de ces données indique que PcPhT1 a une fonction similaire à PHO84.

Tableau 17 : Homologie de séquence entre les transporteurs PcPhT1, 3 et 4 de *P. chrysosporium*. L'identité (première ligne de chaque cellule) et la similarité (deuxième ligne) en acide aminé sont indiquées en nombre d'acides aminés ou en pourcentage. Le tableau a été réalisé à l'aide du programme Genedoc 2.7 (Nicholas & Nicholas, 1997).

	PcPhT1	PcPhT3	PcPhT4
PcPhT1	548 0	51% 67%	37% 54%
PcPhT3	308 410	583 0	32% 48%
PcPhT4	221 324	202 307	555 0

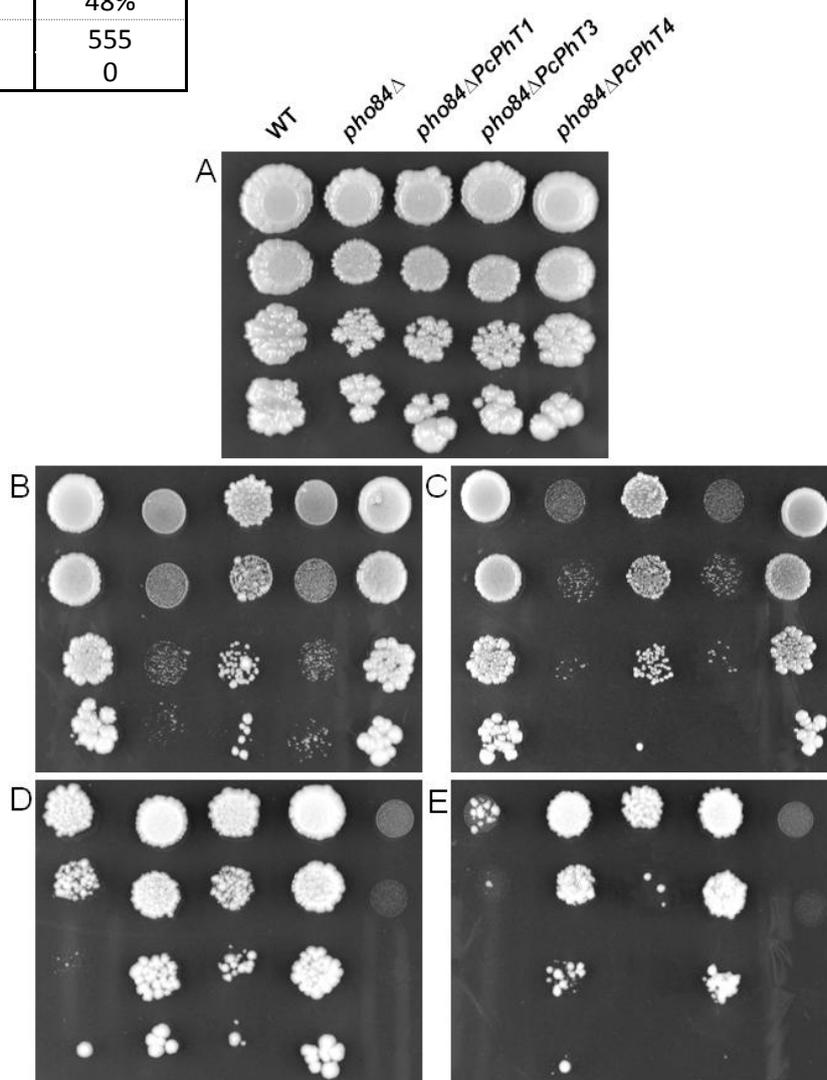


Figure 79 : Test de complémentation de la souche *pho84Δ* par PcPhT1, PcPhT3 et PcPhT4. La souche *pho84Δ* a été transformée avec le vecteur pFL61 vide ou avec le vecteur pFL61 portant PcPhT1, PcPhT3 ou PcPhT4. Des dilutions successives ont été mises à pousser sur un milieu non sélectif (A), des milieux contenant peu de phosphate (B : 250μM, C : 100 μM) et des milieux contenant de fortes concentration en manganèse (D : 40 mM, E : 45mM). La souche sauvage (WT) transformée avec le pFL61 vide sert de témoin.

3.2.5 COMPLÉMENTATION AVEC PCPhT3 ET PCPhT4

Afin de vérifier si les autres orthologues de PHO84 avaient également un rôle dans l'absorption du phosphate, nous avons tenté d'amplifier ces derniers afin de les cloner dans le pGEMT-easy. Nous avons réussi à amplifier 2 des 3 gènes, Phchr1:137755 et Phchr1:131308 respectivement nommés PcPhT3 et 4 et les avons clonés dans pFL61; à l'inverse Phchr1:125289, nommé PcPhT2 par la suite, n'a pas pu être amplifié.

L'analyse de PcPhT3 (583 AA) et PcPhT4 (555 AA) permet de montrer que ces deux transporteurs possèdent une topologie comparable à PcPhT1 avec 12 domaines transmembranaires (Fig.78). PcPhT1 possède un pourcentage d'identité de 51% avec PcPhT3 et de 37% avec PcPhT4, tandis que PcPhT3 possède 32% d'identité avec PcPhT4 (Tableau 17). Ceci est en accord avec l'arbre phylogénétique, PcPhT1 et PcPhT3 étant dans le cluster I, alors que PcPhT4 est dans le cluster II.

PcPhT3 et PcPhT4 ont ensuite été sous-clonés dans le pFL61 afin de transformer *pho84Δ*. Nous pouvons constater sur la figure 79 que lorsque les souches sont mises en culture sur des milieux à faible teneur en phosphate, à savoir 250 μM (B) et 100 μM (C), trois souches arrivent à pousser convenablement. Il s'agit de la souche BY4741 (WT) et des souches *pho84Δ* complémentées avec le vecteur pFL61 contenant PcPhT1 ou PcPhT4. Il semble que la croissance de *pho84Δ* est plus efficace lorsque cette dernière possède le plasmide contenant PcPhT4 par rapport à celui contenant PcPhT1. A l'inverse la souche *pho84Δ* portant le vecteur vide ainsi que la souche portant PcPhT3 ont une croissance plus faible, en particulier lorsque la concentration en phosphate est de 100 μM.

En inoculant ces souches sur du milieu contenant une forte concentration en manganèse (Fig.79 D et E), nous pouvons constater que la croissance de la souche sauvage est réduite lorsque la concentration en Mn est de 40mM et qu'elle est presque complètement inhibée à 45 mM. A l'inverse la souche *pho84Δ* semble avoir une croissance normale à 40 mM et n'est que faiblement inhibée à 45 mM. Comme auparavant la souche contenant PcPhT3 présente un phénotype comparable à la souche *pho84Δ* confirmant le fait que cette protéine ne semble pas prendre en charge de manière efficace les complexes MeHPO₄. La souche portant PcPhT1 présente une inhibition de sa croissance sur des milieux contenant du Mn confirmant les résultats obtenus précédemment (Fig.79). Cependant nous pouvons constater que l'inhibition de la croissance n'est pas totale et que la souche présente un phénotype intermédiaire entre la souche sauvage et *pho84Δ*. La souche portant PcPhT4 est quant à elle fortement inhibée par la présence de Mn, ainsi sa croissance est déjà inhibée à 40 mM de manganèse.

La complémentation de la souche de levure *pho84*Δ met en évidence que, comme PcPhT1, PcPhT4 permet également de passer outre la délétion de PHO84. PcPhT4 semble prendre en charge de manière plus efficace les complexes MeHPO₄, ainsi sa croissance est plus efficace lorsque la concentration en phosphate est basse par rapport à la souche *pho84*ΔPcPhT1 et sa croissance sur milieu avec des fortes concentrations en manganèse est compromise à des concentrations inférieures à celle de la souche sauvage.

Il est intéressant de constater que sur l'arbre phylogénétique PcPhT4 n'est pas dans le cluster I contenant PcPhT1 ainsi de PHO84. Ceci permet de mettre en évidence que les membres du cluster II peuvent également prendre en charge efficacement les complexes MeHPO₄.

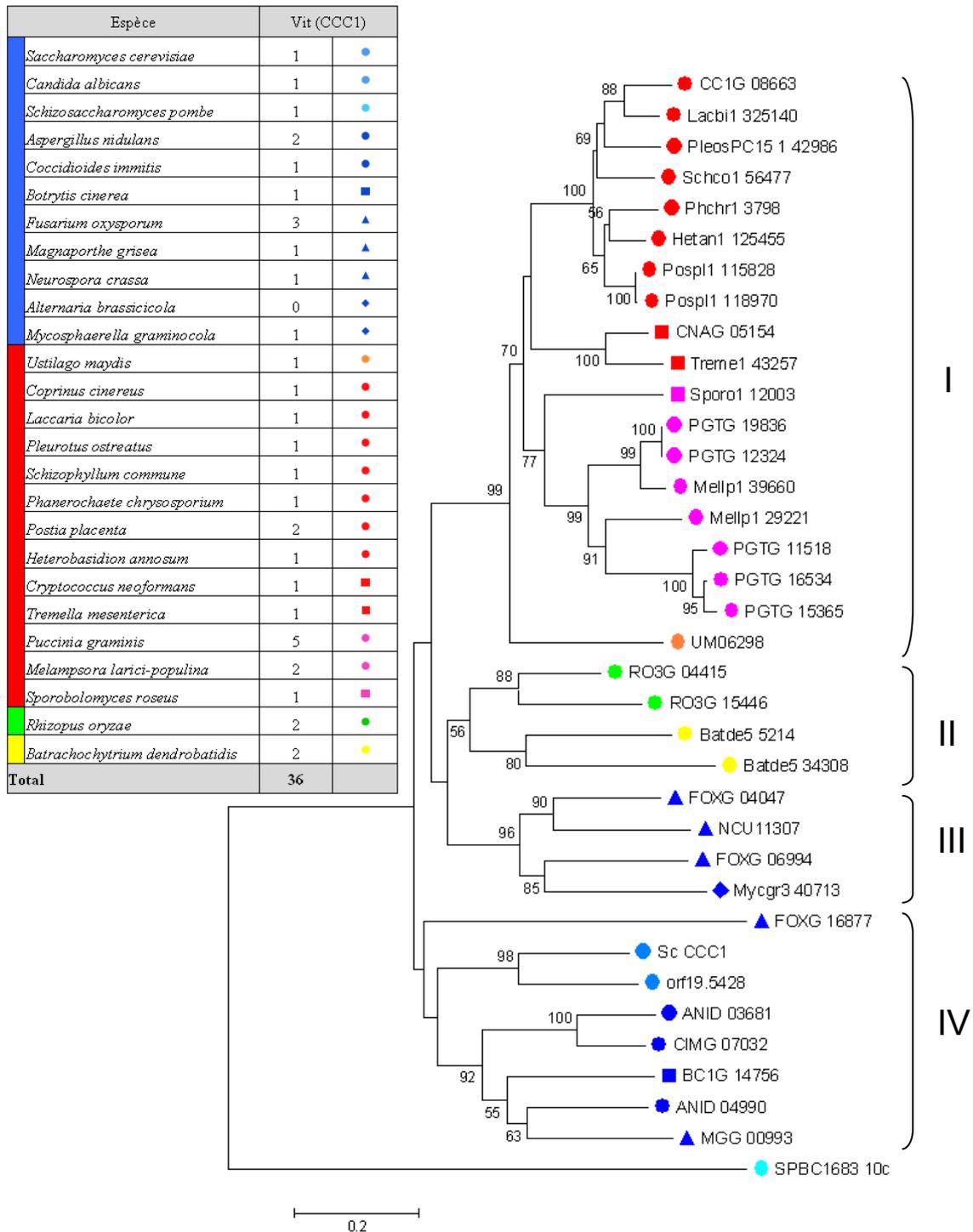


Figure 80 : Arbre phylogénétique présentant les orthologues de CCC1 de *S. cerevisiae*. Le tableau présent dans la figure reprend le nombre de transporteurs présent pour chaque organisme. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions.

3.3 FAMILLE CCC1 (VIT, TC 2.A.89)

CCC1 est le seul transporteur actuellement caractérisé permettant le stockage du manganèse dans la vacuole. Il a été caractérisé sur ses capacités à protéger la souche *pmr1Δ* d'un stress induit par le manganèse (Lapinskas et al, 1996). Il a ensuite été démontré que CCC1 jouait également un rôle dans l'homéostasie du fer et que la protéine est localisée au niveau de la vacuole (Li et al, 2001). Chez la levure, il a été démontré que l'expression de CCC1 est spécifiquement régulée par la concentration en fer via un mécanisme faisant intervenir YAP5 (Li et al, 2008).

3.3.1 ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE DES CCC1 FONGIQUES

La plupart des organismes étudiés possèdent un orthologue de CCC1 (Annexe 2), cependant, certains organismes en possèdent deux et en particulier les formes ancestrales comme *R. oryzae* et *B. dendrobatidis*. Le nombre d'orthologues de CCC1 est encore plus important chez *F. oxysporum* et chez *P. graminis* qui possèdent respectivement 4 et 5 orthologues de CCC1. Comme lors de l'étude des NRAMPs, nous n'avons trouvé que trois exemplaires de CCC1 chez *P. triticina*. De plus l'étude de la synténie permet de retrouver des éléments conservés comme des facteurs d'initiation de type 4E ou des protéines contenant un domaine yrdC. Ceci confirme l'important remaniement au niveau du génome de *P. graminis*.

A l'inverse des espèces précédemment citées, *A. brassicicola* ne possède pas d'orthologue de CCC1. Cette exception a été confirmée dans trois autres espèces de l'ordre des Pleosporales (*Cochliobolus heterostrophus*, *Pyrenophora tritici-repentis* et *Stagonospora nodorum*).

L'analyse de l'arbre (Fig.80) permet de mettre en évidence que la phylogénie est conservée pour certains phylums : les deux représentants des Mucoromycotina et des Chytridiomycotina se retrouvent ensemble dans le cluster II. De même, nous pouvons constater que la phylogénie est bien conservée chez les Basidiomycotina (Cluster I) et ceci jusqu'au niveau des classes même si le positionnement des Tremellomycètes reste incertain.

La situation est différente au niveau des Ascomycotina puisque ces derniers sont regroupés dans les clusters III et IV à l'exception de *S. pombe* (SPBC1683_10c). Malgré la position particulière de cette protéine sur l'arbre phylogénétique généré par MEGA, il semble qu'elle est bien impliquée dans le transport de métaux, en particulier du fer dont l'homéostasie influence son expression (Mercier et al, 2006). Au niveau du cluster IV nous retrouvons les

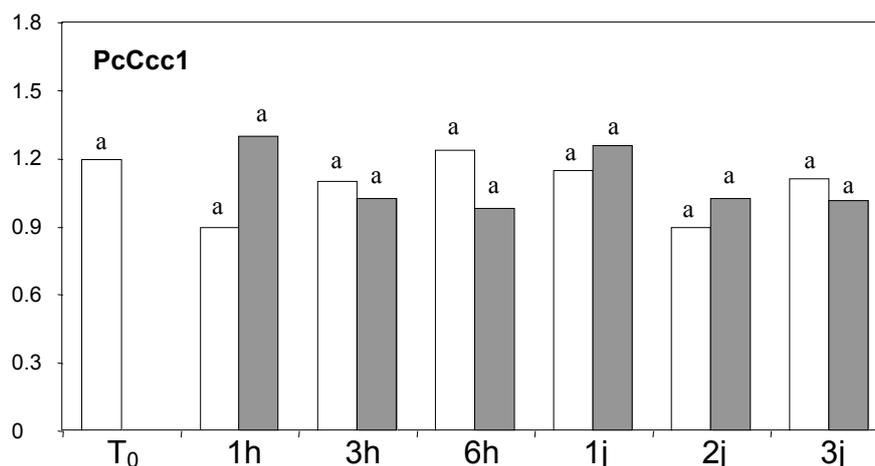


Figure 81 : Expression de PcCcc1 de *Phanerochaete chrysosporium* en présence (barres grises) ou en absence de manganèse (barres blanches) dans le milieu de culture. L'expression a été normalisée par rapport à l'expression de la Gpd. Des résultats identiques sont obtenus en normalisant par rapport à l'expression de l'actine. Une lettre différente indique une différence statistiquement significative avec une Pvalue ≤ 0,05.

	- Mn ²⁺				Mn ²⁺ 5mM				Mn ²⁺ 20mM				Fe ²⁺ 1mM			
	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j
PcCcc1	[Expression bands for PcCcc1]															
Gpd	[Expression bands for Gpd]															
Act	[Expression bands for Act]															

Figure 82 : Expression de PcCcc1. L'expression de PcCcc1 a été étudiée en présence de différentes concentrations de Mn²⁺ (5 et 20 mM) ou de Fe²⁺ (1 mM).

Saccharomycotina, *S. cerevisiae* et *C. albicans*, et certaines classes de Pezizomycotina comme les Eurotiomycètes et les Leotiomycètes, tandis que les Sordariomycètes et les Dothideomycètes semblent principalement regroupés dans le cluster II, même si l'orthologue de *M. grisea* est présent dans le cluster III.

3.3.2 EXPRESSION DE PCCCC1

L'expression de PcCCC1 ne varie pas lorsque du manganèse est apporté au milieu (Fig. 81). Ce transporteur permettant le stockage de métaux lorsque ces derniers sont en concentrations toxiques dans la cellule, il n'est pas anormal d'obtenir ce résultat. Il est donc intéressant de tester des concentrations plus fortes en métaux.

Lorsque l'on ajoute différentes concentrations de Mn^{2+} ou du Fe^{2+} , l'analyse de l'expression de PcCcc1 ne permet pas de mettre en évidence une variation de l'expression de ce gène chez *Phanerochaete chrysosporium* (Fig.82). Ceci semble être en contradiction avec l'analyse de l'expression de CCC1 chez *S. cerevisiae*, pour lequel il a en effet été démontré que l'expression de ce transporteur était plus importante en présence de Fer (Li et al, 2008). Cependant dans l'étude de Li la comparaison a été faite entre une culture complémentée en fer et une culture carencée par l'addition de bathophenanthroline disulfonate, alors que dans la présente étude 23,9 μM de Fer sont présents dans la culture carencée en Mn, ce qui peut être suffisant pour induire son expression. Il a également été démontré qu'un autre mécanisme permet de réguler la quantité de protéine CCC1 *via* la dégradation de son l'ARNm (Puig et al, 2005), il est possible que ce mécanisme joue un rôle essentiel chez *P. chrysosporium*.

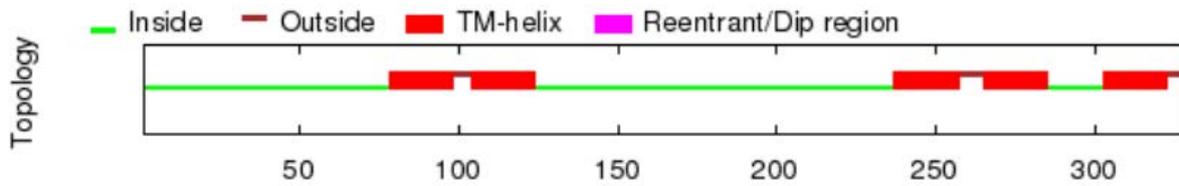


Figure 83 : Prédiction de structure de la protéine CCC1 de *P. chrysosporium* obtenue à l'aide du programme OCTOPUS.

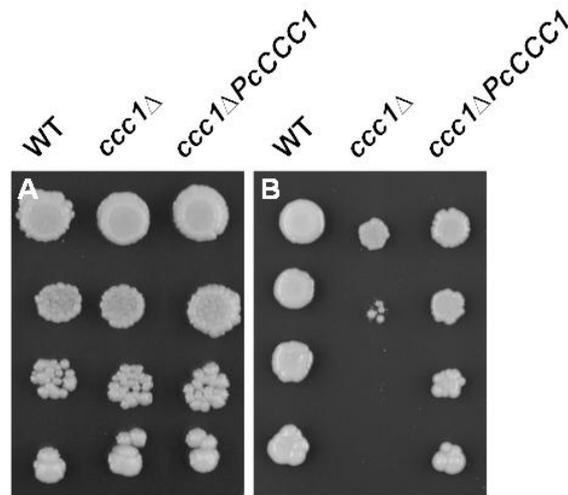


Figure 84 : Test de complémentation de la souche *ccc1Δ* par PcCCC1. La souche *ccc1Δ* a été transformée avec le vecteur pFL61 vide ou avec le vecteur pFL61 portant PcCCC1. Des dilutions successives ont été mises en culture sur un milieu non sélectif (A) et un milieu contenant 5,25 mM de Fe (B). La souche sauvage (WT) transformée avec le pFL61 vide sert de témoin.

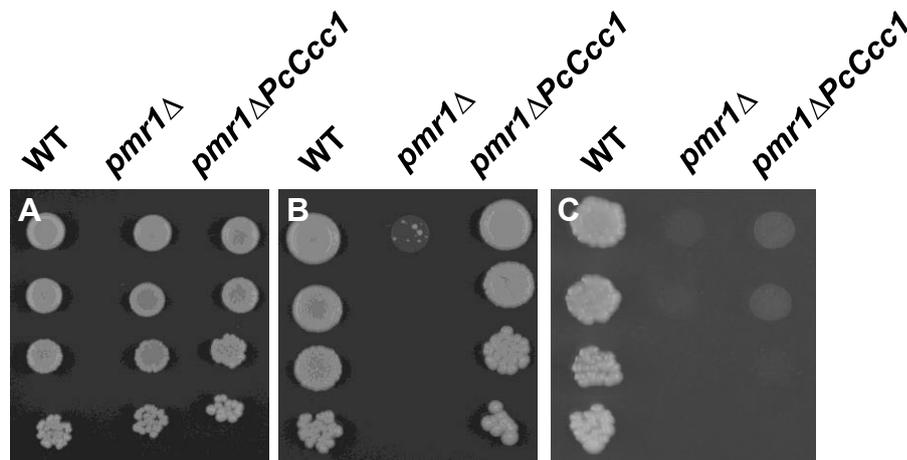


Figure 85 : Test de complémentation de la souche *pmr1Δ* par PcCCC1. La souche *pmr1Δ* a été transformée avec le vecteur pFL61 vide ou avec le vecteur pFL61 portant PcCCC1. Des dilutions successives ont été mises en culture sur un milieu non sélectif (A), un milieu contenant 2 mM de Mn (B) et un milieu contenant 5 mM de Mn (C). La souche sauvage (WT) transformée avec le pFL61 vide sert de témoin.

3.3.3 COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE EN SYSTÈME LEVURE

L'homologue de CCC1 de *P. chryso sporium* que nous avons appelé PcCCC1 a été cloné et séquencé. La prédiction de sa topologie ne met en évidence la présence que de 5 domaines transmembranaires (Fig.83). Ce chiffre est faible mais il est cependant en accord avec la prédiction de la topologie de la protéine CCC1 de *S. cerevisiae*. L'utilisation d'un autre programme de prédiction (SOSUI) permet de mettre en évidence que la partie N-terminale est certainement ancrée dans la membrane, mais n'est pas prédite comme telle par la plupart des programmes.

Le gène a été inséré dans pFL61 afin de vérifier si PcCCC1 joue bien un rôle dans l'homéostasie au manganèse. Nous avons transformé la souche de levure *ccc1Δ* afin de réaliser un test de complémentation. Elle présente une croissance comparable à la souche sauvage avec une sensibilité au manganèse débutant à 40 mM de Mn^{2+} . Cette souche présente cependant une sensibilité accrue au fer, qui a déjà été mise en avant (Li et al, 2001). Ce phénotype a ainsi été testé et nous pouvons voir sur la figure 84, que la sensibilité au Fe^{2+} de *ccc1Δ* est complétement par PcCCC1 lorsque ces souches sont mises en culture sur 5,25 mM Fe^{2+} . Au vu de ces résultats, nous avons décidé de tester si l'expression de PcCCC1 complémenterait également une sensibilité au Mn^{2+} .

Le principal mécanisme impliqué dans l'homéostasie au manganèse chez *S. cerevisiae* passe par la voie de sécrétion et implique un transporteur de type P-ATPase nommé PMR1 qui va permettre le transfert du Mn^{2+} du cytosol vers l'appareil de Golgi. Ce dernier est ensuite relargué *via* des vésicules d'exocytose. La souche *pmr1Δ* présente une sensibilité élevée au Mn^{2+} , le phénotype de sensibilité est ainsi visible à partir de 1 mM de Mn^{2+} . Nous avons donc choisi la souche *pmr1Δ* pour étudier le phénotype associé à la complémentation par CCC1. Lorsque cette dernière est transformée avec le plasmide pFL61 portant PcCCC1, elle devient plus résistante au Mn^{2+} (Fig. 85), cependant elle ne permet pas de récupérer totalement le phénotype sauvage puisqu'une concentration de 5 mM de Mn^{2+} devient toxique pour *pmr1ΔPcCCC1*.

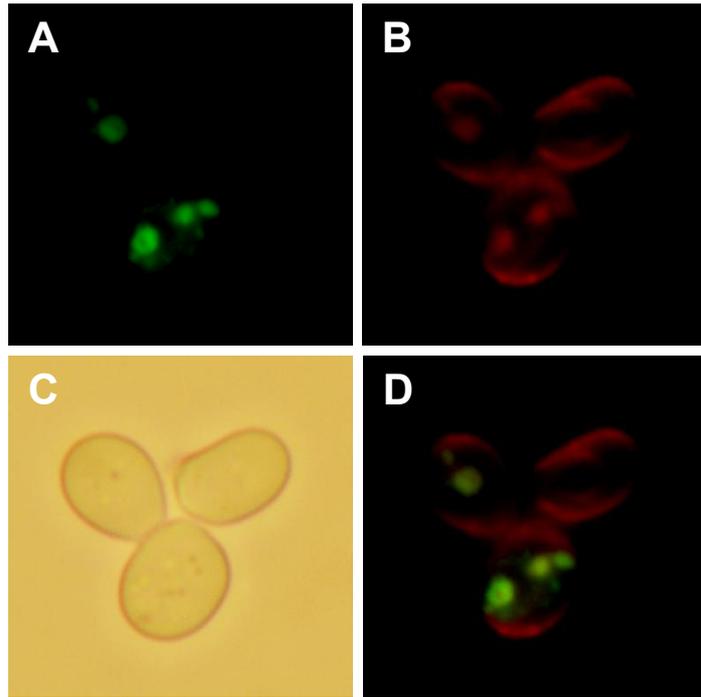


Figure 86 : Image en microscopie à fluorescence de levures exprimant PcCCC1:GFP (A), marquées par du FM4-64 (B), en DIC (C) et merge (D) après une nuit en culture liquide.

3.3.4 LOCALISATION INTRACELLULAIRE

Le gène a été inséré dans le vecteur pYES2-GFP afin de déterminer la localisation sub-cellulaire de la protéine. La fluorescence de la GFP est retrouvée au niveau de vésicules (Fig.86). Un marquage de ces mêmes cellules avec le colorant fluorescent FM4-64 (spécifique du plasmalemme et des vésicules vacuolaires), montre une localisation similaire. Ce résultat indique que PcCCC1 semble bien être localisée au niveau de la membrane de la vacuole.

Ces données mettent en évidence que PcCCC1 est une protéine vacuolaire qui permet de protéger la cellule contre un excès de Fe^{2+} et de Mn^{2+} . Son rôle semblerait donc identique à ScCCC1, à savoir le stockage vacuolaire de ces métaux. L'ajout de Mn^{2+} ou de Fe^{2+} n'a pas permis de mettre en évidence une différence du niveau d'expression de PcCCC1. Le mécanisme de régulation pourrait donc être différent de celui de *S. cerevisiae*. Cependant les conditions utilisées ne sont pas identiques et du Fe^{2+} est présent dans tous les milieux de culture, ce qui peut induire l'expression de PcCCC1. Il a été démontré qu'un autre mécanisme faisant intervenir Cth1 et Cth2, permet également de réguler négativement la quantité de protéine CCC1 *via* un mécanisme de dégradation de l'ARNm (Puig et al, 2005). L'expression de cth2 est régulée par AFT1 qui joue un rôle dans l'homéostasie du Fer au niveau du cytoplasme et permet de réguler l'expression des transporteurs impliqués dans l'apport en Fe^{2+} (Berthelet et al, 2010). Ce mécanisme pourrait être essentiel afin de limiter la quantité de transcrite de PcCCC1 lorsque la quantité de Fe devient limitante. Des expériences supplémentaires en carence en Fe pourraient répondre à cette question.

Espèce	MC (MTM1)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	●
<i>Candida albicans</i>	1	●
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	●
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	●
<i>Coccidioides immitis</i>	1	●
<i>Botrytis cinerea</i>	1	■
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	▲
<i>Magnaporthe grisea</i>	1	▲
<i>Neurospora crassa</i>	1	▲
<i>Alternaria brassicicola</i>	1	◆
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1	◆
<i>Ustilago maydis</i>	1	●
<i>Coprinus cinereus</i>	1	●
<i>Laccaria bicolor</i>	1	●
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	●
<i>Schizophyllum commune</i>	1	●
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	●
<i>Postia placenta</i>	1	●
<i>Heterobasidion annosum</i>	1	●
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	■
<i>Tremella mesenterica</i>	1	■
<i>Fusicoccia graminis</i>	1	●
<i>Melampsora larici-populina</i>	1	●
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	■
<i>Rhizopus oryzae</i>	2	●
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	1	●
Total	27	

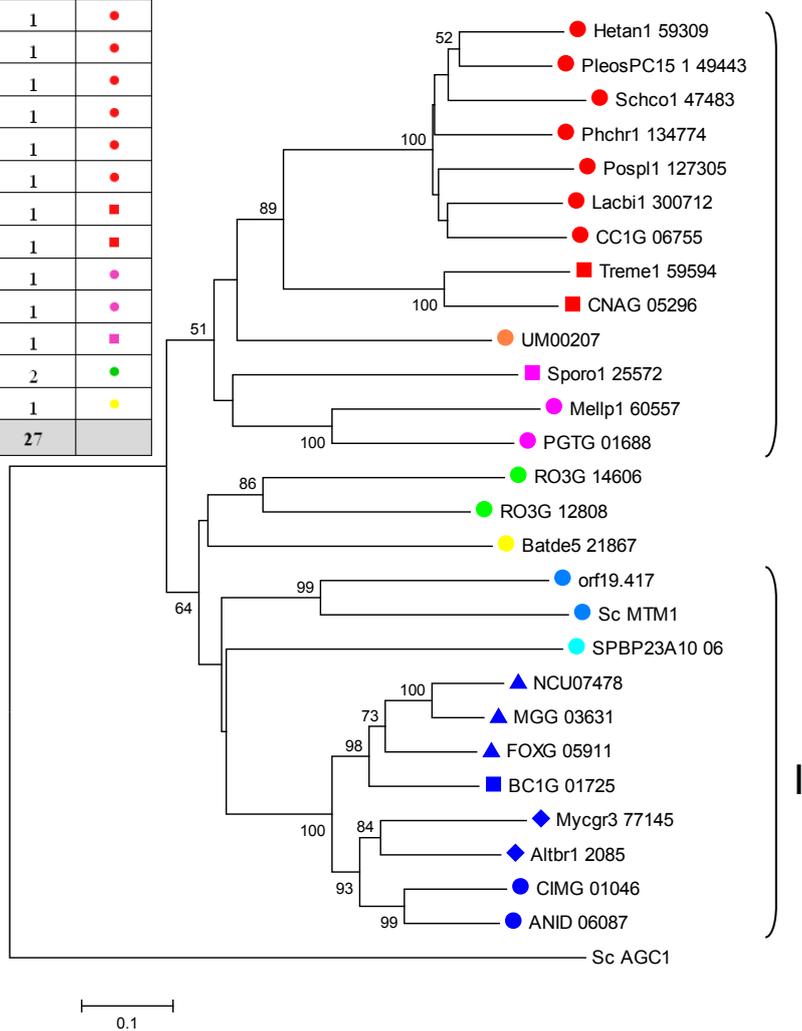


Figure 87 : Arbre phylogénétique présentant les orthologues de MTM1 de *S. cerevisiae*. Le tableau présent dans la figure reprend le nombre de transporteurs présent pour chaque organisme. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions. AGC1, un transporteur de la superfamille des MC a été utilisé comme outgroup.

3.4 FAMILLE MTM (MC, TC 2.A.29)

Les MCs (Mitochondrial Carrier) sont des perméases se trouvant exclusivement dans les organites eucaryotes et qui sont codés par l'ADN nucléaire. La plupart des MCs sont localisées au niveau des mitochondries, mais certaines peuvent se trouver dans les peroxyosomes chez les animaux, dans les hydrogénosomes de certains champignons anaérobies, et dans les amyloplastes de plantes (Saier Jr, 2000; Saier Jr et al, 2009). MTM1 est un représentant de la famille des MCs qui est localisé sur les membranes des mitochondries chez *S. cerevisiae* et a été isolé comme une protéine potentiellement impliquée dans le trafic du Mn^{2+} (Luk et al, 2003). Cependant son rôle ne se limiterait pas à celui d'un simple transporteur car sa délétion chez la levure entraîne l'inactivation de la SOD2 malgré la présence de Mn^{2+} au niveau de la mitochondrie. MTM1 jouerait donc potentiellement un rôle de chaperone car, en son absence, seule une complémentation avec des concentrations élevées en Mn^{2+} permet de restaurer la fonction de la SOD2 (Luk et al, 2003).

3.4.1 ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE DES MTM FONGIQUES

L'analyse de l'arbre phylogénétique permet de mettre en avant la présence de la protéine MTM1 dans les différents groupes de champignons étudiés, ce qui souligne son importance au niveau cellulaire (Fig.87) (Annexe 2). La phylogénie est parfaitement respectée avec les Basidiomycota et les Ascomytota regroupés respectivement dans le cluster I et le cluster II. De plus, nous pouvons constater que chaque classe d'organismes est regroupée dans une même sous-branche. Sur tous les organismes étudiés, un seul présente 2 orthologues de la protéine MTM1, il s'agit de *R. oryzae*. L'étude d'autres Mucorales (*P. blakesleeanus* et *M. circinelloides*) permet de mettre en évidence qu'il y a aussi eu un évènement de duplication.

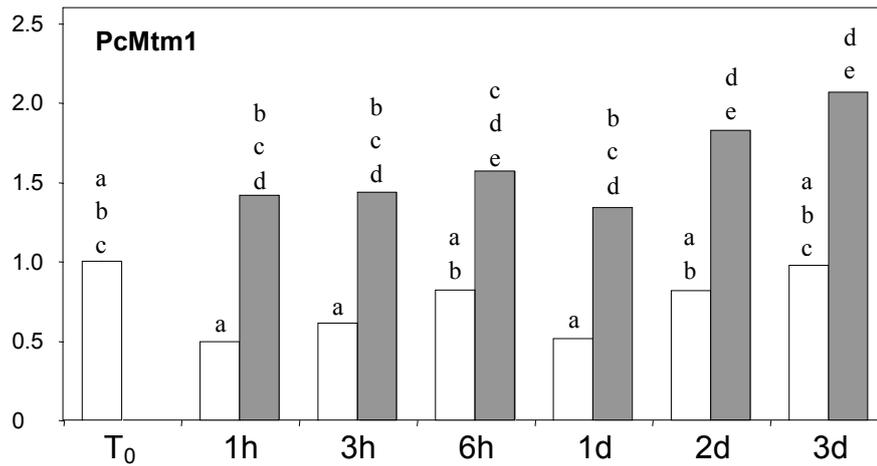


Figure 88 : Expression du gène PcMtm1 de *Phanerochaete chrysosporium* en présence (barres grises) ou en absence de manganèse (barres blanches) dans le milieu de culture. L'expression a été normalisée par rapport à l'expression de la Gpd ; des résultats identiques sont obtenus en normalisant par rapport à l'expression de l'actine. Une lettre différente indique une différence statistiquement significative avec une $P\text{value} \leq 0,05$.

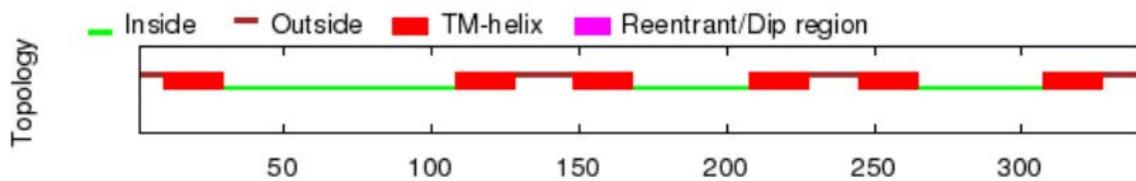


Figure 89 : Prédiction de la structure de la protéine Mtm1 de *P. chrysosporium* obtenue à l'aide du programme OCTOPUS.

3.4.2 EXPRESSION DE PCMTM1

L'étude des niveaux d'expression indique que la transcription de PcMtm1 est statistiquement plus élevée sur milieu enrichi en Mn^{2+} (Fig.88), quel que soit le temps de prélèvement. Cependant les valeurs d'expression en présence de Mn^{2+} ne sont pas, sur la durée de notre étude, statistiquement plus élevées, les valeurs étant en effet généralement proches de la valeur d'expression initiale (T_0). Seules les valeurs à 2 et 3 jours sont statistiquement différentes de celle obtenue à T_0 .

3.4.3 COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE DE *MTM1A*

PcMtm1 a été isolé et cloné dans le vecteur pGEMT-easy. L'analyse de la séquence de PcMtm1 *via* le programme Octopus permet de mettre en évidence une topologie avec 6 domaines transmembranaires (Fig.89). Cette topologie est en accord avec celle prévue pour la protéine MTM1 de *S. cerevisiae*, cependant, le modèle prédit présente un défaut dans les deux cas : les domaines non trans-membranaires les plus longs sont prédit comme étant cytosoliques alors qu'en réalité ils sont certainement du côté de la matrice mitochondriale (Klingenberg, 2008; Pebay-Peyroula et al, 2003).

PcMtm1 a ensuite été sous-cloné dans le pFL61 pour transformer la souche *mtm1A*. Cette dernière est incapable de croître sur une source de carbone non fermentable comme du glycérol. Malgré l'obtention de souches auxotrophes à l'uracile, nous n'avons pas réussi à obtenir une complémentation fonctionnelle de la souche mutante *mtm1A* avec l'homologue de *P. chrysosporium*.

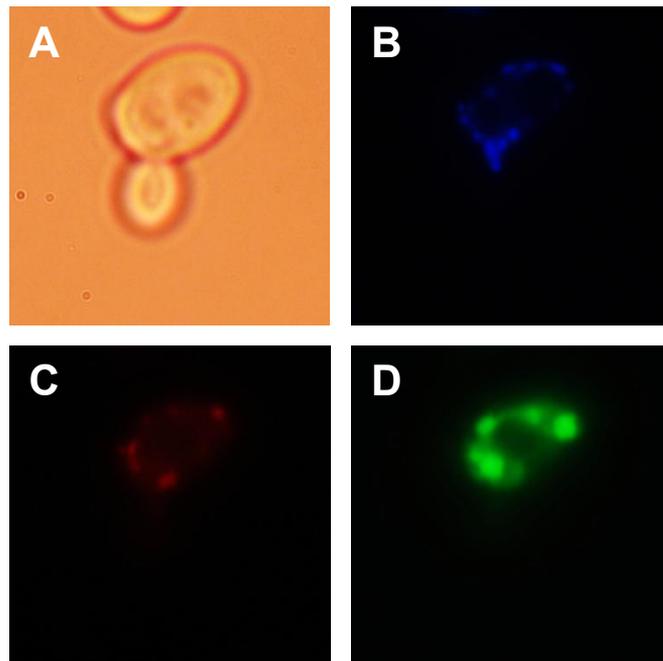


Figure 90 : Image en microscopie à fluorescence de levures (A) exprimant PcMTM1:GFP (D), marquées par du DAPI (B) et du Mitotracker (C) après une nuit en culture liquide.

3.4.4 LOCALISATION DE *PCMTM1*

PcMTM1 a été cloné dans le pYES2GFP afin de vérifier si ce dernier était exprimé et également de le localiser le cas échéant. Nous pouvons constater sur la figure 90 que les cellules transformées avec PcMTM1 présentent bien de la fluorescence. Cependant, cette dernière ne semble pas être colocalisée avec celle émise par le DAPI ou le Mitotracker.

PcMTM1 est donc bien exprimé dans *S.cerevisiae*, mais l'adressage de la protéine vers la mitochondrie ne semble pas se faire correctement. Ceci expliquerait qu'il n'y a pas de complémentation.

Espèce	P2A-ATPASE (PMR1)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 ●
<i>Candida albicans</i>	1 ●
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1 ●
<i>Aspergillus nidulans</i>	1 ●
<i>Coccidioides immitis</i>	1 ●
<i>Botrytis cinerea</i>	1 ■
<i>Fusarium oxysporum</i>	1 ▲
<i>Magnaporthe grisea</i>	1 ▲
<i>Neurospora crassa</i>	1 ▲
<i>Alternaria brassicicola</i>	1 ◆
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1 ◆
<i>Ustilago maydis</i>	1 ●
<i>Coprinus cinereus</i>	1 ●
<i>Laccaria bicolor</i>	1 ●
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1 ●
<i>Schizophyllum commune</i>	1 ●
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1 ●
<i>Postia placenta</i>	2 ●
<i>Heterobasidion annosum</i>	1 ●
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 ■
<i>Tremella mesenterica</i>	1 ■
<i>Fuccinia graminis</i>	1 ●
<i>Melampsora larici-populina</i>	1 ●
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1 ■
<i>Rhizopus oryzae</i>	1 ●
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	1 ●
Total	27

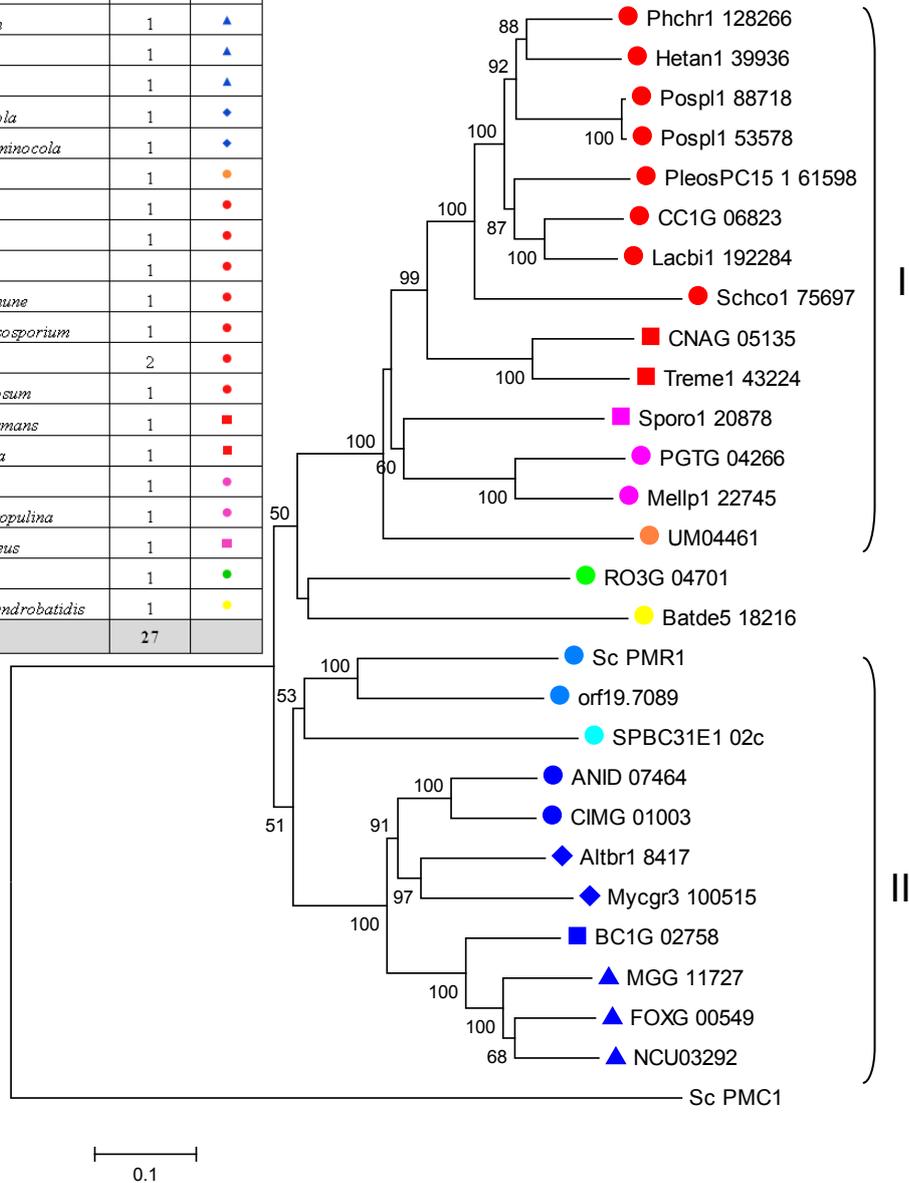


Figure 91 : Arbre phylogénétique présentant les orthologues de PMR1 de *S. cerevisiae*. Le tableau présent dans la figure reprend le nombre de transporteurs présent pour chaque organisme. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions. PMC1, un autre transporteur de la superfamille des P-ATPases a été utilisé comme outgroup.

3.5 ORTHOLOGUES DE PMR1 (P-ATPASE, TC 3.A.3).

Les P-ATPases sont des transporteurs capables de prendre en charge des ions et de les transloquer à travers les membranes biologiques en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Chez *S. cerevisiae* PMR1, une P₂A-ATPase, prend en charge le Ca²⁺ afin de le transporter du cytosol vers la lumière de l'appareil de Golgi. Le Ca²⁺, ainsi que le Mn²⁺ qu'il transporte également, sont nécessaires pour différents mécanismes permettant le fonctionnement de la voie de sécrétion des protéines. Ce transporteur fournit donc le Ca²⁺ et le Mn²⁺ nécessaire pour certaines réactions biochimiques nécessitant ces cofacteurs et représente la principale voie de détoxification du Mn²⁺ chez *S. cerevisiae* où il a été initialement découvert et caractérisé (Rudolph et al, 1989). Il a été déterminé que différents résidus jouaient un rôle dans le transport du Ca²⁺ et/ou du Mn²⁺, ainsi en mutant le résidu glutamine en position 783 il y a une diminution de la sélectivité pour le Mn²⁺, mais pas pour le Ca²⁺. A l'inverse, le résidu 778 est nécessaire pour le transport des deux cations (Mandal et al, 2000). Des orthologues ont été découverts dans d'autres champignons comme *Kluyveromyces lactis* (Feng et al, 2011), *Yarrowia lipolytica* (Park et al, 1998), *Hansenula polymorpha* (Agaphonov et al, 2007), *S. pombe* (Maeda et al, 2004), *Aspergillus niger* (Yang et al, 2001), *Aspergillus fumigatus* (Soriani et al, 2005), *Candida albicans* (Bates et al, 2005) ou encore *Pichia pastoris* (Dux & Inan, 2006).

3.5.1 ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE DES PMR1 FONGIQUES

Un premier crible a permis de mettre en évidence plus de 200 protéines putatives de type P-ATPase, cependant un grand nombre n'est pas impliqué dans le transport du Mn²⁺. En utilisant comme référence d'autres P-ATPases précédemment caractérisées comme PCM1, qui ne transporte pas de manganèse, nous avons pu éliminer leurs orthologues potentiels. Le nombre d'orthologues de PMR1 est parfaitement conservé avec une protéine putative par organisme à l'exception de *P. placenta* qui en possède potentiellement deux (Fig.91) (Annexe 2). L'arbre généré par MEGA respecte parfaitement la phylogénie des espèces et l'on retrouve deux clusters principaux, à savoir, un pour les Basidiomycota (cluster I) et un pour les Ascomycota (cluster II). Comme précédemment, chaque classe est présente dans une même sous-branche.

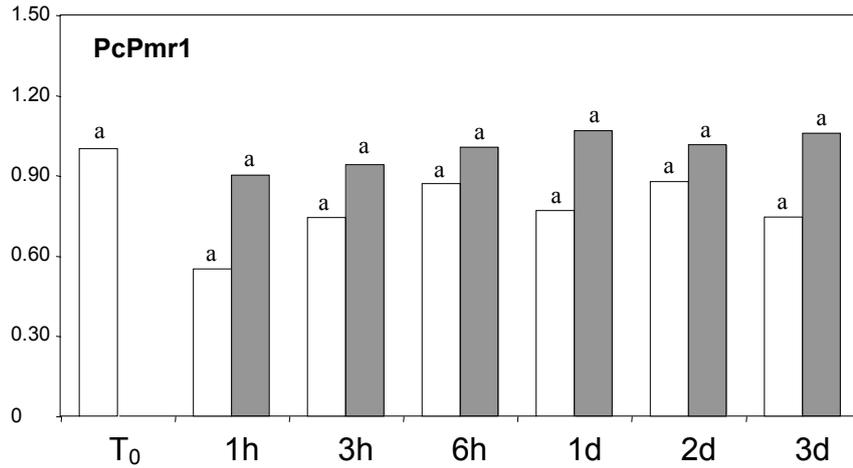


Figure 92 : Expression de PcPmr1 de *Phanerochaete chrysosporium* en présence (barres grises) ou en absence de manganèse (barres blanches) dans le milieu de culture. L'expression a été normalisée par rapport à l'expression de la Gpd. Des résultats identiques sont obtenus en normalisant par rapport à l'expression de l'actine. Une lettre différente indique une différence statistiquement significative avec une $P\text{value} \leq 0,05$.



Figure 93 : Expression de PcPmr1 de *Phanerochaete chrysosporium*. L'expression de PcPmr1 a été étudiée en présence de différentes concentrations de Mn²⁺ (5 et 20 mM) ou de Fe²⁺ (1 mM).

3.5.2 EXPRESSION DE PCPMR1

Les niveaux d'expression de PcPmr1 mesurés par RT-PCR ne sont pas corrélés avec l'absence ou la présence de Mn^{2+} (Fig.92), l'expression reste en effet stable au cours de nos expériences dans les deux conditions.

L'ajout de concentrations plus importantes en manganèse (Fig.93) n'induit pas de variations de l'expression de PcPmr1. Des orthologues de PMR1 ont été caractérisés fonctionnellement dans d'autres champignons et il a été démontré qu'ils jouaient un rôle dans le transport du Mn^{2+} . Ces résultats suggèrent donc que PcPmr1 code potentiellement pour un orthologue de ScPMR1.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120
PcPmr1genomique : GCGCTCCCGTTCCACGTCGAACGCAACCACGACCCAGCAGCCGCGGACGCGCCGCTCTGACCCGCGACCGGGATGCAGCATGGCGTTGAACGGAAAAAGATCCCCCGCCAGGCACACCGGC : 120
PcPMR1          : -----
PcPmr1RACE-PCR : AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGACCCAGCAGCCGCGGACGCGCCGCTCTGACCCGCGACCGGGATGCAGCATGGCGTTGAACGGAAAAAGATCCCCCGCCAGGCACACCGGC : 120
upm            : AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGG
PcPmr1F1       : -----
PcPmr1F2       : -----ATGGCGCTTGAACGGAAAAAGAT----- : 22

*      140     *      160     *      180     *      200     *      220     *      240
PcPmr1genomique : CTCGGCCAGCAGTCCCTGGTGTCCAGCAGTCCCTCGAGCTCAGCGGTATGCCAGACACACCTTCCGCTCCGAACACCTGCCACCGCTCGCAGCTCGACATCGGCCCTGGCTCAGCATAAC : 240
PcPMR1          : -----
PcPmr1RACE-PCR : CTCGGCCAGCAGTCCCTGGTGTCCAGCAGTCCCTCGAGCTCAGCGGTATGCCAGACACACCTTCCGCTCCGAACACCTGCCACCGCTCGCAGCTCGACATCGGCCCTGGCTCAGCATAAC : 240
upm            : -----
PcPmr1F1       : -----
PcPmr1F2       : -----

*      260     *      280     *      300     *      320     *      340     *      360
PcPmr1genomique : TTCACCCATTATGCCAACGATGACTCTCATGTCTCCGAGCCGACCGCTTCCGGAGCCGACACCGCCGCTTCCGGTACAGCACAAACCTCGCGAGACACTATCCGAGCCGCTGACCTTCCCT : 360
PcPMR1          : -----
PcPmr1RACE-PCR : TTCACCCATTATGCCAACGATGACTCTCATGTCTCCGAGCCGACCGCTTCCGGAGCCGACACCGCCGCTTCCGGTACAGCACAAACCTCGCGAGACACTATCCGAGCCGCTGACCTTCCCT : 360
upm            : -----
PcPmr1F1       : -----
PcPmr1F2       : -----

*      380     *      400     *      420     *      440     *      460     *      480
PcPmr1genomique : CCGACACCTCGGCCAAATTCGACGAGTTGAGGCATGTTGTTGCCGAGGAAGGACCTGCTGATCTTCCAACGACTCGTTGACTTCGTCAAAGTCAACACTCCCAAGCTCGCAGGGCGGG : 480
PcPMR1          : -----
PcPmr1RACE-PCR : CCGACACCTCGGCCAAATTCGACGAGTTGAGGCATGTTGTTGCCGAGGAAGGACCTGCTGATCTTCCAACGACTCGTTGACTTCGTCAAAGTCAACACTCCCAAGCTCGCAGGGCGGG : 480
upm            : -----
PcPmr1F1       : -----
PcPmr1F2       : -----

*      500     *      520     *      540     *      560     *      580     *      600
PcPmr1genomique : GACTATGAGAGGCTACCCGCTACATAGGGAAGAAACGAAGGATACGCCCTCTCGCCGTTCCACACATATTCATAGAGATGTTACCCTTCTCTGCGCTGTCCCGCTTGTCAATAACCA : 600
PcPMR1          : -----
PcPmr1RACE-PCR : GACTATGAGAGGCTACCCGCTACATAGGGAAGAAACGAAGGATACGCCCTCTCGCCGTTCCACACATATTCATAGAGATGTTACCCTTCTCTGCGCTGTCCCGCTTGTCAATAACCA : 558
upm            : -----
PcPmr1F1       : -----
PcPmr1F2       : -----

*      620     *      640     *      660     *      680     *      700     *      720
PcPmr1genomique : ATGCGGAACTCATGCGGTTGTTCCAGGATACCCCTCGCATACTTCCACACTTCCCGGACCGAAGGCGCTTGGCTCCGCCACAGTCCCGCCCTGCAATCGACCCACGGGTACAACGAGTTC : 720
PcPMR1          : -----ATGCGGTTTCCAGGATACCCCTCGCATACTTCCACACTTCCCGGACCGAAGGCGCTTGGCTCCGCCACAGTCCCGCCCTGCAATCGACCCACGGGTACAACGAGTTC : 108
PcPmr1RACE-PCR : -----GATACCCCTCGCATACTTCCACACTTCCCGGACCGAAGGCGCTTGGCTCCGCCACAGTCCCGCCCTGCAATCGACCCACGGGTACAACGAGTTC : 651
upm            : -----
PcPmr1F1       : -----ATGCGGCTTGAACGGAAAAAGCA----- : 22
PcPmr1F2       : -----

```

Figure 94 : Détermination du codon d'initiation de PcPMR1 grâce à la technique de Race-PCR. La séquence obtenue par Race-PCR a été aligné avec l'ADN génomique ainsi que l'ADNc de la protéine initialement prédite. Les séquences des amorces utilisées ont également été ajoutées : upm (Universal Primer Mix) est une amorce de Race-PCR, PcPmr1F1 est l'amorce sens initialement prévue et PcPmr1F2 l'amorce sens déduite de l'alignement.

3.5.3 COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE

Nous avons ensuite voulu cloner PcPmr1 afin de le caractériser fonctionnellement en système hétérologue. Lors de l'étude de son expression nous avons utilisé une amorce Sens interne et l'amorce STOP. Nous n'avons pas réussi à amplifier PcPmr1 à l'aide de l'amorce Sens contenant le codon d'initiation initialement prévu (Fig.94 PcPmr1F1). Nous avons alors décidé de vérifier par RACE-PCR la séquence de l'ARNm suivant le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes. Cela nous a permis de déterminer que l'amorce Sens utilisée initialement (Fig. 94 PcPmr1F1) est partiellement localisée au niveau d'un intron. Une nouvelle amorce (PcPmr1F2) basée sur ces données a alors été générée.

Malgré l'utilisation de cette nouvelle amorce, nous n'avons pas réussi à amplifier le gène dans sa totalité. Diverses amorces internes ont alors été générées et ont permis d'amplifier une région d'environ 2 kb à partir du codon d'initiation et une région d'environ 700 b contenant le codon Stop. Au final sur les 3,3 kb que contient notre gène, il nous a été impossible d'amplifier une région d'environ 600 b située entre les régions précédemment décrites malgré l'utilisation d'amorces spécifiques générées sur les régions qui ont été clonées.

Espèce	ATX2 (ZIP)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	●
<i>Candida albicans</i>	1	●
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	●
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	●
<i>Coccidioides immitis</i>	1	●
<i>Botrytis cinerea</i>	1	■
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	▲
<i>Magnaporthe grisea</i>	1	▲
<i>Neurospora crassa</i>	1	▲
<i>Alternaria brassicicola</i>	1	◆
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1	◆
<i>Ustilago maydis</i>	1	●
<i>Coprinus cinereus</i>	1	●
<i>Laccaria bicolor</i>	1	●
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	●
<i>Schizophyllum commune</i>	1	●
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	●
<i>Postia placenta</i>	1	●
<i>Heterobasidion annosum</i>	1	●
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	■
<i>Tremella mesenterica</i>	1	■
<i>Fuccinia graminis</i>	1	●
<i>Melampsora larici-populina</i>	1	●
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	■
<i>Rhizopus oryzae</i>	1	●
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	1	●
Total	25	

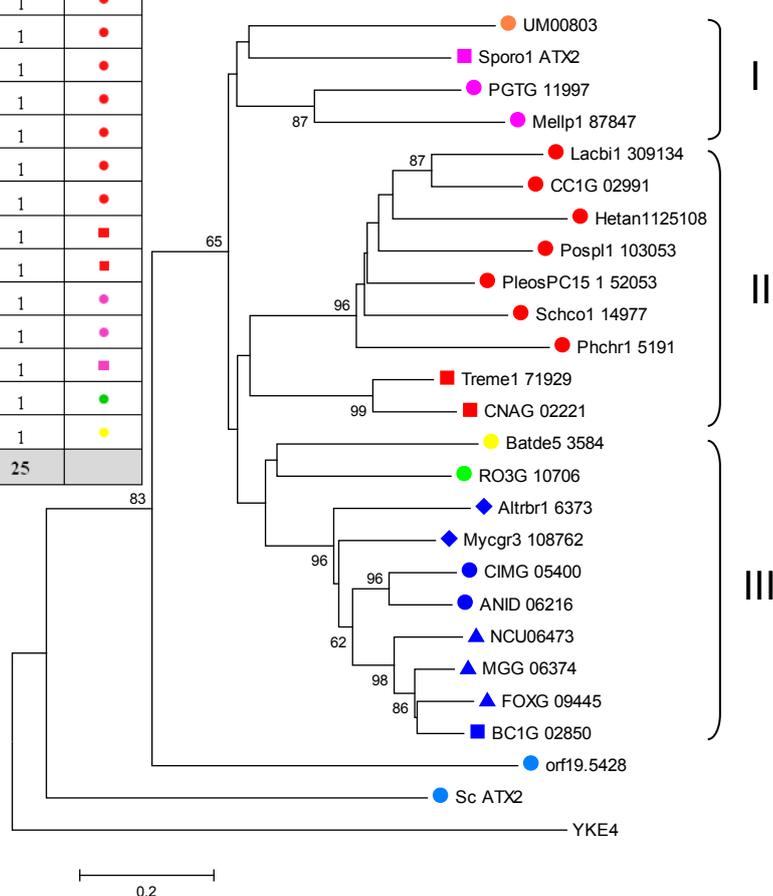


Figure 95 : Arbre phylogénétique présentant les orthologues de ScATX2. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions. YKE4, un autre transporteur de la superfamille des ZIPs a été utilisé comme outgroup.

3.6 FAMILLE ATX2 (ZIP, TC 2.A.5)

ATX2 est un membre de la famille des ZIP (Zinc-Iron Permease; TC 2.A.5) que l'on retrouve dans tous les règnes du vivant. Il a été démontré chez *S. cerevisiae* qu'ATX2 est localisé au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi et qu'il était capable de jouer un rôle dans l'homéostasie au Mn^{2+} (Lin & Culotta, 1996).

3.6.1 ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE DES ORTHOLOGUES FONGIQUES DE ATX2.

Notre analyse révèle que tous les organismes étudiés possèdent un orthologue, et un seul, de ScATX2. Il y a cependant une exception notable, il s'agit de *S. pombe*. Ce dernier ne présente en effet pas d'orthologue de cette protéine (Fig.95) (Annexe 2). Cette exception a été confirmée dans le groupe des Schizosaccharomyces au sein duquel d'autres membres, tels *S. cryophilus*, *S. octoporus* et *S. japonicus*, ne possèdent pas d'orthologues de ScATX2. Il est donc possible que la perte de ce gène ne concerne que la classe des Schizosaccharomycètes.

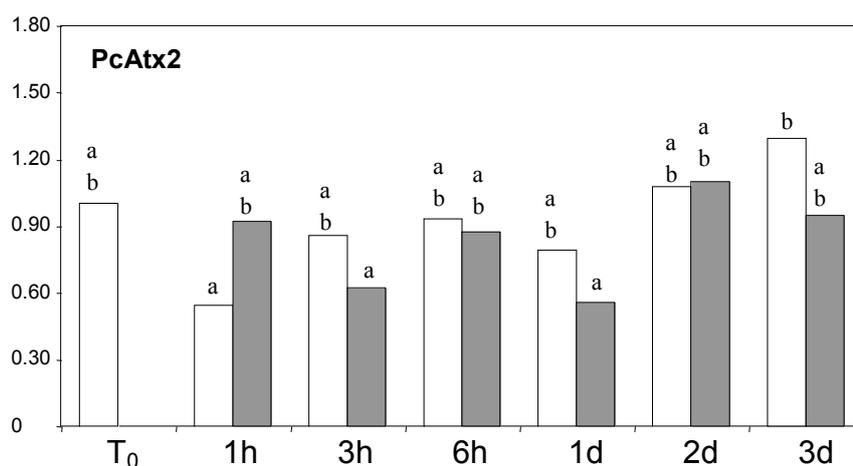


Figure 96 : Expression de PcAtx2 de *Phanerochaete chrysosporium* en présence (barres grises) ou en absence de manganèse (barres blanches) dans le milieu de culture. L'expression a été normalisée par rapport à l'expression de la Gpd, des résultats identiques sont obtenus en normalisant par rapport à l'expression de l'actine. Une lettre différente indique une différence statistiquement significative avec une Pvalue $\leq 0,05$.

	- Mn ²⁺				Mn ²⁺ 5mM				Mn ²⁺ 20mM				Fe ²⁺ 1mM			
	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j	1h	3h	6h	1j
PcAtx2	[Western blot bands for PcAtx2 showing consistent intensity across all conditions]															
Gpd	[Western blot bands for Gpd showing consistent intensity across all conditions]															
Act	[Western blot bands for Act showing consistent intensity across all conditions]															

Figure 97 : Expression de PcAtx2 de *Phanerochaete chrysosporium*. L'expression de PcAtx2 ne présente pas de variation significative durant les expérimentations. De même l'ajout de quantité variable de Mn²⁺ ou de Fe²⁺ n'engendre pas de changement au niveau de l'expression.

3.6.2 EXPRESSION DE PCATX2

Nous avons suivi l'expression de PcAtx2. Nous pouvons constater sur la figure 96 qu'il n'y a pas de différence d'expression significative au cours de notre expérience en présence ou en absence de manganèse.

Nous avons également testé l'effet d'un traitement avec une concentration plus importante de Mn^{2+} ou avec du Fe^{2+} (Fig.97). Comme lors de notre premier suivi du niveau d'expression, il ne semble pas y avoir de variation de l'expression de ce gène en fonction du traitement.

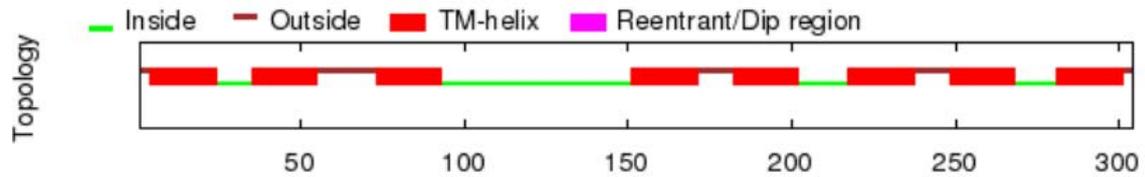


Figure 98 : Prédiction de structure de la protéine ATX2 de *P. chrysosporium* obtenue à l'aide du programme OCTOPUS.

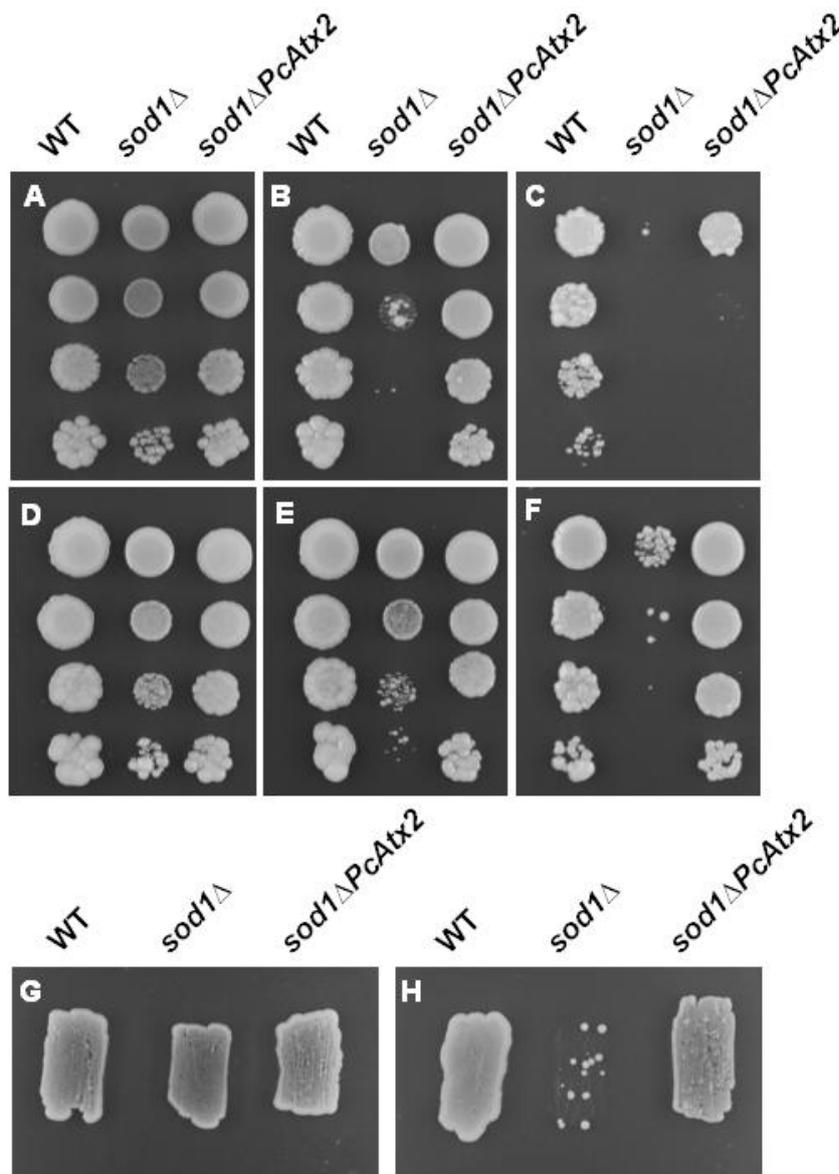


Figure 99 : Test de complémentation de la souche *sod1Δ* par *PcAtx2*.

La souche *sod1Δ* a été transformée avec *PcAtx2* ou avec le vecteur vide. Des dilutions successives ont été mises en culture sur des milieux contenant du paraquat (A et D : 0 μM , B et E : 100 μM , C et F : 600 μM) certains milieux ont été additionnés de 1mM de Mn (D, E et F). Les différentes souches ont également été déposées (100 μl à une DO de 1) sur un milieu carencé (H) ou non (G) en lysine.

3.6.3 COMPLÉMENTATION FONCTIONNELLE DE *SOD1A*

L'orthologue d'ATX2 de *P. chrysosporium* nommé PcATX2 a été isolé et cloné. L'étude de sa topologie permet de mettre en évidence la présence de 8 domaines transmembranaires, ce qui est en accord avec la conformation classique des ZIP (Fig.98). De plus, les extrémités N et C terminales sont prédites comme étant du côté extra-cytoplasmique, ce qui est également une caractéristique des protéines de ce type (Eide, 1998).

PcAtx2 a été intégré dans le vecteur pFL61. Afin de tester la fonction de ce dernier, la complémentation de la souche *atx2Δ* a été envisagée, mais cette dernière n'a pas présenté de phénotype particulier de sensibilité au manganèse. Une autre souche a donc été utilisée, à savoir *sod1Δ*. Ce mutant présente une croissance limitée sur un milieu contenant du paraquat du fait de la délétion de la SOD1, une enzyme impliquée dans la détoxification des ROS. Il a été démontré que cette sensibilité pouvait être compensée par l'addition de quantités plus importantes de manganèse qui joue alors un rôle d'antioxydant (Lin & Culotta, 1996). Différents cribles ont permis de mettre en évidence que cette mutation pouvait être complémentée par des gènes impliqués dans le transport du Mn^{2+} . Il a été mis en évidence que des systèmes liés à l'import du Mn^{2+} pouvaient compléter cette souche. Ainsi la délétion de BSD2, une protéine impliquée dans la dégradation de SMF1 et 2 permet de restaurer la croissance de la souche (Liu et al, 1997). La délétion de PMR1, qui est impliqué dans l'export du Mn^{2+} , permet également de compléter la perte de la SOD1 (Lapinskas et al, 1995). A l'inverse, il a été mis en évidence que la surexpression de ScAtx2 permettait de restaurer la croissance de la souche *sod1Δ* (Lin & Culotta, 1996). Il a également été démontré que la souche *sod1Δ* était incapable de se développer sur des milieux carencés en certains acides aminés, ainsi cette souche est auxotrophe pour la lysine. Des expériences chez un mutant de *S. pombe* ont démontré que la délétion de la SOD1 entraîne certainement l'inactivation de l'homocitratesynthase (Kwon et al, 2006).

Nous avons donc choisi de compléter la souche *sod1Δ* avec PcAtx2. La figure 100 (B et C) montre que la souche sauvage est capable de pousser sur toutes les concentrations de paraquat. A l'inverse *sod1Δ* présente un défaut de croissance dès 100 μM et n'est plus capable de croître quand la concentration atteint 600 μM . Lorsque cette souche est complémentée avec PcAtx2 la souche se développe mieux sur les différentes concentrations de paraquat par rapport à la souche *sod1Δ*. Cette dernière présente en effet un phénotype sauvage à 100 μM de paraquat, cependant, lorsque la concentration en paraquat devient élevée (600 μM), la croissance de la

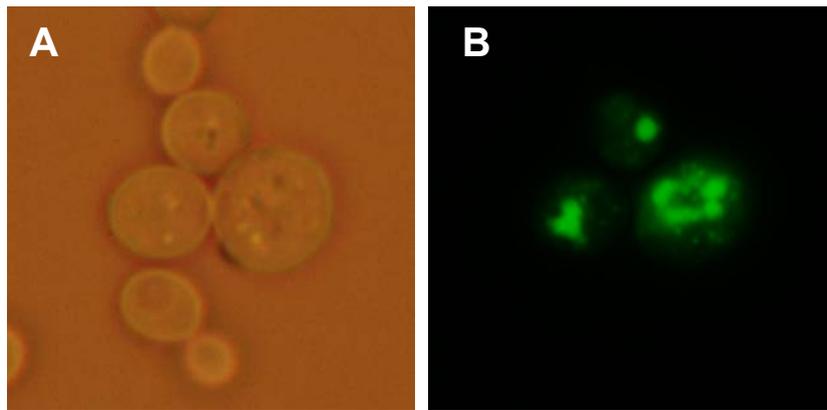


Figure 100 : Image en microscopie à fluorescence de levures (A) exprimant PcATX2:GFP (B). Le marquage obtenu correspond à des vésicules intracellulaires, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Lin (Lin & Culotta, 1996).

souche *sod1ΔPcAtx2* est plus faible que la croissance de la souche sauvage. Ceci signifie que dans ces conditions, la surexpression de PcAtx2 ne suffit pas pour compenser la perte de la SOD1. En ajoutant 1 mM de Mn^{2+} (Fig.99 D, E et F), les souches *sod1Δ* et *sod1ΔPcAtx2* montrent une croissance plus importante que la série sans ajout de Mn^{2+} . Cependant, cela ne suffit pas à restaurer le phénotype sauvage chez le mutant *sod1Δ*. A l'inverse, la souche contenant le plasmide codant PcAtx2 présente, dans ces conditions, un phénotype identique à la souche sauvage (Fig. 99).

L'effet de PcATX2 sur l'auxotrophie à la lysine a également été analysé. Il a été démontré que cette auxotrophie était le résultat du stress oxydatif provoqué par la délétion de la SOD cytosolique. Chez *S. cerevisiae* un stress oxydatif a été provoqué par l'ajout de 0.25 mM de paraquat, entraînant ce phénomène d'auxotrophie (Wallace et al, 2004). Il a pu être démontré que l'inactivation des enzymes était due à la perte de leur centre fer-soufre suite à un changement de l'état rédox intracellulaire.

La surexpression de PcAtx2 a permis de restaurer la croissance de la souche lorsque cette dernière est mise en culture sur un milieu carencé en lysine. Il a été démontré que le Mn^{2+} pouvait jouer un rôle de régulateur de l'état rédox en réagissant avec les ROS (Coassin et al, 1992), permettant ainsi de restaurer la croissance de cette souche en absence de lysine. L'accumulation plus importante de Mn^{2+} permettrait donc de restaurer la croissance et de jouer un rôle protecteur comme chez *Lactobacillus plantarum* qui est un organisme dépourvu de SOD et qui accumule des quantités plus importantes de Mn^{2+} afin de se protéger des espèces radicalaires (Archibald & Fridovich, 1981; Archibald & Fridovich, 1982a; Archibald & Fridovich, 1982b).

3.6.4 LOCALISATION INTRACELLULAIRE

La localisation intracellulaire de PcATX2 a été réalisée via sa fusion avec la GFP. La fluorescence obtenue est localisée dans le cytosol, au niveau de vésicules (Fig.100 A et B). Le même type de marquage avait été obtenu par Lin (Lin & Culotta, 1996) lors de l'étude d'ATX2 chez *S. cerevisiae* où il avait été démontré qu'ATX2 migre avec des vésicules golgiennes.

ScATX2 possède une large distribution d'homologues au sein des espèces fongiques, ce qui semble révéler un rôle important de cette protéine, cependant aucun homologue de ScATX2 n'avait encore été caractérisé fonctionnellement. Au vu des résultats que nous avons obtenus PcATX2 semble jouer un rôle identique chez *P. chrysosporium* à celui d'ATX2 de *S.cerevisiae*.

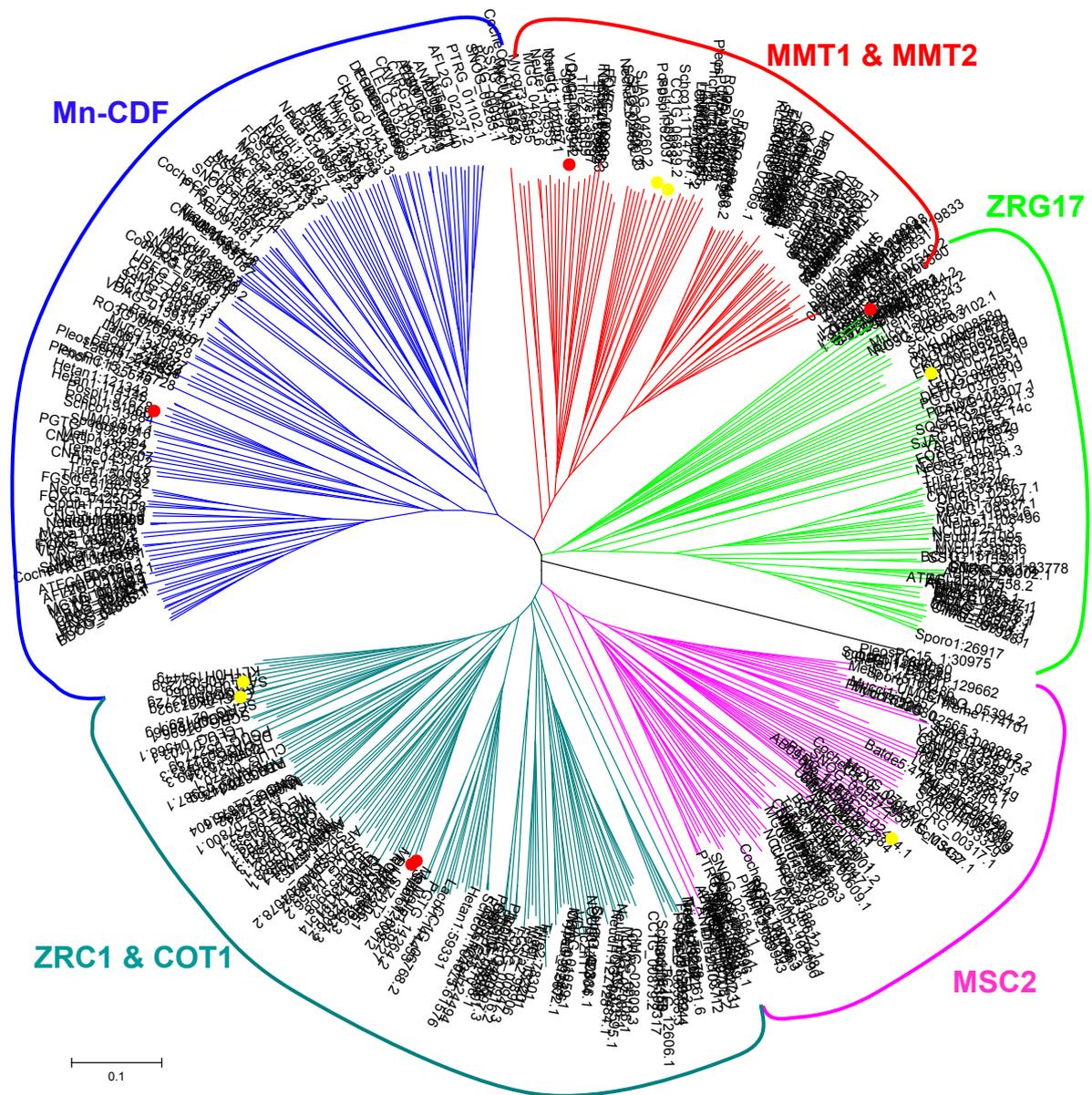


Figure 101 : Arbre phylogénétique présentant les membres de la famille des CDF. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les CDF de *S. cerevisiae* sont affichés en jaune avec le nom des protéines dans la couleur du cluster. Les CDF de *P. chrysosporium* sont indiqués en rouge.

3.7 MNT (CDF, TC 2.A.4)

Les transporteurs de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) sont des antiports qui catalysent l'efflux des métaux de transition à l'aide d'un gradient de proton ($\text{Me}^{2+} / \text{H}^+$ (K^+)). Il a été démontré qu'ils sont capables de prendre en charge Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} ou Mn^{2+} et permettent de diminuer leur concentration cytoplasmique en les expulsant à l'extérieur de la cellule ou en permettant leur stockage dans des compartiments subcellulaires (Montanini et al, 2007).

3.7.1 ETUDE PHYLOGÉNÉTIQUE

Plusieurs gènes codant des protéines de la famille CDFs sont présents dans le génome des organismes étudiés au cours de ce travail : ils possèdent en moyenne 6 CDF, le maximum étant de 14. L'organisme modèle *S. cerevisiae* en possède 6 tandis que *P. chryso sporium* n'en possède que 5. Des analyses ont permis de mettre en évidence plusieurs familles de CDF possédant des caractéristiques différentes tant en terme de localisation que de spécificité de substrat (Montanini et al, 2007). Une de ces familles de transporteurs a été caractérisée comme étant des transporteurs spécifiques de Mn^{2+} . Cette famille a été initialement caractérisée chez les plantes, tel ShMtp1, un CDF de *Stylosanthes hamata* (Delhaize et al, 2003), AtMtp11, un CDF présent chez *Arabidopsis thaliana* (Delhaize et al, 2007) ou encore PtrMtp11.1 et PtrMtp11.2 qui ont été clonés et caractérisés chez *Populus trichocarpa* (Peiter et al, 2007).

La figure 101 a été réalisée à partir d'un panel de 75 espèces fongiques pour un total de 484 protéines hypothétiques ou caractérisées, comme celles de *S. cerevisiae*. Cet arbre phylogénétique montre que les 5 CDFs de *P. chryso sporium* se répartissent dans différentes sous-familles. Il est à noter que si ce champignon possède 2 CDFs qui groupent dans le cluster contenant ZRC1 et COT1 de *S. cerevisiae*, il ne semble en revanche pas posséder d'orthologue de MSC2. Ces deux clusters regroupent des CDFs principalement impliqués dans le transport du Zn^{2+} (Kamizono et al, 1989; MacDiarmid et al, 2000a) même s'ils sont capables de transporter d'autres métaux, COT1 étant par exemple capable de prendre en charge le cobalt (Conklin et al, 1992).

Espèce	MnT (CDF)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	●
<i>Candida albicans</i>	1	●
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	●
<i>Aspergillus nidulans</i>	2	●
<i>Coccidioides immitis</i>	2	●
<i>Botrytis cinerea</i>	3	■
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	▲
<i>Magnaporthe grisea</i>	4	▲
<i>Neurospora crassa</i>	4	▲
<i>Alternaria brassicicola</i>	4	◆
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	3	◆
<i>Ustilago maydis</i>	2	●
<i>Coprinus cinereus</i>	1	●
<i>Laccaria bicolor</i>	4	●
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2	●
<i>Schizophyllum commune</i>	1	●
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	●
<i>Postia placenta</i>	2	●
<i>Heterobasidion annosum</i>	1	●
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	■
<i>Tremella mesenterica</i>	2	■
<i>Puccinia graminis</i>	3	●
<i>Melampsora larici-populina</i>	2	●
<i>Sporobolomyces roseus</i>	2	■
<i>Rhizopus oryzae</i>	2	●
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	1	●
Total	57	

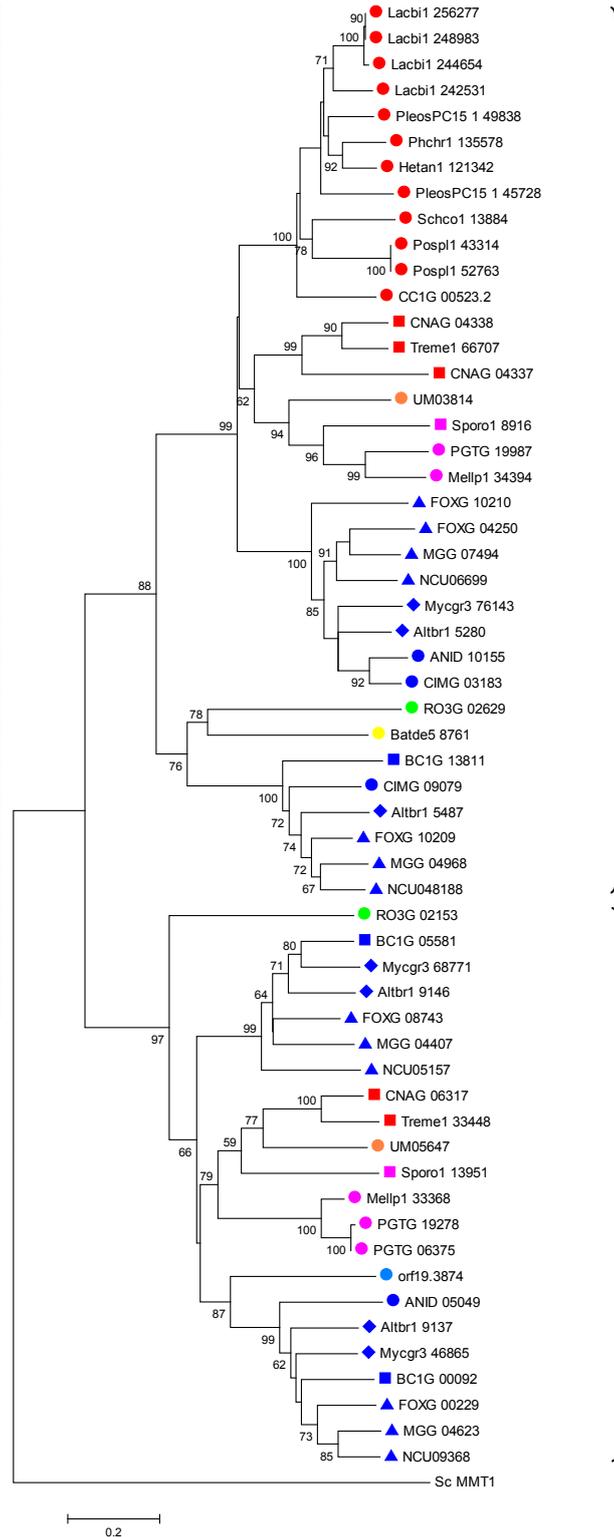


Figure 102 : Arbre phylogénétique présentant les MnT. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Le tableau présent dans la figure reprend le nombre de transporteurs présent chez chaque organisme. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions. MMT1, un autre transporteur de la superfamille des CDFs a été utilisé comme outgroup.

P. chryso sporium possède également un CDF qui groupe avec la protéine ZRG17 de *S. cerevisiae*. Il a été démontré que ScZrg17, localisé au niveau du réticulum endoplasmique, est également régulé par le zinc (Ellis et al, 2005).

Le cluster contenant MMT1 et MMT2 ne possède qu'une seule protéine de *P. chryso sporium*. Il a été démontré que ces protéines jouaient un rôle important dans l'homéostasie mitochondriale au Fe^{2+} (Li & Kaplan, 1997). La présence d'un seul gène chez *P. chryso sporium* est en accord avec les résultats proposant un rôle redondant pour MMT1 et MMT2.

Le dernier cluster (nommé Mn-CDF) ne possède pas de représentant chez *S. cerevisiae*. De précédentes analyses ont permis de mettre en évidence que ce cluster contient des CDF impliqués dans le transport du Mn^{2+} (Montanini et al, 2007). *P. chryso sporium* possède un CDF entrant dans cette famille et qui pourrait donc être impliqué dans les mouvements de ce cation. Cette famille va être étudiée plus en détails sur la figure 102.

L'étude du cluster contenant les CDF impliqués dans le transport du Mn permet de constater une variation de la distribution de ce transporteur entre les différents phylums (Fig.102) (Annexe 2). Le nombre de CDF, lorsqu'ils sont présents, varie entre un et cinq, le plus grand nombre étant trouvé chez *F. oxysporum*. La répartition varie également entre des espèces proches. *L. bicolor* possède par exemple 4 transporteurs potentiels de manganèse alors que *C. cinereus* et *S. commune* n'en possèdent qu'un malgré leur appartenance au même ordre.

Certaines espèces sont dépourvues de Mn-CDF ; ainsi *S. cerevisiae* et *S. pombe* ne possèdent pas de Mn-CDF.

Une étude approfondie dans le genre *Schizosaccharomyces* permet de mettre en évidence l'absence d'orthologue de cette protéine chez *S. japonicus* et *S. octosporus*. D'autres Taphrinomycotina comme des représentants des genres *Pneumocystis* ou *Taphrina* n'ont pas été étudiés. Cependant, l'étude de certains de ces organismes pourrait permettre de mettre en évidence si la disparition de ce gène ne concerne que le genre *Schizosaccharomyces* ou si cette délétion a lieu au niveau de la classe des Schizosaccharomycètes, voire au niveau du phylum des Taphrinomycotina.

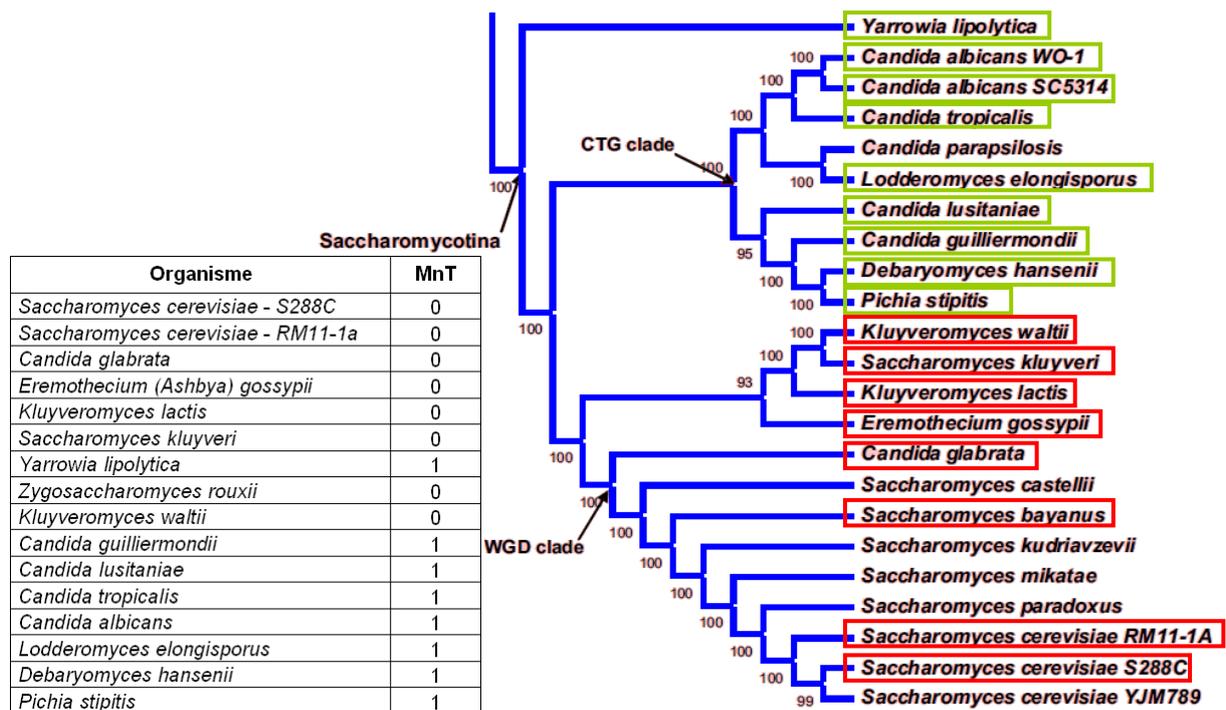


Figure 103 : Arbre phylogénétique de la famille des Saccharomycotina (Wang et al, 2009b). Les organismes pour lesquels la présence d'un Mn-CDF potentiel a été confirmée lors de cette étude ont été entourés en vert et les organismes ne possédant pas de MnT ont été entourés en rouge.

Aucun membre de la famille des Mn-CDF n'a été trouvé dans le génome de *S. cerevisiae*. Le génome d'une autre souche de *S. cerevisiae*, RM11-1a, a été étudié afin de vérifier si elle possédait un CDF impliqué dans le transport du manganèse, mais cette recherche s'est révélée infructueuse. Afin de générer l'arbre contenant toutes les familles de CDF (Fig.101) des espèces proches de *S.cerevisiae* ont également été étudiées, à savoir : *Candida glabrata*, *Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces waltii*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candidatropicalis*, *Candida albicans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mykatae* et *Saccharomyces paradoxus*. Lorsque des Mn-CDF sont présents dans le génome d'un Saccharomycotina, ils se regroupent tous dans le cluster II, à l'image du Mn-CDF de *C. albicans* nommé orf19.3874. La comparaison entre les organismes possédant ou non un CDF impliqué dans le transport du manganèse et des phylogénies précédemment établies (Fitzpatrick et al, 2006; Wang et al, 2009b) permet de mettre en corrélation l'évolution de ces organismes et la présence ou non de ces transporteurs (Fig.103). Nous pouvons ainsi constater que tous les organismes du clade CTG (remplacement de la leucine par une sérine) semblent contenir un CDF impliqué dans le transport du Mn^{2+} , alors que les membres du clade WGD et les organismes du genre *Kluyveromyces* et *Ashbia* n'en possèdent pas. Ce transporteur semble donc avoir été perdu dans ce sous-embranchement, son absence chez *Kluyveromyces* et *Ashbia* indiquant que la perte a eu lieu avant l'évènement de duplication du génome du cluster WGD. La présence de ce transporteur pourrait ainsi être considérée comme un « marqueur » génétique de l'évolution dans le phylum des Saccharomycotina.

L'étude de la phylogénie des Mn-CDF semble indiquer qu'un évènement de duplication et de différenciation a eu lieu de manière précoce au cours de l'évolution. L'arbre phylogénétique généré par le logiciel MEGA montre la présence de deux clusters distincts (Fig.102). Les principales classes d'organismes semblent présentes dans les deux clusters, cependant il est à noter que la classe des Agaricomycètes n'est pas présente dans le cluster II. La présence de Basidiomycota dans ce cluster se limite donc aux Pucciniomycotina, aux Ustilagomycotina et, dans le phylum des Agaricomycotina, aux Tremellomycètes. Cette absence d'Agaricomycètes dans le cluster II, alors que la plupart des autres organismes de notre étude y sont présents, indique un évènement de délétion précoce ayant eu lieu dans cette classe avant le phénomène de spéciation et explique que cette délétion semble aussi bien toucher l'ordre des Agaricales, des Corticiales, des Polyporales que des Russulales.

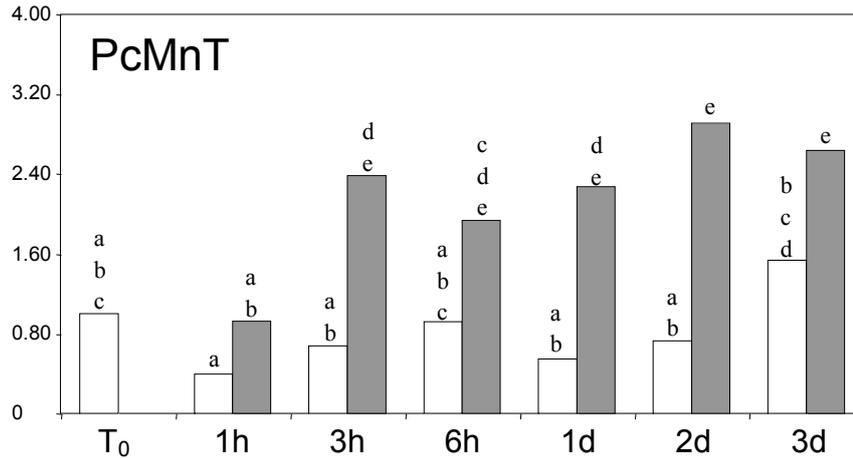


Figure 104 : Expression de PcMnT en présence (barres grises) ou en absence de manganèse (barres blanches) dans le milieu de culture. L'expression a été normalisée par rapport à l'expression de la Gpd, des résultats identiques sont obtenus en normalisant par rapport à l'expression de l'actine. Une lettre différente indique une différence statistiquement significative avec une $P\text{value} \leq 0,05$.

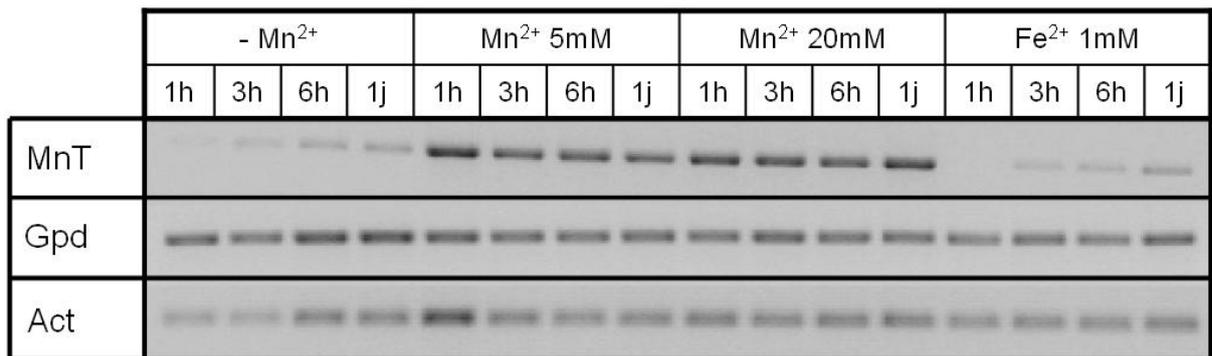


Figure 105 : Expression de PcMnT. L'expression de PcMnT a été étudiée en présence de différentes concentrations de Mn²⁺ (5 et 20 mM) ou de Fe²⁺ (1 mM).

3.7.2 EXPRESSION DE MNT

Le CDF de *P. chrysosporium* impliqué dans le transport du Mn^{2+} a été nommé PcMnT. Son expression a été suivie au cours du temps. La figure 104 montre que l'expression de ce transporteur est plus importante suite à l'addition de Mn^{2+} par rapport au niveau d'expression en carence à l'exception du temps 1h. Ce niveau d'expression semble donc être une réponse à la présence de Mn^{2+} .

Afin de vérifier cette hypothèse, l'expression de PcMnT a également été suivie en présence de 5 et 20 mM de Mn^{2+} et de 1 mM de Fe^{2+} . L'expression de PcMnT est bien plus importante en présence de Mn^{2+} (Fig.105). Elle est globalement 15 fois supérieure en présence de 5 mM de Mn^{2+} par rapport à l'expression en condition de carence. Nous pouvons également constater qu'il n'y a pas d'augmentation de l'expression de PcMnT suite à un traitement au Fe^{2+} .

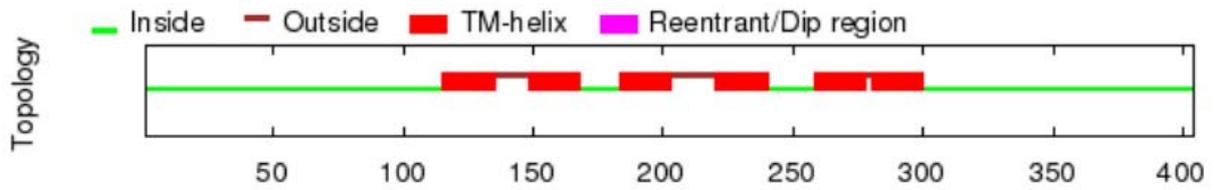


Figure 106 : Prédiction de structure de la protéine PcMnT obtenue à l'aide du programme OCTOPUS.

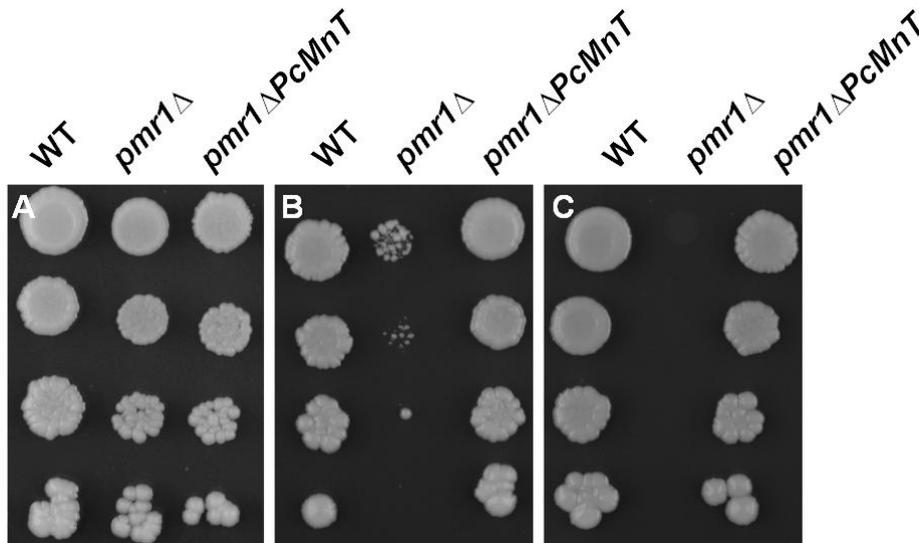


Figure 107 : Test de complémentation de la souche *pmr1Δ* par PcMnT. La souche *pmr1Δ* a été transformée avec le vecteur pFL61 vide ou avec le vecteur pFL61 portant PcMnT. Des dilutions successives ont été mises en culture sur un milieu non sélectif (A) et des milieux contenant des doses croissantes de manganèse (B : 1 mM et C : 5 mM). La souche sauvage (WT) transformée avec le pFL61 vide sert de témoin.

3.7.3 COMPLÉMENTATION EN SYSTÈME LEVURE

Le transporteur Mn-CDF de *P. chrysosporium* a été cloné dans le pGEM-Teasy. La traduction de la séquence a été analysée à l'aide du logiciel OCTOPUS. La figure 106 indique que la protéine prédite contient 6 domaines transmembranaires et que les deux extrémités sont prédites comme étant cytosoliques, ce qui est en accord avec les études précédentes concernant les CDF (Montanini et al, 2007).

En vue d'une caractérisation, PcMnT a été cloné dans le vecteur pFL61. La prédiction des domaines transmembranaires est en accord avec la topologie précédemment décrite (Fig.106). PcMnT a été utilisé pour transformer la souche *pmr1Δ* de *S. cerevisiae*, cette dernière étant particulièrement sensible au Mn^{2+} . La figure 107 montre que la souche sauvage est en mesure de se développer sur tous les milieux y compris ceux contenant du Mn^{2+} . A l'inverse, la souche *pmr1Δ* portant le vecteur vide présente un déficit de croissance et ceci dès que la concentration est de 1 mM de Mn^{2+} . Lorsque la souche *pmr1Δ* est complétementée avec PcMnT nous pouvons constater que la croissance est identique à celle de la souche sauvage. PcMnT permet donc de restaurer une croissance normale dans la souche *pmr1Δ*. Il faut cependant se rappeler que PMR1 n'est pas un CDF, c'est pourquoi il sera nécessaire de vérifier la localisation intracellulaire de PcMnT.

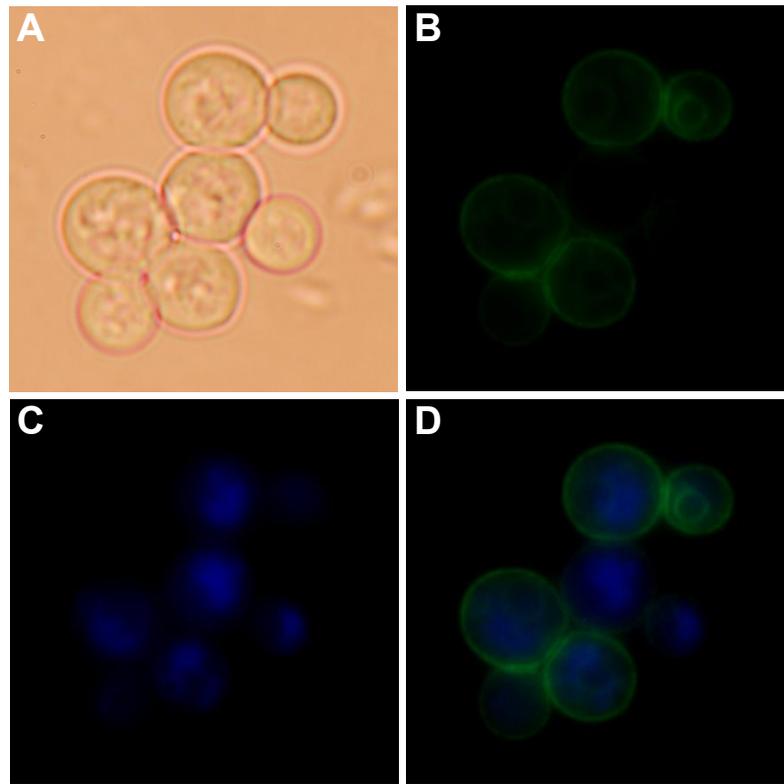


Figure 108 : Image en microscopie à fluorescence de levures (A) exprimant PcMnT1:GFP (B), colorées par du CMAC-Arg, (un marqueur vacuolaire) (C) et D la superposition des images B et C. Les cellules ont été collectées après une nuit de culture dans du SD-Ura sous agitation.

3.7.4 LOCALISATION INTRACELLULAIRE

Afin de vérifier la localisation sub-cellulaire de PcMnT, ce dernier a été cloné dans le vecteur pYES2GFP. La souche *pmr1Δ* a été transformée avec le plasmide et mise en culture pendant une nuit, la figure 109 présente les résultats en microscopie. Au vu de précédents résultats obtenus avec les CDF ((Delhaize et al, 2007; Peiter et al, 2007), nous nous attendions à ce que la fluorescence soit au niveau de la vacuole ou de l'appareil de Golgi. En conséquence, les vacuoles ont été marquées avec du CMAC-Arg (Fig.108.C). La fluorescence obtenue ne se trouve pas autour du marquage que nous donne le CMAC-Arg. Nous pouvons en conclure que la protéine de fusion PcMnT-GFP n'est pas localisée au niveau de la vacuole dans la levure. De plus, le profil ne semble pas correspondre à un marquage de l'appareil de Golgi. En comparant le profil obtenu en GFP avec la photo en lumière blanche, nous pouvons nous rendre compte que la GFP est en fait localisée au niveau de la membrane plasmalemmique. PcMnT semble donc être, lorsqu'elle est exprimée dans la levure, une protéine capable de prendre en charge le Mn^{2+} cytosolique et de l'exporter dans le milieu extracellulaire directement à travers la membrane plasmalemmique.

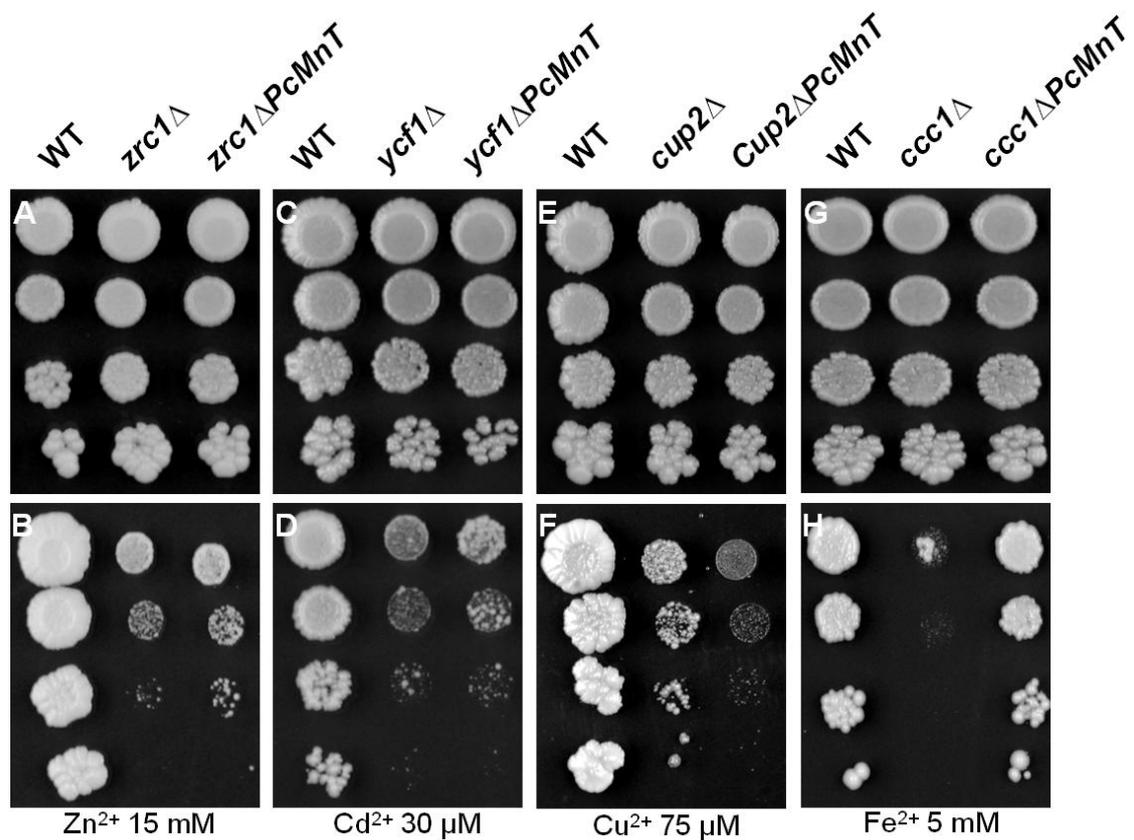


Figure 109 : Test de spécificité de PcMnT par rapport au Mn. La spécificité de PcMnT a été étudiée par complémentation de différentes souches de levure sensibles au Zn (*zrc1Δ*), au Cd (*ycf1Δ*), au Cu (*cup2Δ*) et au Fe (*ccc1Δ*). Les souches ont été transformées avec le vecteur pFL61 vide ou avec le vecteur pFL61 portant PcMnT. Des dilutions successives ont été mises en culture sur un milieu non sélectif (A, B, E et G) et des milieux contenant du zinc (B), du cadmium (D), du cuivre (F) ou du fer (H). La souche sauvage transformée avec le pFL61 vide sert de témoin.

3.7.5 SPÉCIFICITÉ DE SÉLECTION DU MÉTAL PAR PCMNT

Comme évoqué précédemment, PcMnT appartient à une superfamille de transporteurs de métaux dont les spécificités de substrats peuvent varier. Afin de vérifier si PcMnT était capable de prendre en charge d'autres métaux, celui-ci a été utilisé pour compléter différentes souches comme *zrc1Δ*, *cot1Δ*, *ccc1Δ*, *cup2Δ* et *ycf1Δ* et ainsi appréhender son rôle éventuel dans la prise en charge respective du zinc, du cobalt, du fer, du cuivre et du cadmium. Certains résultats commentés ci-dessous sont présentés sur la figure 109.

La complémentation de la souche *zrc1Δ* (Fig.109 A et B) montre qu'à 15 mM de Zn^{2+} la souche sauvage se développe convenablement. A l'inverse, la souche *zrc1Δ* portant le plasmide vide et la souche *zrc1Δ* complétementée avec PcMnT présentent une croissance réduite qui devient nulle si l'on passe à 17,5 mM de Zn^{2+} (résultats non présentés). Ceci indique que PcMnT n'est pas capable de prendre en charge le zinc. Des résultats comparables ont été obtenus avec la souche *cot1Δ* lorsque cette dernière a été mise en présence de cobalt (résultats non présentés).

Afin de tester si PcMnT était capable de prendre en charge le fer, il a été introduit dans la souche *ccc1Δ* (Fig.109 G et H) en utilisant 5 mM de Fe^{2+} . La souche sauvage présente une croissance normale, alors qu'à l'inverse la souche *ccc1Δ* présente une croissance fortement réduite. La souche *ccc1Δ* complétementée avec PcMnT présente une croissance comparable à celle de la souche sauvage. PcMnT semble donc capable de prendre en charge le Fe^{2+} . Au vu de la localisation de ce transporteur, une analyse des teneurs en métaux par ICP pourrait permettre de confirmer ce résultat.

La souche *cup2Δ* a été transformée avec PcMnT afin de vérifier si ce dernier était encore capable de prendre en charge un autre métal. Les résultats sont présentés en figure 109 (E et F). Lorsqu'elle est mise en culture sur 75 μM de Cu^{2+} , la souche sauvage ne présente pas de déficit de croissance. A l'inverse, la souche *cup2Δ* présente un déficit de croissance visible. L'observation de la souche *cup2Δ* complétementée avec le plasmide portant PcMnT montre que cette dernière présente une croissance encore plus réduite. Ce résultat peut paraître surprenant si l'on fait l'hypothèse que PcMnT permettrait d'expulser le cuivre auquel cas il devrait conférer une meilleure résistance. Une autre hypothèse serait que la sensibilité exacerbée au cuivre pourrait être le résultat de son entrée dans les cellules de levure *via* un mécanisme commun avec l'entrée du manganèse ou du fer. Ces dernières pourraient en effet être carencées en un de ces éléments à cause de l'expression de PcMnT, or, il a été démontré que chez *S.cerevisiae*, SMF1

était capable de prendre également en charge le cuivre (Liu et al, 1997). Cette hypothèse ne semble pas confirmée par les résultats d'ICP que nous verrons dans le chapitre suivant, l'expression de PcMnT n'entraînant pas d'entrée plus importante de cuivre. Il faut donc chercher une autre raison à ce résultat.

Les différentes expérimentations ont permis de déterminer que PcMnT est capable de transporter le manganèse et le fer. Différentes études ont montré des relations fines dans l'homéostasie aux différents éléments métalliques, comme en témoigne le fait que certains transporteurs soient capables de prendre en charge différents métaux même s'ils ne sont exprimés qu'en présence d'un métal donné. Nous pouvons citer le cas de ScCCC1 qui prend en charge le Fe^{2+} et le Mn^{2+} mais dont l'expression semble uniquement régulée par le Fe^{2+} . De nombreuses études montrent une relation importante entre le Mn^{2+} et le Cu^{2+} et ceci dans tous les règnes du vivant. Nous pouvons citer une étude qui a porté sur l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) et le pois (*Pisum sativum* L.) où il a été démontré que le Cu^{2+} avait un effet inhibiteur sur la photosynthèse mais que cet effet pouvait être contrebalancé par un traitement au Mn^{2+} (Padua et al, 2010). D'autres études montrent également des interactions entre le Mn^{2+} et le Cu^{2+} chez les bovins ou encore chez l'homme (Hansen et al, 2009). Nous pouvons donc supposer que la croissance plus faible de *cup2ΔPcMnT* est due aux mêmes causes, à savoir un effet inhibiteur du Cu^{2+} sur des enzymes utilisant le Mn^{2+} ou le Fe^{2+} comme cofacteur. En effet, cette sensibilité exacerbée au Cu^{2+} pourrait être le résultat d'une compétition qui serait en faveur du Cu^{2+} dans cette souche à cause de la présence de PcMnT qui entraînerait une diminution de la concentration intracellulaire en manganèse. Cette hypothèse semble confirmée par des résultats d'ICP que nous verrons dans le chapitre suivant. Une autre solution qui pourrait permettre de répondre à cette question, serait de réaliser un test en goutte en utilisant différentes concentrations de Cu^{2+} avec ou sans Mn^{2+} ou Fe^{2+} , l'ajout de ces derniers pouvant alors contrebalancer la carence provoquée par PcMnT.

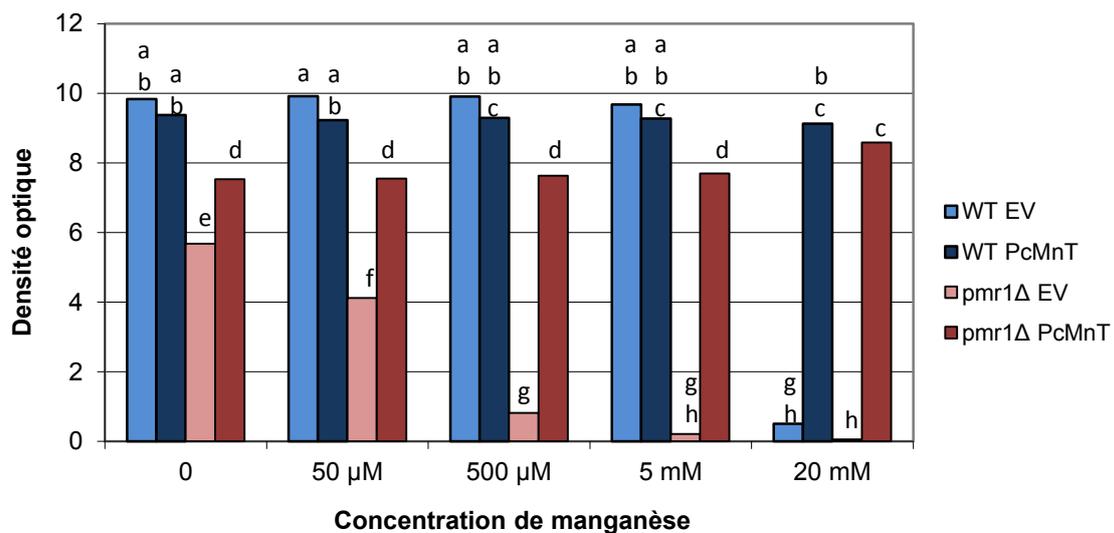


Figure 110 : Croissance des souches sauvage et mutante (*pmr1Δ*), complémentées ou non avec PcMnT. Les souches ont été inoculées à une DO de 0.05 et mises en culture liquide pendant 20 heures en présence de différentes concentrations en Mn. Une lettre différente indique une différence significative de valeur avec une P value $\leq 0,05$.

3.7.6 EFFET DE PCMNT SUR LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN MANGANÈSE

Nous avons testé l'effet de PcMnT sur la croissance de *S. cerevisiae* dans différents fonds génétiques, à savoir la souche sauvage BY4741 (WT) et la souche ultrasensible au Mn^{2+} *pmr1Δ*. Ces souches ont été mises en culture à une DO de 0,01 et placées en culture agitée durant une période de 20 heures en présence ou non de Mn^{2+} .

La souche sauvage cultivée en milieu liquide ne présente pas de différence de croissance par rapport à la culture sans Mn^{2+} jusqu'à 5 mM (Fig.110). A l'inverse, lorsqu'elle est mise en culture dans 20 mM de Mn^{2+} , la densité optique en fin de culture est inférieure à 1, cette dernière n'arrive donc plus à croître correctement à cette concentration. La souche sauvage transformée avec le plasmide contenant PcMnT présente le même profil de croissance jusqu'à 5 mM de Mn^{2+} , et de plus, est capable de se développer lorsqu'elle est mise en culture en présence de 20 mM de Mn^{2+} . Nous pouvons ainsi conclure que PcMnT confère une résistance supplémentaire à la souche sauvage vis-à-vis du manganèse.

La figure 110 présente également les résultats lorsque les mêmes conditions de culture sont utilisées en inoculant avec la souche *pmr1Δ* complémentée ou non avec PcMnT. Nous pouvons constater que, de manière générale, la croissance de cette souche est plus faible par rapport à la souche WT lorsque elle n'est pas mise en contact avec du Mn^{2+} . De plus, lorsque la souche n'est pas complémentée, la croissance est rapidement avec l'ajout de Mn^{2+} est ajouté dans le milieu de culture. Ainsi, avec 50 μM de Mn^{2+} , nous pouvons déjà constater une diminution de la DO de l'ordre d'un tiers par rapport à la culture de *pmr1Δ* EV sans Mn et lorsque la concentration est de 500 μM cette dernière est diminuée d'un facteur 6 et devient quasi nulle lorsque les concentrations sont encore plus importantes. Lorsque *pmr1Δ* est complémentée avec PcMnT, nous pouvons constater qu'il n'y a pas ce déficit de croissance et que la souche est capable de pousser même si 20 mM de Mn^{2+} sont ajoutés au milieu de culture.

La souche *pmr1Δ* PcMnT est donc capable de se développer dans toute la gamme de concentration de Mn^{2+} testée, ce qui n'est pas le cas de la souche sauvage non complémentée. Ainsi, cette souche hypersensible est en mesure, lorsqu'elle est complémentée avec PcMnT, de pousser dans des concentrations de Mn^{2+} qui sont pourtant toxiques pour la souche sauvage. Ces cultures ont été utilisées afin de doser les concentrations intracellulaires en différents éléments par ICP.

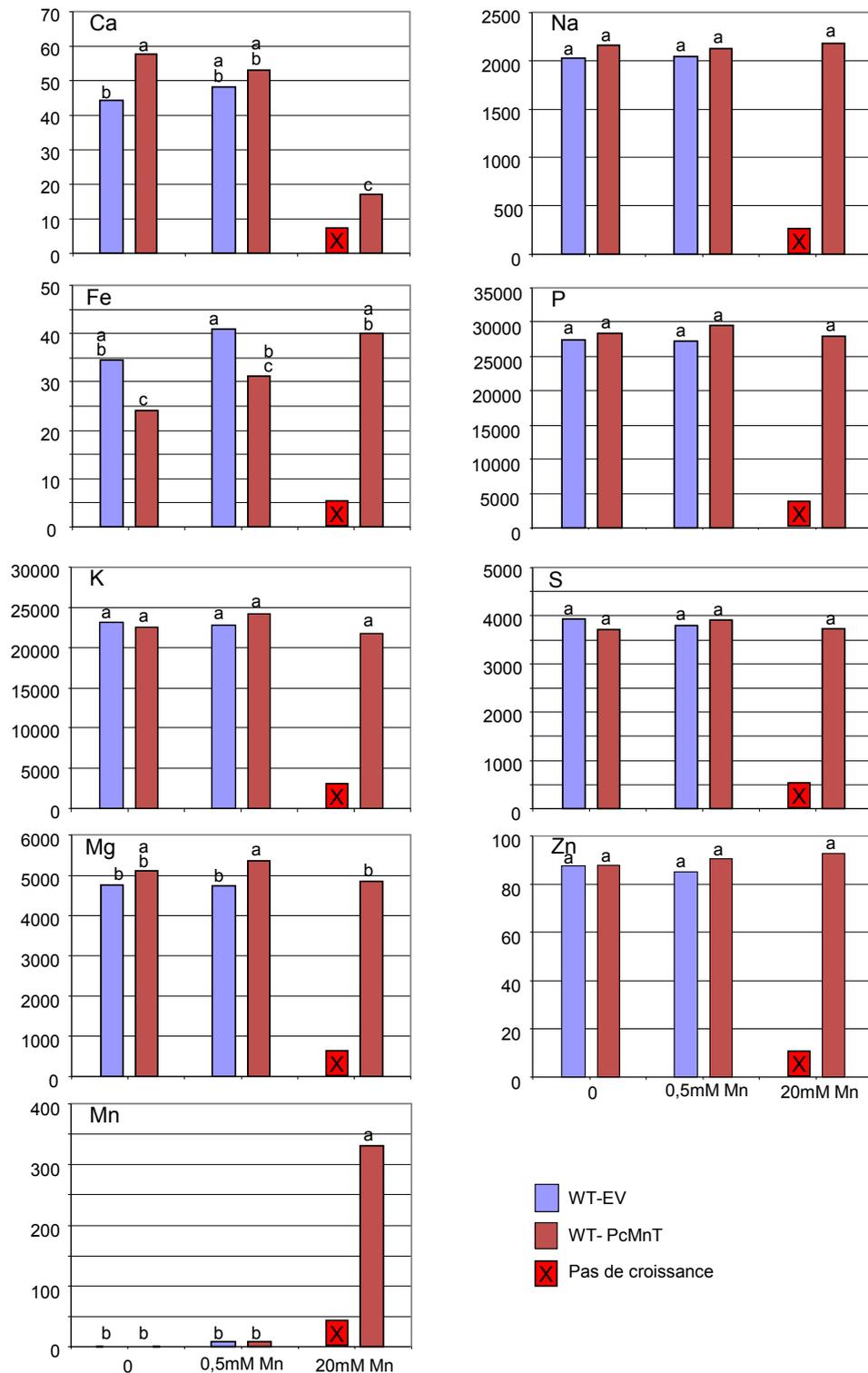


Figure 111 : Concentration intracellulaire de différents éléments (en $\mu\text{g/g MS}$) pour la souche sauvage transformée avec le vecteur vide ou avec le vecteur contenant PcMnT en fonction de la concentration de Mn^{2+} (en mM) dans le milieu de culture. Une lettre différente indique une différence significative de valeur avec une P value $\leq 0,05$.

3.7.6.1 ANALYSE DANS LE FOND GÉNÉTIQUE SAUVAGE

Les résultats de l'analyse ICP sont reportés sur la figure 111 et exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche (MS). Seuls les échantillons sans Mn, avec 500 μM et 20 mM de Mn ont été initialement analysés. La majorité des éléments comme le K, Na, P, S, et Zn présentent des concentrations relativement stables en fonction des différents traitements, contrairement au Ca^{2+} , au Fe^{2+} et au Mn^{2+} . La concentration en manganèse dans la souche sauvage suit la concentration en Mn^{2+} du milieu de culture. Lors de cette première analyse nous n'avons pas trouvé de différence de concentration en Mn entre la souche complémentée ou non avec PcMnT, ainsi en présence de 500 μM de Mn les concentrations obtenues sont respectivement de 8,28 et 8,31 $\mu\text{g/g}$ MS de Mn. Cependant l'absence de croissance à 20 mM de Mn pour la souche non complémentée laisse supposer que la teneur devient plus importante dans cette souche par rapport à la souche complémentée avec PcMnT, lorsque la concentration en Mn^{2+} dans le milieu de culture augmente. Ce résultat a été partiellement confirmé en analysant les souches mises en présence de 5 mM de Mn, les valeurs obtenues étant de 143 ± 18 $\mu\text{g/g}$ pour la souche WT contre 107 ± 5 $\mu\text{g/g}$ pour la souche complémentée avec PcMnT. L'écart entre les deux souches, même s'il est faible, est déjà significatif et pourrait être supérieur en utilisant des concentrations comprises entre 5 et 20mM de Mn. Le rôle de ce transporteur a également été confirmé dans la souche *pmr1* Δ dont les résultats seront présentés dans le chapitre suivant.

Nous pouvons constater que la concentration en Fe^{2+} est plus faible dans la souche complémentée par rapport au même traitement avec la souche sauvage. Ceci est conforme au rôle de transporteur de Fe^{2+} de PcMnT. Nous pouvons aussi noter que la concentration en Fe semble augmenter avec la concentration en manganèse en particulier dans la souche complémentée avec PcMnT, ce qui pourrait s'expliquer par un effet compétiteur entre le Fe et le Mn.

L'analyse des teneurs en calcium montre une diminution importante de cet élément lorsqu'il est mis en contact avec 20 mM de Mn, sa concentration étant globalement 3 fois moins importante que dans les autres cas. Une recherche bibliographique permet de montrer qu'il existe une relation fine entre Mn et Ca. En effet, outre le fait que le transporteur PMR1 prenne ces deux éléments en charge, ceux-ci étant nécessaires à la voie de sécrétion, nous avons trouvé des publications qui démontrent une interaction entre Mn et Ca. Il a ainsi été démontré que l'absorption du Mn au niveau de l'intestin était plus importante chez le poulet lorsque sa nourriture était complémentée avec du calcium (Ji et al, 2006). Une autre étude a permis de

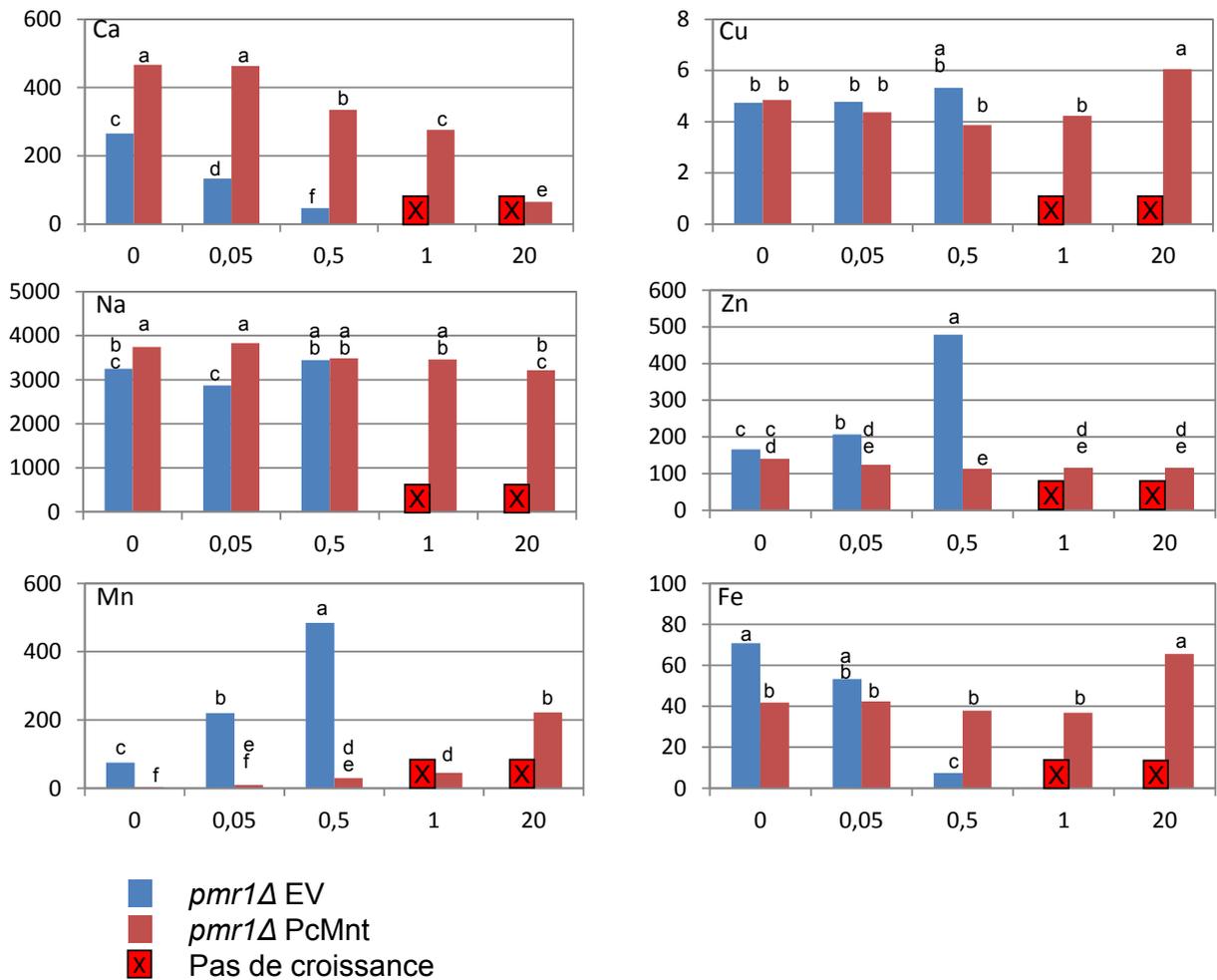


Figure 112 : Concentration intracellulaire de différents éléments (en µg/g MS) pour la souche *pmr1Δ* transformée avec le vecteur vide ou avec le vecteur contenant PcMnT en fonction de la concentration de Mn^{2+} (en mM) dans le milieu de culture. Une lettre différente indique une différence significative de valeur avec une P value $\leq 0,05$.

démontrer que le calcium avait un effet protecteur sur la neurotoxicité du manganèse (Ram Kumar et al, 2010). Ce rôle protecteur a également été mis en avant chez les végétaux, l'ajout de calcium semblant diminuer la toxicité du Mn (Alam et al, 2006). Ces publications indiquent toutes une relation entre la concentration en manganèse et en calcium, il est donc possible que la diminution de la teneur en calcium soit directement liée à la concentration en Mn.

3.7.6.2 ANALYSE DANS LE FOND GÉNÉTIQUE *PMR1Δ*

Avant d'analyser en détails les concentrations intracellulaires dans la souche *pmr1Δ* (Fig.112) nous pouvons constater que cette dernière accumule plus de calcium que la souche sauvage. Ainsi sans manganèse dans le milieu de culture nous avons plus de 200 µg/g de MS de calcium lorsque *pmr1Δ* n'est pas complémentée et plus de 400 µg/g lorsqu'elle est complémentée avec PcMnT, alors que dans la souche sauvage nous sommes aux alentours de 50 µg/g. Cette concentration élevée chez *pmr1Δ* est à mettre en relation avec le fait qu'elle ne possède pas le transporteur PMR1, qui permet le transport du manganèse mais également du calcium vers l'appareil de Golgi où ils seront chargés dans les vésicules de sécrétion. Nous pouvons constater que la concentration intracellulaire en calcium est plus élevée dans la souche complémentée avec PcMnt et ceci quelle que soit la concentration de manganèse dans le milieu de culture ce qui avait déjà été constaté dans la souche sauvage. Enfin, dans les deux cas la concentration intracellulaire en calcium diminue avec l'augmentation de la concentration en manganèse dans le milieu de culture.

A l'inverse certains éléments comme le cuivre ou le sodium ne présentent pas de variation de concentration en fonction de la concentration de manganèse dans le milieu de culture. Nous pouvons toutefois noter que le sodium est à une concentration d'environ 3000 µg/g dans cette souche alors qu'il est aux alentours de 2000 µg/g dans la souche sauvage. Cette différence est certainement de nouveau la conséquence du fond génétique et peut être directement lié à la concentration plus importante en calcium.

Nous pouvons constater que la concentration en manganèse augmente que la souche soit complémentée ou non avec PcMnT. Cependant la concentration augmente beaucoup plus vite lorsque la souche n'est pas complémentée, ainsi, lorsque *pmr1Δ* est mis en culture dans un milieu contenant 0.05 µg/g de Mn, la souche accumule autant de manganèse que lorsque la souche complémentée est mise en culture dans un milieu contenant 20 mM de Mn, soit une concentration 400 fois supérieure. Nous pouvons également constater que la souche non

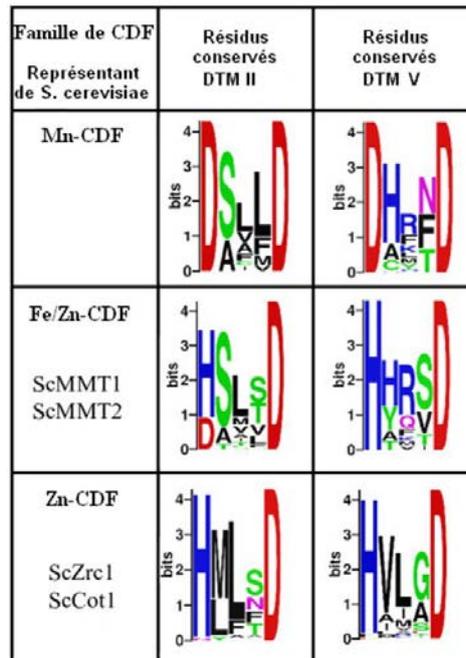


Figure 113 : Résidus conservés dans le domaine transmembranaire 2 (DTM II) et 5 (DTM V) de différents groupes de CDF. Les représentants de ces groupes ont été précisés lorsqu'ils sont présents chez la levure d'après (Montanini et al, 2007).

complémentée mise en culture dans un milieu contenant 0.5mM de Mn accumule plus de manganèse que la souche complémentée en présence de 20mM de Mn dans le milieu de culture. PcMnT apporte donc une protection contre le manganèse en permettant de fortement diminuer la concentration intracellulaire de ce dernier.

Nous avons vu dans la souche sauvage que la concentration en zinc ne changeait pas en fonction du traitement. Ceci n'est pas le cas dans la souche *pmr1Δ*, en effet, lorsque celle-ci n'est pas complémentée avec PcMnT, la concentration en zinc augmente avec la concentration en manganèse. Cette augmentation de la concentration en zinc est certainement liée à l'augmentation de la teneur intracellulaire en manganèse et se retrouve sur d'autres éléments comme le magnésium ou le phosphore (non présenté). A l'inverse cette forte variation de la concentration en zinc ne se retrouve pas lorsque la souche est complémentée avec PcMnT. Nous pouvons supposer que cette augmentation de la concentration en zinc a pour but de contrebalancer l'augmentation de la concentration en manganèse.

Nous avons vu précédemment que la concentration en Fe était plus faible lorsque la souche sauvage était complémentée avec PcMnT. Nous retrouvons le même schéma ici lorsque la concentration en manganèse est faible (0 et 0,05 mM de Mn), cependant la concentration en Fe diminue avec l'augmentation de la concentration en manganèse dans la souche non complémentée ce qui est l'inverse de ce que nous avons vu dans la souche sauvage. Il est possible que ce soit directement lié à l'effet toxique du manganèse, mais pourrait aussi être la conséquence de l'augmentation de la teneur en zinc. La concentration de ce dernier n'a en effet pas présenté de variation dans la souche sauvage, qu'elle soit ou non complémentée avec PcMnT et dans ce cas la concentration en Fe semble plutôt augmenter lorsque l'on ajoute du Mn dans le milieu de culture. Effectivement la teneur en Fe est maintenue à environ 40 µg/g pour des concentrations en Mn comprises en 0 et 1 mM et dépasse 60 µg/g lorsque la souche est mise en culture dans un milieu contenant 20 mM de Mn. Ceci pourrait être dû à un effet de compétition entre le Fe et le Mn.

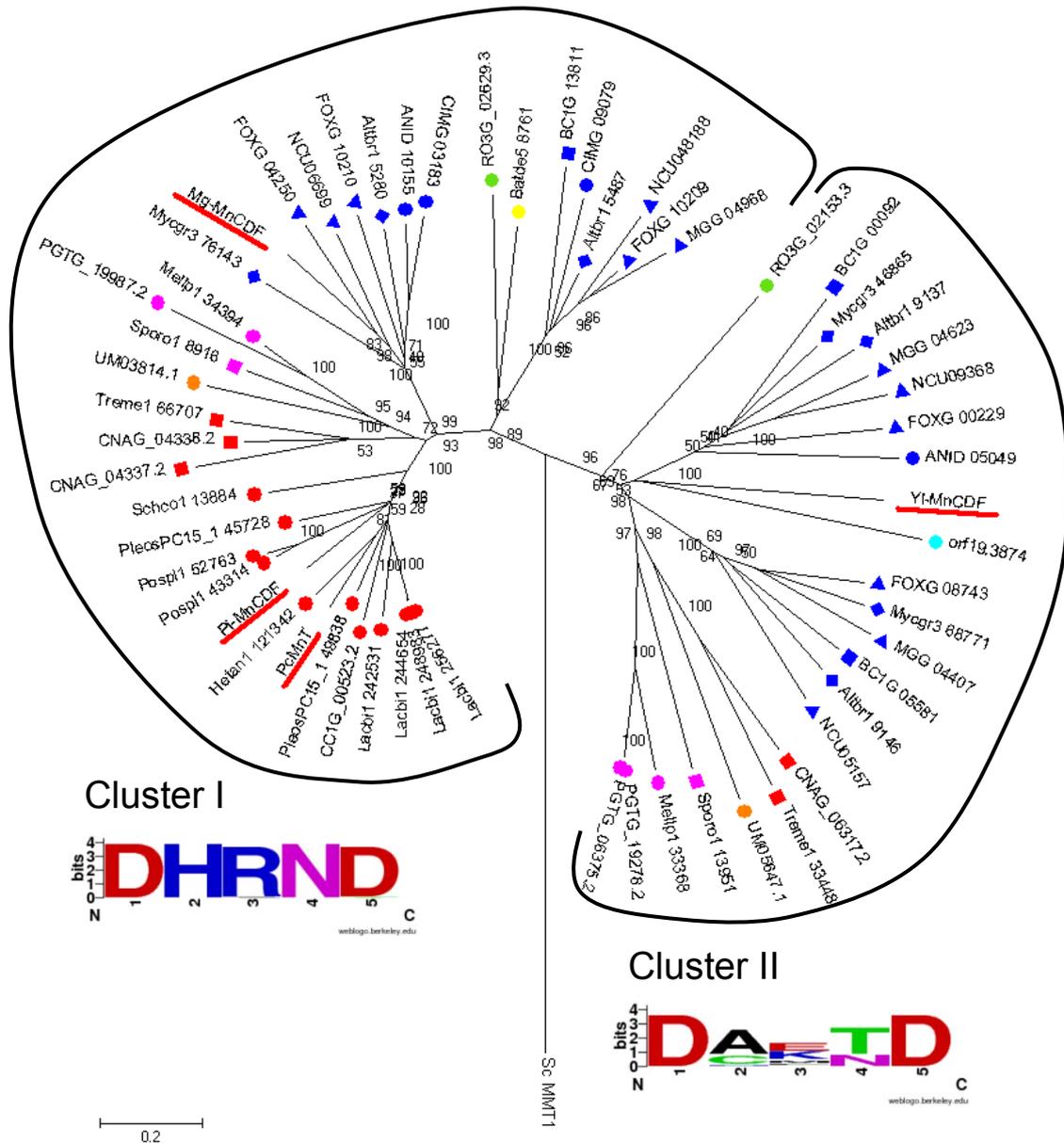


Figure 114 : Arbre phylogénétique présentant les MnT en précisant l'emplacement de PcMnT, Yl-MnCDF, Pi-MnCDF et Mg-MnCDF. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions. Sc-MMT1, un autre transporteur de la superfamille des CDF a été utilisé comme outgroup. Nous pouvons constater que nous retrouvons les clusters précédemment décrits. Ces clusters ne présentent pas la même signature au niveau du cinquième domaine transmembranaire. Le cluster I respectant fortement la signature du domaine transmembranaire V décrit par Montanini *et al* tandis que le cluster II présente une signature différente.

3.7.7 ETUDE D'AUTRES CDF DE LA FAMILLE MANGANESE.

La présence de deux clusters distincts dans le groupe des Mn-CDF pose la question de la spécificité de substrat de ces transporteurs. Une précédente analyse phylogénétique a permis de déterminer des signatures caractéristiques des différents groupes de CDF (Fig.113) au niveau du cinquième domaine transmembranaire (Montanini et al, 2007). En utilisant le code à une lettre pour les acides aminés la séquence est normalement proche de la séquence DHRND pour le groupe des Mn-CDF. L'analyse de cette région dans les deux clusters permet de mettre en avant une conservation importante de cette signature dans le cluster I (Fig.114). A l'inverse, cette signature n'est pas retrouvée au niveau du cinquième domaine transmembranaire des protéines présentes dans le cluster II. Cette région, qui porte la spécificité du groupe des Mn-CDF (Montanini et al, 2007), permet également de spécifier l'appartenance au cluster I ou II, comme décrits précédemment.

Afin de vérifier si les CDF des deux clusters ainsi formés étaient des transporteurs de Mn, nous avons choisi d'analyser 3 CDF supplémentaires. Pour cela nous avons cloné un CDF de *Paxillus involutus*, un des quatre CDF de *M. grisea* et l'unique CDF de *Y. lipolytica*. Ces transporteurs ont été intégrés dans l'arbre phylogénétique des Mn-CDF réalisé précédemment et ont été soulignés en rouge (Fig.114). Nous pouvons constater que le CDF de *P. involutus* fait partie du cluster I et qu'il est proche de celui de *P. chrysosporium* ; ceci n'a rien d'étonnant, ce dernier étant un Agaricomycète. *M. grisea* possède 4 CDF dont deux dans le cluster I. Le CDF de *M. grisea* que nous avons étudié se retrouve dans le cluster I, il est donc phylogénétiquement proche du transporteur de *P. chrysosporium*. Le dernier CDF étudié est l'unique CDF de *Y. lipolytica*. Comme nous l'avons vu auparavant ce dernier est situé dans le cluster II de l'arbre que nous avons construit avec MEGA.

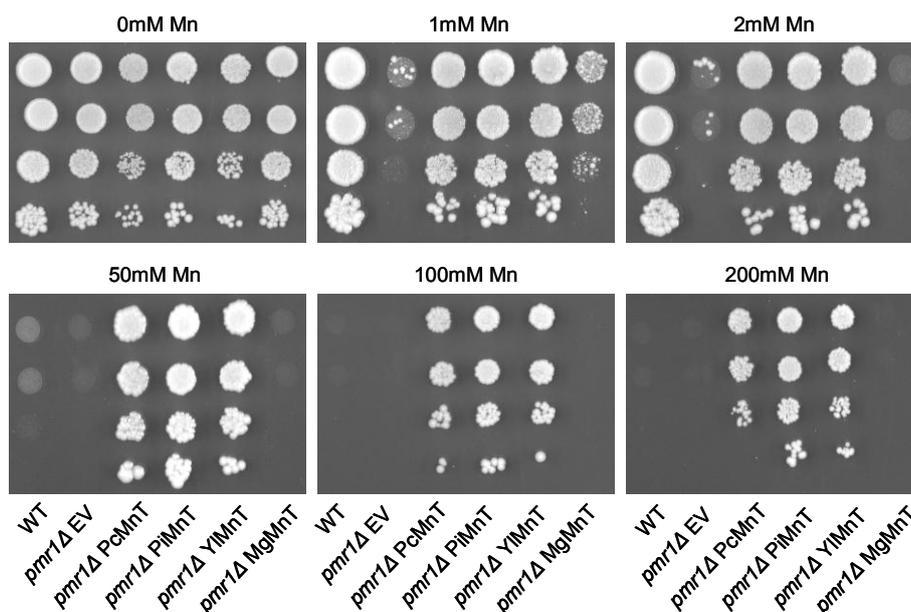


Figure 115 : Test de complémentation de la souche *pmr1Δ* par PcMnT, PiMnT, YIMnT et MgMnT. La souche *pmr1Δ* a été complétementée avec le vecteur pFL61 portant PcMnT, PiMnT, YIMnT ou MgMnT. Des dilutions en cascades ont été réalisées et déposées sur des milieux contenant des concentrations croissantes en manganèse.

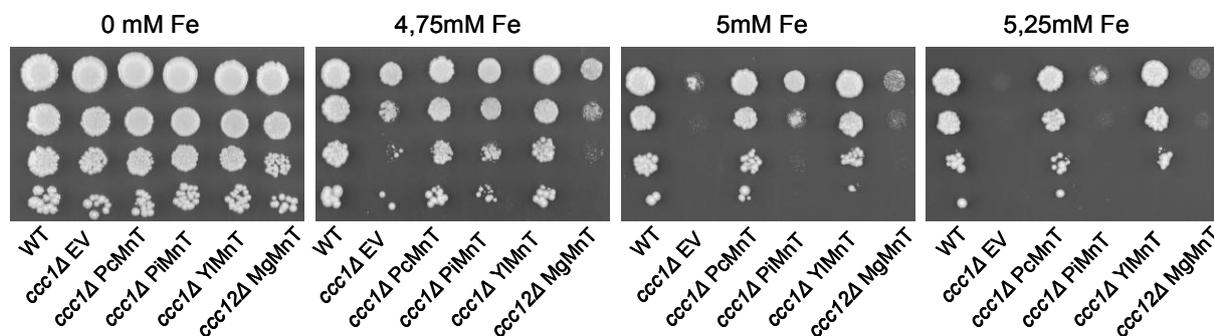


Figure 116 : Test de complémentation de la souche *ccc1Δ* par PcMnT, PiMnT, YIMnT et MgMnT. La souche *ccc1Δ* a été complétementée avec le vecteur pFL61 portant PcMnT, PiMnT, YIMnT ou MgMnT. Des dilutions en cascades ont été réalisées et déposées sur des milieux contenant des concentrations croissantes en fer.

Les transporteurs ont été clonés dans le pFL61. Cette construction a été utilisée pour transformer des souches de levures possédant différents fonds génétiques afin de vérifier si les transporteurs étaient capables de compenser la sensibilité de ces dernières à différents métaux. Seuls les tests présentant une différence de croissance entre la souche mutée et une des souches complémentées sont présentés dans ce manuscrit.

Nous avons testé la complémentation de la souche *pmr1Δ* avec nos différents transporteurs et sur différentes concentrations en Mn^{2+} . Les résultats ont été reportés sur la figure 115. Nous pouvons constater que, lorsque les souches sont mises en culture sur 1mM de Mn^{2+} , la souche mutante présente une croissance fortement altérée. La souche complémentée avec MgMnT présente également un défaut de croissance même si ce dernier semble moindre en comparaison avec la souche *pmr1Δ*. A l'inverse les souches complémentées avec PcMnT, PiMnT et YIMnT présentent une croissance comparable à la souche sauvage. Lorsque ces souches sont mises sur 2 mM de Mn^{2+} la croissance de la souche *pmr1Δ* et de la souche complémentée avec MgMnT est nulle, tandis que la croissance de la souche sauvage et des souches complémentées avec PcMnT, PiMnT et YIMnT présentent un phénotype normal. En augmentant la concentration au-delà de 50 mM de Mn la croissance de la souche sauvage est également compromise tandis que les souches de *pmr1Δ* complémentées avec PcMnT, PiMnT et YIMnT sont toujours capables de se développer. Ces dernières sont également capables de pousser sur des concentrations bien plus élevées en manganèse, à savoir 100 et 200mM de Mn. Nous pouvons conclure que sur les 4 CDF que nous avons testé 3 sont clairement capables de prendre en charge le Mn^{2+} et procurent à la souche *pmr1Δ* une résistance au Mn supérieure à la résistance de la souche sauvage.

Nous avons vu précédemment que PcMnT était capable de prendre en charge le fer. La transformation de la souche *ccc1Δ* a également donné des résultats qui sont exposés dans la figure 116. La présence de 4,75 mM de Fe dans le milieu de culture entraîne une diminution de la croissance de la souche *ccc1Δ* ainsi que de la souche complémentée avec MgMnT. Lorsqu'une quantité plus importante de Fe (5 mM) est ajoutée dans le milieu de culture, la souche *ccc1Δ*, complémentée ou non avec MgMnT n'est plus capable de croître. A l'inverse les souches qui étaient capable de pousser sur 4,75 mM de Fe sont également capables de pousser sur 5 mM à une exception près, il s'agit de la souche complémentée avec le MnT de *P. involutus* qui présente une croissance plus faible que pour les souches complémentées avec PcMnT et YIMnT. Ce résultat est confirmé lorsque la concentration dans le milieu de culture est de 5,25 mM de Fe. En effet, la croissance de *ccc1Δ*PiMnT est quasi nulle à cette concentration, tandis que la croissance de la souche sauvage et des souches complémentées avec PcMnT et YIMnT n'est que

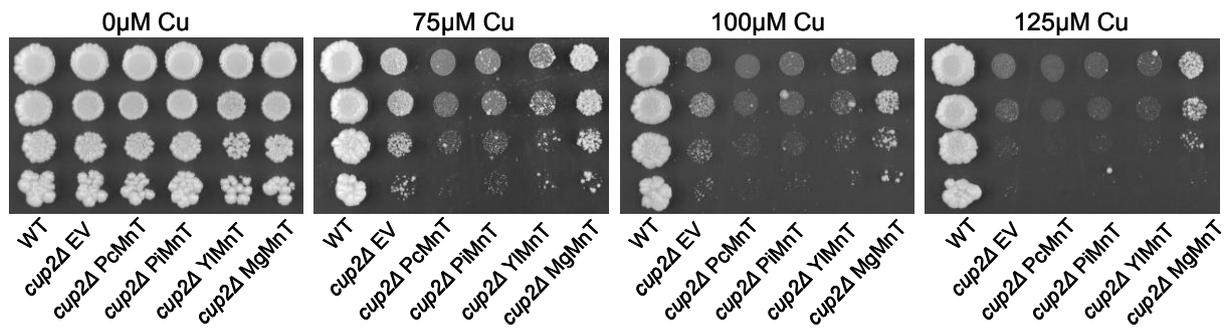


Figure 117 : Test de complémentation de la souche *cup2Δ* par PcMnT, PiMnT, YiMnT et MgMnT. La souche *cup2Δ* a été complétementée avec le vecteur pFL61 portant PcMnT, PiMnT, YiMnT ou MgMnT. Des dilutions en cascades ont été réalisées et déposées sur des milieux contenant des concentrations croissantes en cuivre.

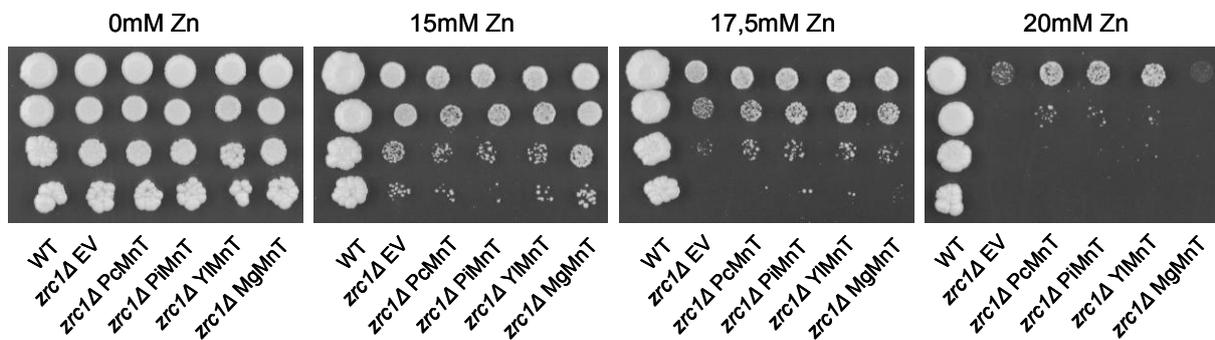


Figure 118 : Test de complémentation de la souche *zrc1Δ* par PcMnT, PiMnT, YiMnT et MgMnT. La souche *zrc1Δ* a été complétementée avec le vecteur pFL61 portant PcMnT, PiMnT, YiMnT ou MgMnT. Des dilutions en cascades ont été réalisées et déposées sur des milieux contenant des concentrations croissantes en zinc.

légèrement diminuée par rapport à notre boîte témoin. Nous pouvons conclure de manière générale que les 3 CDF qui prennent en charge le manganèse sont également capables de transporter le fer.

Lors des tests de complémentation que nous avons faits avec PcMnT, nous avons mis en évidence une sensibilité accrue de la souche *cup2Δ* au cuivre lorsqu'elle est complétementée avec PcMnT. Nous pouvons constater sur la figure 117 que, comme précédemment, sur 75 μM de Cu²⁺ la souche sauvage présente une croissance normale tandis que les souches *cup2Δ* et *cup2ΔMgMnT* présentent une sensibilité au Cu²⁺, mais restent capables de pousser dans ces conditions. A l'inverse les 3 CDF transportant le Mn²⁺ montrent une sensibilité supérieure au Cu²⁺ et ont une croissance encore plus réduite à cette concentration confirmant les résultats obtenus précédemment. Lorsque la concentration en cuivre devient plus importante la croissance de la souche *cup2Δ* est fortement inhibée, en particulier à 125 μM de Cu²⁺. A l'inverse, nous pouvons constater que la souche *cup2ΔMgMnT* est encore capable de se développer à cette concentration malgré une réduction de la croissance par rapport à la souche sauvage. Ce test semble confirmer que, lorsqu'ils sont exprimés dans *cup2Δ*, les CDF capables de prendre en charge le Mn engendrent une hypersensibilité au cuivre. Nous avons également pu mettre en évidence que MgMnT apportait une résistance au Cu. Ce résultat semble suggérer que ce dernier n'est pas un transporteur de Mn, mais qu'il serait plutôt impliqué dans les mouvements du Cu. Une étude des CDF de peuplier, conduite au sein de notre laboratoire, a permis de mettre en évidence que parmi les CDF potentiellement impliqués dans les mouvements de manganèse un transporteur n'apportait pas de résistance dans la souche *pmr1Δ*. A l'inverse, ce dernier semble apporter une tolérance plus importante à *cup2Δ* au cuivre. Ce résultat semble confirmer que certains CDF jouent en fait un rôle dans le transport du cuivre.

Lors du test de complémentation de *zrc1Δ* avec PcMnT nous n'avons pas mis en évidence de protection de cette souche par ce transporteur lorsqu'elles sont mises en culture sur 15 mM de Zn. Nous pouvons constater sur la figure 118 qu'à cette concentration les souches complétementées avec PcMnT, PiMnT, YIMnT et MgMnT ne présentent pas de différence de croissance par rapport à la souche *zrc1Δ* non complétementée. Cependant, lorsque la concentration de Zn devient plus importante, 17,5 mM et particulièrement à 20 mM, les souches contenant les transporteurs capables d'apporter une protection contre le Mn résistent mieux au Zn.

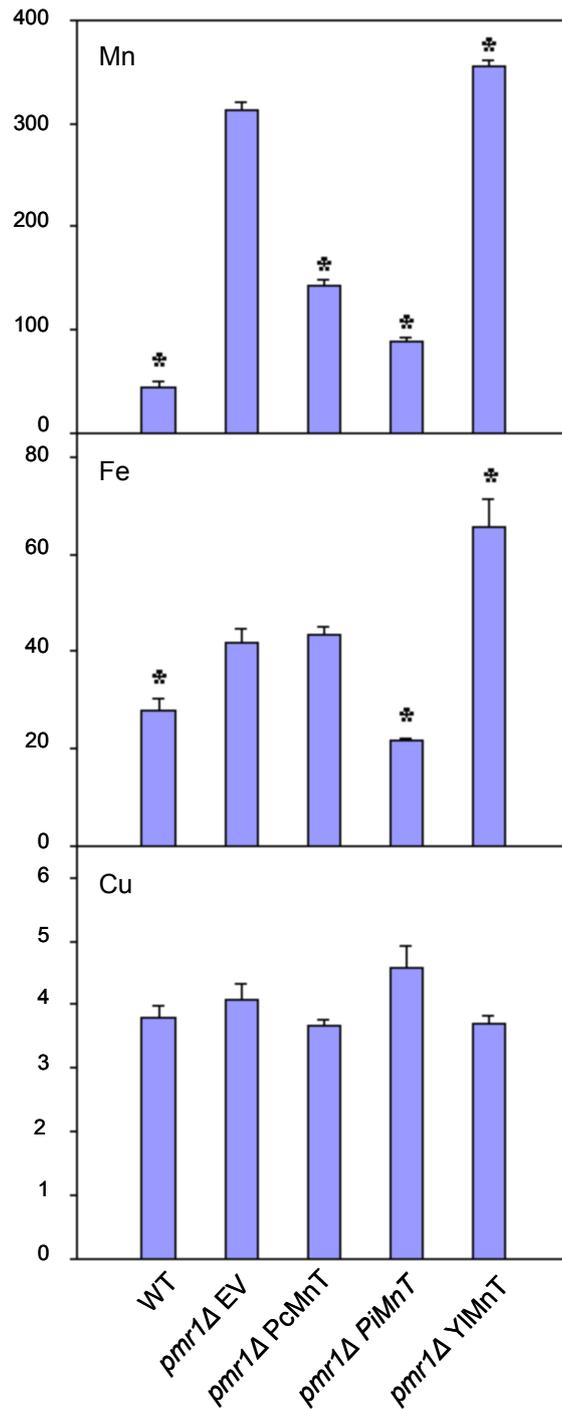


Figure 119 : Analyse en ICP-MS des concentrations intracellulaires (en µg/g MS) pour le Mn, le Fe et le Cu pour différentes souches de levures mises en culture en présence de 200µM Mn^{2+} sous agitation durant une période de 20 heures. Une étoile indique que la valeur est significativement différente de la valeur de la souche *pmr1Δ*EV ($P < 0.05$).

Nous avons décidé d'analyser en ICP l'effet des gènes permettant à la souche *pmr1Δ* de résister au Mn. Les différentes souches ont été envoyées au Danemark pour être analysées par l'équipe de Peidas afin de déterminer leurs teneurs en métaux lorsqu'elles sont mises en culture en présence de manganèse et, par la suite, de déterminer l'activité de ces transporteurs (Peiter et al, 2007).

Afin de déterminer les teneurs en métaux, les souches ont été mises en culture dans du SD-ura contenant 200 $\mu\text{M Mn}^{2+}$ durant une nuit. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec 30 ml d'eau glacée ultra-pure avant d'être lyophilisées. Les échantillons ont été pesés et digérés dans 250 $\mu\text{L d'HNO}_3$ à 70% et 125 $\mu\text{l d' H}_2\text{O}_2$ à 30% (Hansen et al, 2009). L'analyse e ensuite été réalisée en ICP-MS (Agilent 7500ce; Agilent Technologies).

La figure 119 présente certains des résultats obtenus. Le dosage du Mn permet de remettre en évidence une accumulation plus importante de ce dernier dans la souche *pmr1Δ* par rapport à la souche sauvage. Lorsque les souches sont complémentées avec PcMnT, PiMnT et YIMnT nous pouvons constater deux situations différentes. La complémentation avec PcMnT et PiMnT entraîne une diminution significative de la teneur en Mn dans les cellules par rapport à la souche *pmr1Δ*. A l'inverse, la complémentation avec YIMnT induit une augmentation significative de la teneur en Mn dans les cellules. Ces résultats semblent suggérer que PcMnT et PiMnT permettent de détoxifier le manganèse via un mécanisme d'export, alors qu'YIMnT pourrait permettre son stockage dans un organite.

Le dosage du fer donne également des résultats intéressants. Nous pouvons constater que la souche *pmr1Δ* accumule plus de Fe que la souche sauvage. Ceci est en accord avec les résultats obtenus précédemment (Fig.111 et 112). Les souches complémentées avec PcMnT et PiMnT ne donnent pas de résultats identiques au niveau de la teneur en Fe par rapport à *pmr1Δ*. Ainsi, si la souche complémentée avec PiMnT présente bien une diminution significative de la quantité de Fe par rapport à la souche *pmr1Δ*, la souche complémentée avec PcMnT n'en présente pas. Nous avons vu auparavant que les souches complémentées avec PcMnT et PiMnT présentaient des teneurs plus basses en Mn par rapport à *pmr1Δ*. Cependant, la souche complémentée avec PiMnT présente des teneurs en Mn encore plus basse que celle complémentée avec PcMnT. Il est possible que la quantité de Fe soit plus importante dans cette dernière du fait de la présence de plus de Mn et donc d'un effet de compétition, ce qui serait en accord avec les résultats obtenus précédemment. Le dernier point intéressant est la souche *pmr1Δ* complémentée avec YIMnT. Comme dans le cas du Mn, ce transporteur entraîne une augmentation de la teneur en Fe. Cette situation identique pour les teneurs en Mn et en Fe semble confirmer que ce transporteur est,

capable de prendre en charge ces deux cations et que la localisation de la protéine permet la détoxification des métaux via un mécanisme d'accumulation de ces derniers dans un organite.

Nous avons vu que ces gènes influençaient négativement la résistance de la souche *cup2Δ* vis-à-vis du Cu. Nous ne constatons cependant aucune différence significative de la concentration en Cu. Ceci semble confirmer l'hypothèse que la sensibilité exacerbée au Cu serait plutôt due à une carence en d'autres éléments plutôt qu'à un rôle de ces transporteurs dans l'homéostasie au Cu. Il est donc possible que la sensibilité de cette souche soit en particulier due à une carence en Mn ou en Fe.

Les résultats que nous avons obtenus confirment que dans ce groupe la plupart des CDF sont capables de prendre en charge le Mn. A notre surprise MgMnT ne semble quant-à lui pas prendre en charge le Mn mais plutôt le Cu. Des résultats identiques obtenus au sein du laboratoire lors de l'étude du groupe des Mn-CDF de peuplier confirment que certaines protéines de ce groupe seraient impliquées dans le transfert du Cu plutôt que du Mn. Nous avons également constaté que les Mn-CDF pouvaient jouer un rôle dans l'homéostasie au Fe comme en témoignent les tests de complémentation ainsi que les analyses ICP.

Par ailleurs nous avons mis en évidence des interactions entre différents éléments : la diminution de la teneur en Fe ou en Mn semblant jouer sur celle du Ca. L'expression de nos transporteurs entraîne une sensibilité accrue au Cu dans la souche *cup2Δ*, ceci pourrait être dû à un déséquilibre plus important entre certains ions. A l'inverse, cette interaction peut également avoir un effet bénéfique, nous avons ainsi pu voir que l'expression des Mn-CDF semble protéger la souche *zrc1Δ* contre les effets du Zn sans pour autant en diminuer la teneur intracellulaire. Certaines études ont par exemple confirmé un effet protecteur du Mg et du Ca vis-à-vis du Zn (Rai et al, 1981; Taneja & Mandal, 2008).

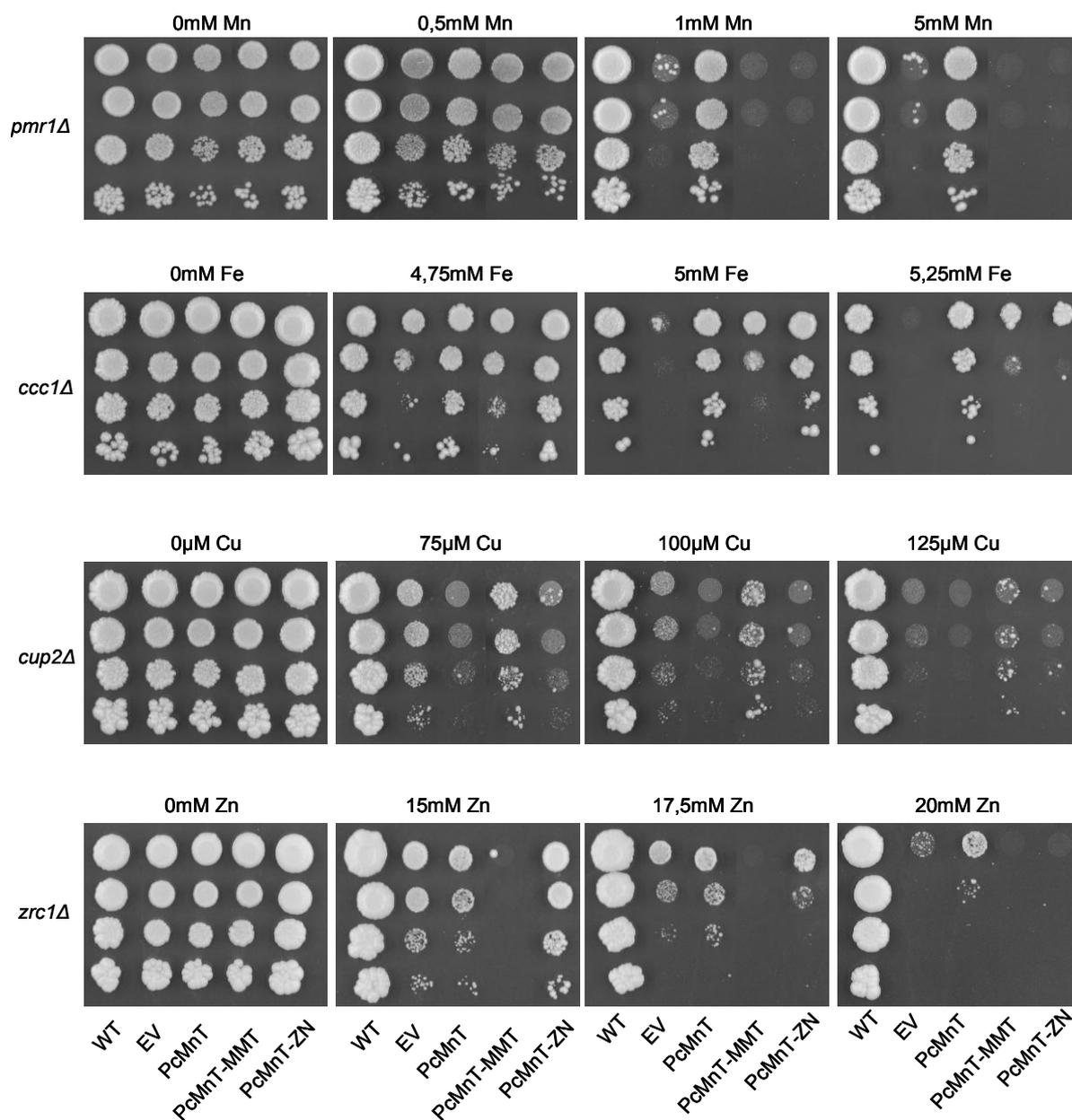


Figure 120 : Test de complémentation de souches mutantes : Différentes souches de levures sensibles aux métaux ont été transformées avec le vecteur pFL61 vide (EV) et le vecteur pFL61 portant PcMnT, PcMnT-MMT ou PcMnT-Zn. Ces souches ont été cultivées et des dilutions successives ont été déposées sur des milieux sélectifs. La souche sauvage (WT) également transformée avec le vecteur pFL61 vide, a été utilisée comme témoin. Après 4 jours les cultures ont été prises en photos. Le fond génétique est précisé sur la gauche de la figure, les concentrations de métaux ajoutés sont indiquées au dessus de photos et le plasmide utilisé pour transformer les différentes souches est reporté en bas de figure.

3.7.8 ETUDE DES DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES.

Comme nous l'avons vu précédemment, les groupes de CDF possèdent des signatures différentes au niveau de certains domaines transmembranaires. Il a été mis en évidence que les domaines transmembranaires II et V étaient particulièrement représentatifs du groupe de CDF (Montanini et al, 2007). Nous avons voulu vérifier l'influence de ces domaines transmembranaires sur l'activité de PcMnT. Pour ce faire, ces domaines ont été modifiés par mutagenèse dirigée afin de remplacer les séquences d'ADN codant pour les domaines transmembranaires DTM II (DSVFD) et DTM V (DHRND) de PcMnT par les séquences nucléiques caractéristiques des CDF des groupes Fe/Zn-CDF et Zn-CDF de *P. chrysosporium*. Nous avons ainsi obtenu le transporteur PcMnT-MMT contenant les DTM II et V spécifique du groupe des Fe/Zn-CDF (comme ScMMT1 et ScMMT2), et PcMnT-Zn contenant les DTM II et V spécifiques du groupe des Zn-CDF (comme ScZRC1 et ScCOT1). L'effet de ces mutations a ensuite été étudié par complémentation dans différentes souches de levure. Les souches présentant une différence de sensibilité ont été prises en photo et reportées sur la figure 120.

Nous pouvons voir que, comme précédemment, la souche *pmr1Δ* est capable de pousser sur des milieux contenant du manganèse lorsqu'elle est complétementée avec PcMnT. A l'inverse, lorsqu'elle est complétementée avec le vecteur vide ou avec le vecteur portant PcMnT-MMT et PcMnT-Zn, elle ne pousse plus sur des milieux contenant de fortes concentrations de Mn. Nous pouvons en conclure qu'il n'y a plus complémentation. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène, ainsi il est possible que la protéine ne soit plus fonctionnelle du fait d'un mauvais repliement et qu'elle soit directement dirigée vers le protéasome ou que la mutation entraîne une incapacité à prendre en charge le Mn.

Cette deuxième hypothèse semble être la bonne. En effet, la complémentation de *ccc1Δ* par nos gènes permet à cette dernière d'avoir une meilleure croissance ce qui semble démontrer que les protéines peuvent toujours prendre en charge ce métal. Nous devons cependant nuancer ce résultat. En effet, même si nos constructions permettent de protéger la souche *ccc1Δ* contre le Fe, le niveau de protection est différent. Si à 5 mM de Fe la croissance de la souche contenant PcMnT-MMT présente bien une croissance supérieure à la souche *ccc1Δ* non complétementée, elle n'est cependant pas comparable à la souche contenant PcMnT et PcMnT- Zn, qui permettent eux d'apporter une résistance plus importante à cette concentration. A 5,25 mM de Fe aucun de nos deux gènes mutés ne permet d'avoir une protection aussi efficace qu'avec PcMnT même s'ils apportent bien une résistance au Fe.

Les résultats obtenus dans la souche *cup2Δ* semblent mettre en avant que c'est une carence en Fe et non en Mn qui est la cause de la sensibilité exacerbée de cette souche au Cu. En effet, ni PcMnT-MMT, ni PcMnT-Zn ne sont capables de prendre en charge le Mn. Cependant, *cup2Δ*PcMnT-Zn présente le même phénotype que *cup2Δ*PcMnT tandis que *cup2Δ*PcMnT-MMT présente un phénotype comparable à *cup2Δ*EV. Or nous avons vu précédemment qu'avec cette mutation la protection contre le Fe dans *ccc1Δ* était moindre qu'avec PcMnT ou PcMnT-Zn. Il est donc possible que l'augmentation de la sensibilité soit due à une teneur plus faible en Fer. Ce type de relation entre le Fe et le Cu a déjà été mise en avant chez la levure (Li & Kaplan, 2004).

Pour le dernier test de complémentation présentant une différence de phénotype nous avons utilisé la souche *zrc1Δ*. Nous pouvons constater que PcMnT apporte une résistance au Zn par rapport à *zrc1Δ*EV. A l'inverse, la complémentation avec PcMnT-Zn ne semble pas apporter de résistance, la croissance de cette souche étant comparable à la souche *zrc1Δ*EV. Le résultat le plus surprenant découle de la complémentation avec PcMnT-MMT, cette souche présente en effet une hypersensibilité par rapport à la souche *zrc1Δ* et n'est plus capable de pousser dès 15 mM de Zn. Ce résultat est particulièrement inattendu car cette mutation du transporteur semble être la moins efficace à prendre en charge le Mn et le Fe, comme nous l'avons vu auparavant.

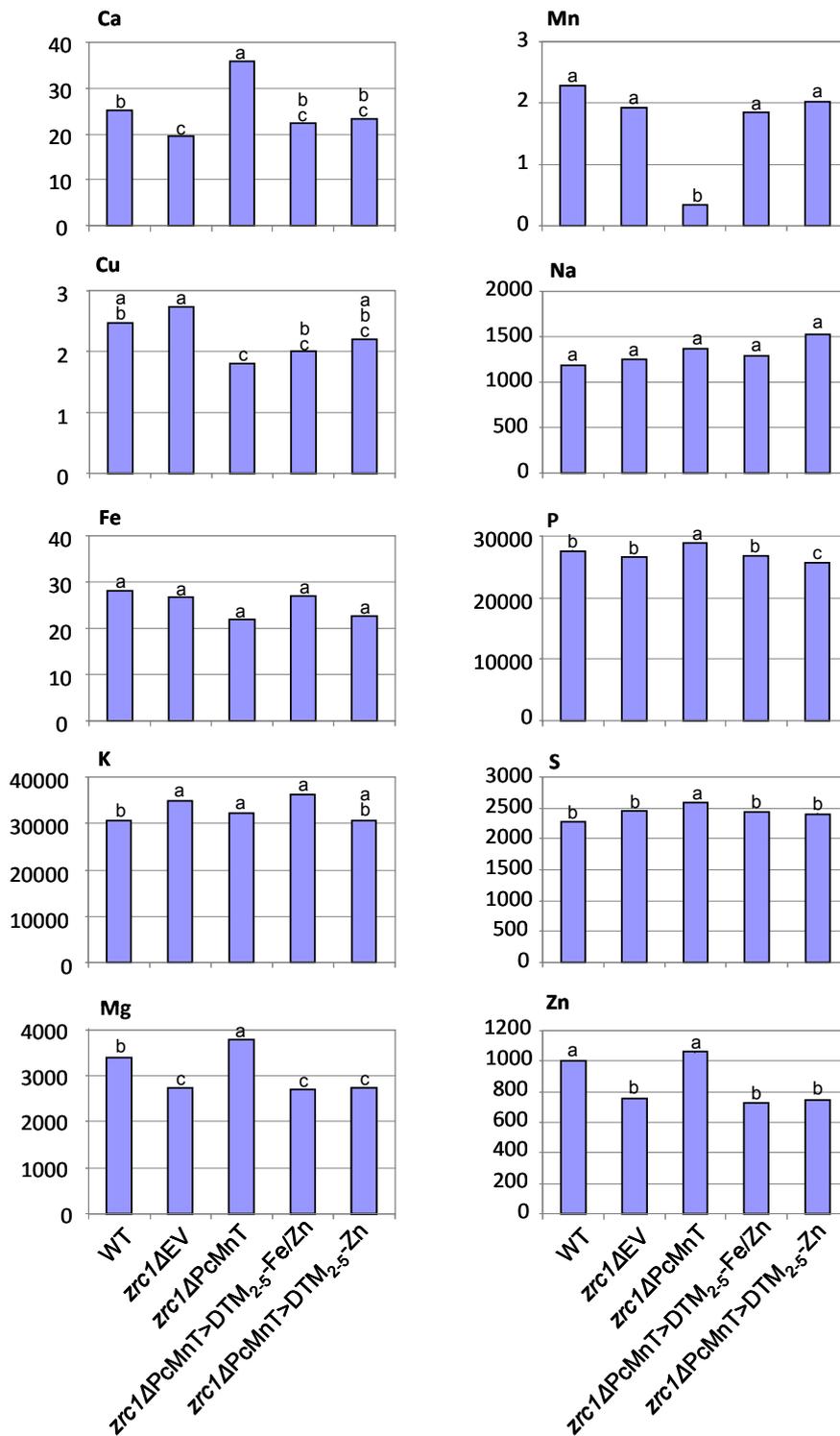


Figure 121 : Analyse par ICP-AES de la teneur (en $\mu\text{g/g}$) de différents éléments pour la souche sauvage et *zrc1Δ*, cette dernière pouvant être complétée avec PcMnT, PcMnT-MMT et PcMnT-Zn. Les souches ont été récoltées après 20 heures de culture liquide sous agitation (150 rpm) à 30°C et en présence de 500 μM de Zn. Trois cultures indépendantes ont été réalisées. Une analyse statistique a permis de déterminer les valeurs significatives différentes avec une $P\text{-value} \leq 0.05$.

Afin de savoir si *zrc1ΔPcMnT*-MMT accumule plus de Zn que les autres souches, ce qui expliquerait sa sensibilité exacerbée, nous avons décidé de faire des cultures de ces différentes souches dans 500 μ M de Zn et de les analyser en ICP. Nous pouvons constater que la souche complémentée avec PcMnT présente de nombreuses différences en éléments, particulièrement par rapport aux souches *zrc1Δ* complémentées ou non (Fig.121).

Ainsi, l'analyse du Mn révèle une teneur bien plus faible pour la souche *zrc1ΔPcMnT* que pour les autres souches. Ce résultat confirme bien que seul PcMnT est capable de transporter le Mn les gènes mutés n'apportant ni résistance, ni différence de teneur en Mn dans cette souche.

L'analyse du Fe ne révèle pas de différence significative entre les souches ; les résultats n'ayant pas été parfaitement homogènes. Nous pouvons cependant remarquer que les souches *zrc1ΔPcMnT* et *zrc1ΔPcMnT*-Zn ont des teneurs légèrement plus faibles en Fe, or ce sont ces dernières qui ont permis de protéger le plus efficacement *ccc1Δ* du Fe.

L'analyse du Zn révèle que la souche sauvage en accumule significativement que la souche *zrc1Δ*. Ce résultat est logique, la protéine ZRC1 étant localisée au niveau de la vacuole, elle permet donc de protéger la cellule via le stockage du Zn. Dans le cas de la souche *zrc1Δ* il doit y avoir compensation en limitant la quantité de Zn au niveau du cytosol et donc son entrée dans la cellule. Il a été démontré que chez *S. cerevisiae*, il pouvait y avoir répression de ZRT1/ZRT2, deux transporteurs en charge de l'import du Zn dans la cellule, afin de limiter sa concentration cytosolique (MacDiarmid et al, 2000b). Nous pouvons constater que *zrc1ΔPcMnT* accumule autant de Zn que la souche WT alors que PcMnT-MMT et PcMnT-Zn l'accumulent à une teneur comparable à la souche *zrc1Δ*.

Les résultats précédents amènent deux informations importantes. Au vu de sa localisation, la résistance de la souche *zrc1Δ* apportée par PcMnT ne semble pas se faire via un mécanisme de transport du Zn, ce dernier est en effet en quantité plus importante dans *zrc1ΔPcMnT* que dans la souche *zrc1Δ*. Nous pouvons constater que les teneurs de différents éléments varient particulièrement pour la souche *zrc1ΔPcMnT*. Ainsi, cette dernière contient significativement plus de Ca, de Mg, de P, de S et moins de Mn que toutes les autres souches. Les deux mutants de PcMnT ne possèdent pas de différence significative de teneur en Ca par rapport à la WT et à *zrc1ΔEV*. Cette accumulation de Ca semble donc directement liée à l'export du Mn, les résultats étant comparables à ceux obtenus dans les souches sauvages et *pmr1Δ* complémentées ou non avec PcMnT (Fig111 et 112). Le même schéma semble se répéter avec le Mg dont la teneur est significativement plus élevée dans *zrc1ΔPcMnT* que dans les autres souches et en particulier

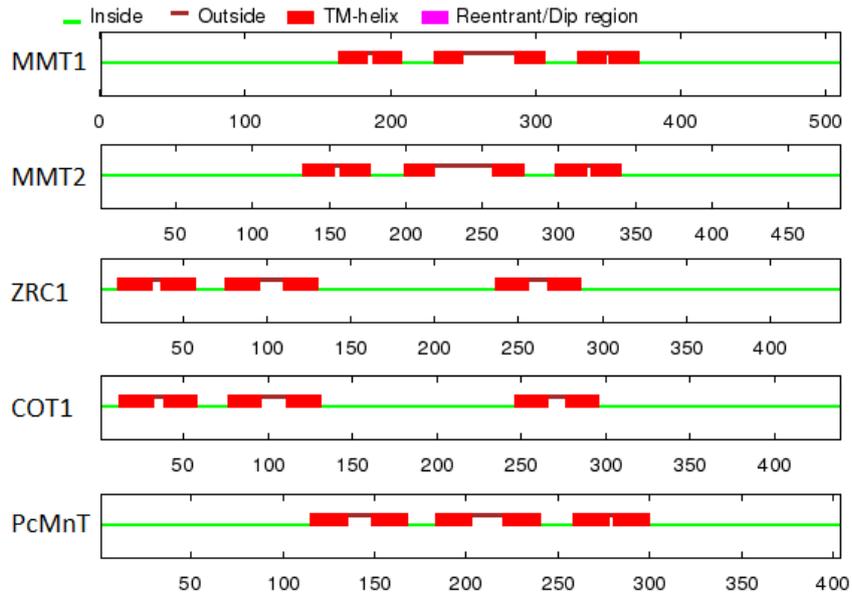


Figure 122 : Prédiction des domaines transmembranaires des protéines MMT1, MMT2, ZRC1, COT1 de *S. cerevisiae* et PcMnT réalisée avec OCTOPUS.

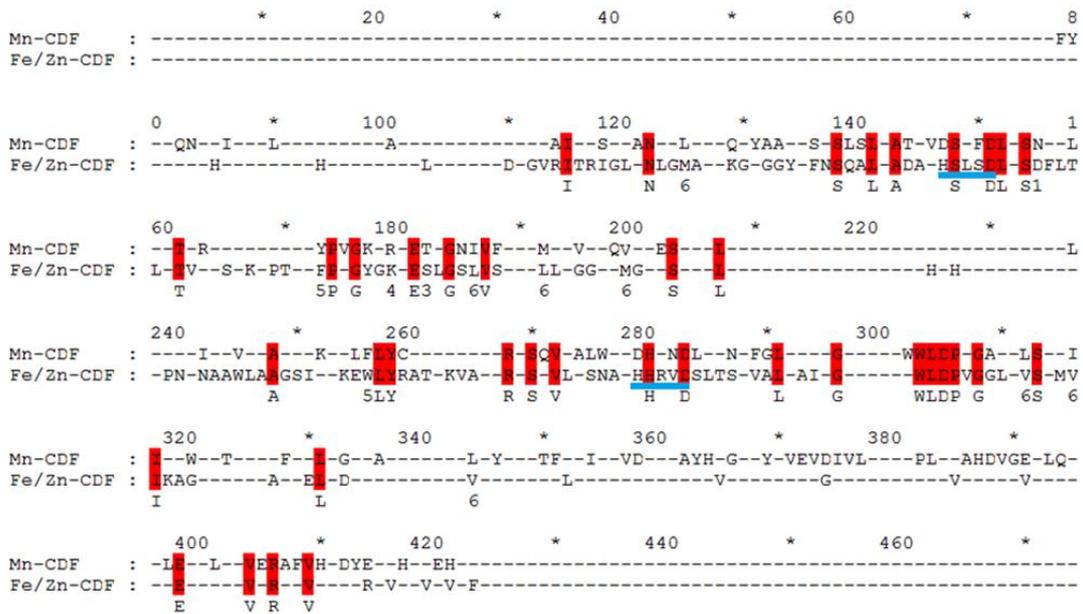


Figure 123 : Alignement des résidus les plus conservés entre les Mn-CDF et les Fe/Zn-CDF déterminé par la méthode de Shannon avec $H < 2$. Les acides aminés identiques sont surlignés en rouge, les domaines transmembranaires qui ont été mutés sont soulignés en bleu.

dans les souches *zrc1ΔEV*, *zrc1ΔPcMnT-MMT* et *zrc1ΔPcMnT-Zn*. En effet, ces dernières accumulent encore moins de Mg que *zrc1ΔPcMnT* et que la WT. Il semble donc possible que ce soit l'accumulation de ces éléments qui permette une meilleure tolérance de la souche *zrc1Δ* au Zn.

La deuxième information que nous pouvons obtenir est que la souche *zrc1ΔPcMnT-MMT* n'est pas plus sensible du fait d'une accumulation plus importante en Zn, sa teneur en cet élément étant la même que dans la souche *zrc1Δ*. A l'exception de la teneur en K, il n'y a également pas de différence significative dans les teneurs en éléments entre les souches *zrc1ΔPcMnT-MMT* et *zrc1ΔPcMnT-Zn*. La différence de sensibilité semble donc provenir d'un autre mécanisme.

Comme décrit précédemment (Montanini et al, 2007), des mutations sur les domaines transmembranaires entraînent une modification de l'activité des CDF. Le transport du manganèse est particulièrement touché par les mutations des deux domaines transmembranaires. En effet, nous pouvons constater que les protéines mutées ne sont plus capable d'apporter une résistance au manganèse. A l'inverse, le Fe semble toujours au moins partiellement pris en charge. Des mutations d'un seul acide aminé ou d'un seul domaine transmembranaire pourront permettre de confirmer de manière plus précise l'importance que ceux-ci peuvent avoir dans le fonctionnement global des Mn-CDF et dans le transport du Mn ou du Fe.

L'expression de PcMnT-MMT présente la particularité d'augmenter la sensibilité de la souche *zrc1Δ* lorsqu'elle est mise en contact avec du Zn sans en modifier la concentration par rapport aux souches *zrc1Δ* et *zrc1ΔPcMnT-Zn*. Il est possible que la protéine ainsi obtenue interagisse avec des protéines comme MMT1 et MMT2, la structure (Fig.122) et les acides aminés les plus conservés étant proches entre ces deux groupes de CDF (Fig.123), à l'inverse des CDF impliqués dans le transport du Zn dont la structure est légèrement différente. La prédiction des structures secondaires permet de mettre en évidence que le domaine N-ter des Fe/Zn et Mn-CDF est plus grand que celui des Zn-CDF, alors que la région cytotogique riche en histidine entre le domaine TM 4 et 5 est à l'inverse plus courte (Fig.122). Des études complémentaires de localisation ou d'interaction protéines-protéines pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans cette sensibilité exacerbée.

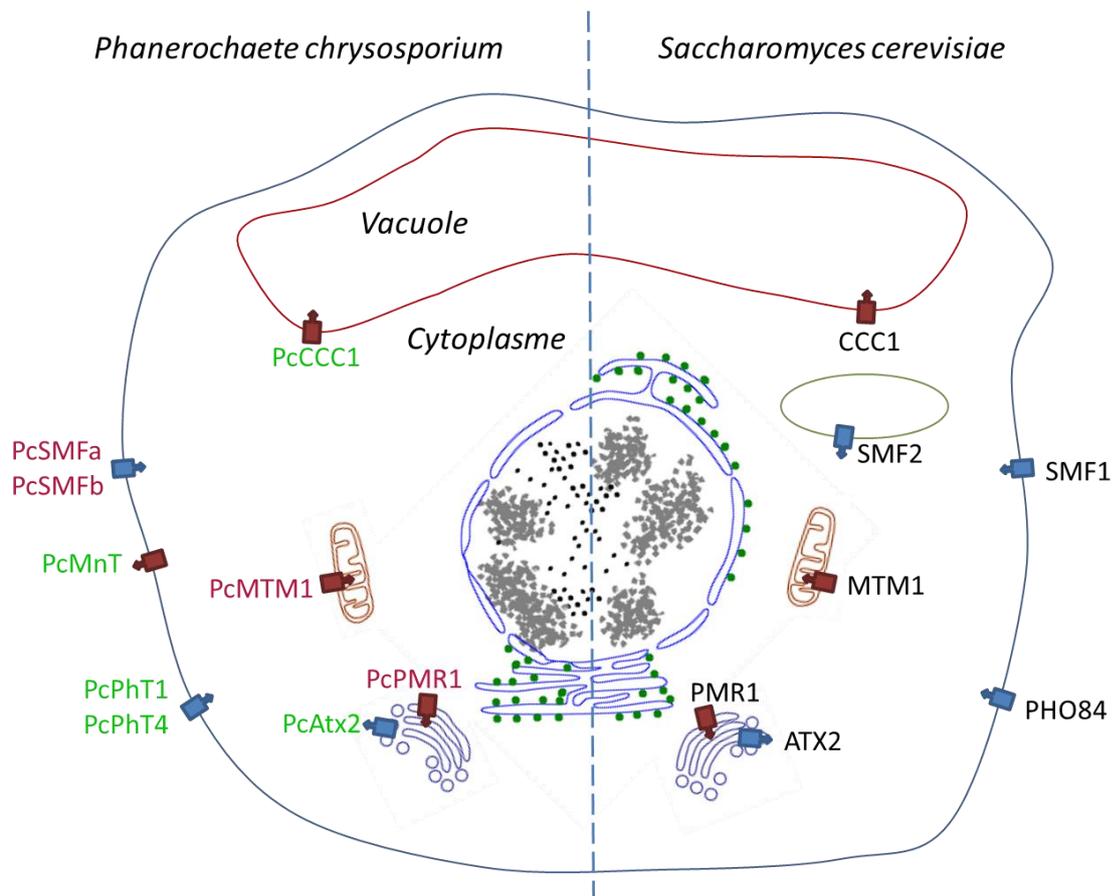


Figure 124 : Transporteurs de manganèse chez *Phanerochaete chrysosporium* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les transporteurs de *P. chrysosporium* dont la fonction a été confirmée par complémentation en système levure sont affichés en vert, ceux dont la fonction ou la localisation nécessite encore confirmation sont mis en rouge. Les transporteurs en charge de l'import de manganèse vers le cytosol sont en bleu et ceux en charge de l'export ou de la séquestration sont en rouge.

4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, je me suis intéressé aux transporteurs de manganèse de *Phanerochaete chrysosporium* eu égard à l'importance que revêt cet élément chez cet organisme dans la mise en place des processus lignolytiques. En effet, il a été démontré qu'une carence en manganèse permet notamment de stimuler la sécrétion des lignine-péroxydases via un processus de stress oxydatif (Rothschild et al, 1999). A l'inverse, en sa présence, il permettra, sous certaines conditions, la production de manganèse-péroxydase (Tien & Kirk, 1988). De nombreux systèmes ont été mis en place pour utiliser les propriétés des enzymes lignolytiques afin de les utiliser pour détoxifier des xénobiotiques (Dominguez et al, 2001). Ainsi, différentes méthodes de culture ont été mises au point afin de stimuler la production des enzymes par *P. chrysosporium* (Ghasemi et al, 2010; Singh et al, 2011). L'expression en système hétérologue a également été utilisée afin de pouvoir produire certaines enzymes en grande quantité. Le processus de dégradation étant un système multienzymatique, des études sont cependant toujours axées sur la recherche de cibles permettant de contrôler, voire d'augmenter les capacités de remédiation de *P. chrysosporium* (Kersten & Cullen, 2007).

4.1 TRANSPORT DU MANGANÈSE CHEZ P. CHRYSOSPORIUM

Lors de cette étude nous avons pu mettre en évidence que les transporteurs de manganèse présents chez *S. cerevisiae* semblent généralement conservés dans le règne fongique et tout particulièrement chez *P. chrysosporium* (Fig.124). Nous pouvons cependant remarquer que *S. cerevisiae* peut s'avérer être un organisme modèle problématique. Ce dernier est en effet dépourvu de CDF impliqué dans le transport du manganèse, alors que nous en avons mis en évidence chez *P. chrysosporium* et que ce groupe de CDF est présent dans la plupart des organismes fongiques. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de diversifier les modèles d'étude et l'apport des campagnes de séquençage qui ont été mises en place.

En étudiant le génome de *P. chrysosporium* nous avons pu mettre en évidence que certains transporteurs fonctionnaient comme leurs orthologues de *S. cerevisiae*.

Ainsi, l'étude des transporteurs impliqués dans l'import du manganèse a permis de mettre en évidence qu'il existe au moins deux orthologues fonctionnels de ScPHO84, à savoir PcPhT1 et

PcPhT4 ; PcPhT3 ne semblant pas compléter la souche mutante de levure et PcPhT2 n'ayant pas été cloné. Nous avons pu démontrer que PcPhT1 et PcPhT4 avaient un rôle identique au transporteur PHO84 de *S. cerevisiae* et étaient capables de prendre en charge des complexes MeHPO_4 . Deux NRAMPs sont présents dans le génome de *P. chrysosporium*, cependant il ne nous a pas été possible de les cloner et donc de confirmer leur fonction. Nous avons malgré tout réussi à mettre en évidence qu'ils sont exprimés, leur étude peut ainsi être envisagée à court terme.

Nous avons également cloné des transporteurs en charge des mouvements intracellulaire du manganèse. Nous avons ainsi pu démontrer que PcCCC1 est impliqué, comme chez *S.cerevisiae*, dans le transport du manganèse et du fer vers la vacuole. A l'inverse, malgré que nous ayons réussi à cloner PcMTM1, nous n'avons pas pu obtenir une complémentation fonctionnelle dans la souche *MTM1Δ*. Il ne nous a également pas été possible de tester la fonction de PcPMR1 ce dernier n'ayant été que partiellement cloné. Il serait cependant possible de vérifier la localisation intracellulaire de ces transporteurs chez *P. chrysosporium* à l'aide d'anticorps. Si nous n'avons pas réussi à cloner le transporteur en charge de l'export du manganèse vers l'appareil de Golgi en vue de sa sécrétion nous avons cependant réussi à caractériser le transporteur en charge de le recycler. Ainsi, PcATX2 semble, comme son orthologue de *S. cerevisiae*, être localisé au niveau de l'appareil de Golgi. Nous avons également confirmé que son rôle semble être identique à ScATX2.

En plus des transporteurs présents chez *S. cerevisia*, nous avons cloné un CDF impliqué dans les mouvements de Mn. Ce dernier a été caractérisé et nous avons pu mettre en évidence qu'il est capable de prendre efficacement en charge le Mn mais également le Fe afin de les exporter hors de la cellule. Avec sa localisation plasmalemmique et son rôle dans l'extrusion du Mn, il représente le premier exemple de Mn-CDF ayant cette fonction chez un champignon. Sa localisation sera cependant à confirmer dans *P. chrysosporium* car il a été démontré que dans certains cas, il est possible d'avoir une mauvaise localisation des Mn-CDF dans la levure (Delhaize et al, 2003). Les transporteurs de *P. chrysosporium* clonés à partir d'ADNc ont également été clonés à partir d'ADN génomique et pourront être utilisés afin de confirmer la localisation de ses derniers dans le champignon, ainsi que pour réaliser des expériences d'inactivation par RNAi dans le cadre d'un partenariat avec l'équipe de Paula Belinky (Matityahu et al, 2008).

Lors de cette étude nous avons pu faire un inventaire des différents transporteurs de manganèse présents chez *P. chrysosporium*. La carence en Mn engendrant la sécrétion des LiPs, ces transporteurs pourraient être des cibles intéressantes afin d'étudier les mécanismes impliqués

dans la sécrétion de ces enzymes, L'équipe de Paula Belinky travaille également sur la mise au point d'outils permettant d'étudier le rôle du Mn et plus particulièrement de la Mn-SOD en modifiant l'activité de cette dernière par la technique de RNAi. Les mutants obtenus présentent cependant une croissance fortement ralentie. Une autre possibilité pour contrôler l'activité de la Mn-SOD pourrait être d'obtenir un mutant de PcMTM1. En effet, malgré que nous n'ayons pas réussi à avoir une complémentation fonctionnelle dans *MTM1Δ*, cette protéine semble être l'orthologue de ScMTM1. Elle joue donc normalement un rôle essentiel dans l'activation de la Mn-SOD en permettant l'insertion du Mn dans son site actif. La délétion de ce gène chez *P. chrysosporium* devrait donc engendrer, comme chez la levure (Luk et al, 2003), l'inactivation de la Mn-SOD si le champignon n'est pas cultivé sur un milieu complémenté avec du Mn. Il pourrait ainsi être possible de précultiver *P. chrysosporium* dans un milieu complémenté en Mn et d'induire ensuite l'inactivation de la Mn-SOD en changeant le milieu de culture tout en conservant l'activité d'autres enzymes Mn-dépendantes.

L'analyse de l'expression des transporteurs de manganèse a permis de constater que la transcription de ces derniers n'est que rarement régulée par cet élément. Ceci peut s'expliquer par le fait que certains transporteurs impliqués dans les mouvements de manganèse sont régulés par un autre élément. Ainsi, nous savons que chez la levure l'expression de *pho84* est directement liée à la présence de phosphate via un mécanisme faisant intervenir *spt7* (Nishimura et al, 1999). De même, il a été démontré que *ccc1*, qui transporte le manganèse et le fer, était spécifiquement régulé au niveau transcriptionnel par la concentration en fer (Culotta et al, 2005). L'implication des transporteurs dans les mouvements de différents éléments permet donc d'expliquer en partie l'absence de régulation transcriptionnelle. De plus, chez *S.cerevisiae*, la protéine SMF1 n'est pas régulée au niveau de la transcription mais par un mécanisme post-traductionnel impliquant BSD2 (Liu & Culotta, 1999; Liu et al, 1997). En fin de compte, il est important de noter que chez *S. cerevisiae* il n'y a pas de protéine connue dont l'expression est régulée par le Mn et qu'il n'existe pas de facteur de transcription spécifique du Mn. Ceci peut sembler étrange vu l'abondance du Mn dans le sol, mais est sans doute à mettre en relation avec le mode de vie de la levure.

Lors de mon travail de thèse, j'ai pu mettre en évidence que chez *P. chrysosporium* CDF était impliqué dans les mouvements de manganèse et que des membres du groupe Mn-CDF étaient présents dans de nombreux organismes fongiques. Il a été également possible de mettre en évidence que PcMnT est une protéine dont l'expression est stimulée par la présence de Mn mais pas par le Fe, suggérant un mécanisme de régulation spécifique au manganèse.

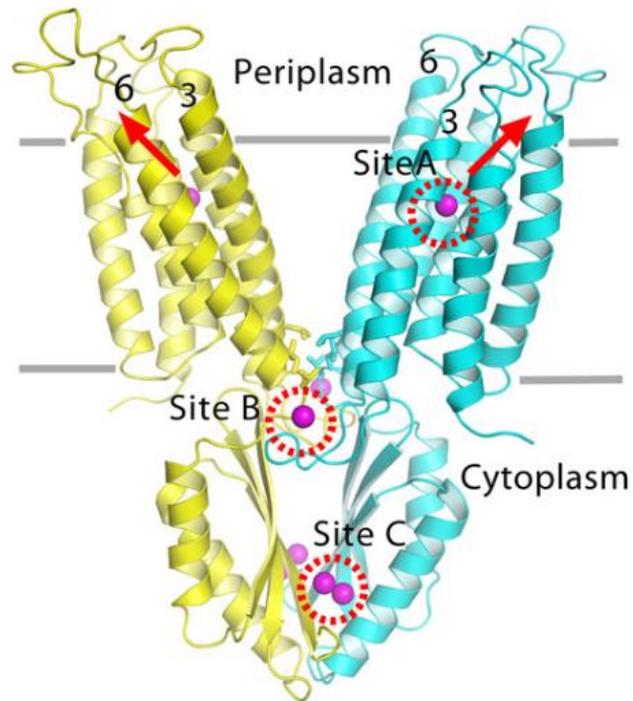


Figure 125 : Structure de YiiP : Représentation de l'homodimère (un protomère en jaune et un en cyan). Les sphères en magenta représentent les ions de zinc associés aux sites marqués par des cercles rouges. Les lignes grises indiquent les limites de la membrane et les flèches rouges indiquent les directions de sortie du Zn des deux sites actifs (Lu et al, 2009).

4.2 ETUDE DE MNT ET DES MN-CDF

Les expériences de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en avant que le remplacement des domaines transmembranaires de PcMnT impacte la capacité de transporter du manganèse, mais que la capacité à prendre en charge le Fe pouvant être conservée. Lors d'expériences de mutagenèse dirigée pratiquées sur ZRC1, il a été possible de faire en sorte que ce transporteur prenne en charge le manganèse. Ce gain de fonction a été accompagné de la capacité à prendre également en charge le fer (Lin et al, 2009). Les mutations effectuées lors de ma thèse correspondent au site actif des transporteurs (Fig.125 site A) (Lu et al, 2009), les sites B et C non mutés jouant un rôle dans l'activation du transport. Ainsi, la logique voudrait que la protéine obtenue soit une protéine chimère capable de prendre en charge le Zn, mais dont l'activité serait régulée par le manganèse. Cependant, ceci n'explique pas la sensibilité exacerbée provoquée par l'expression de PcMnT-MMT. Des expériences supplémentaires jouant sur les concentrations en Zn et en Mn pourraient être utiles. PcMnT-MMT a été inséré dans le pYES2GFP afin de vérifier s'il y a un changement de localisation de la protéine obtenue. Il serait également possible de transformer d'autres souches comme *cot1Δ* et surtout *mnt1-mnt2Δ* afin de vérifier l'effet de l'introduction de ce transporteur muté dans ces souches.

Le clonage de CDF du même groupe nous a permis de mettre en évidence que la présence des résidus DHRND au niveau du cinquième domaine transmembranaire n'était pas une condition nécessaire pour avoir la fonction de transporteur de manganèse comme en témoigne YIMnT. A l'inverse, la présence de ces résidus ne semble pas être un gage de la spécificité de substrat de ces transporteurs, comme en témoigne l'unique MnT de *Magnaporthe grisea* que nous avons testé. Ce dernier présente en effet bien ces résidus, mais nous avons pu mettre en évidence qu'il fonctionne en tant que transporteur de Cu. Cette possibilité de prendre en charge du cuivre a également été observée au sein du laboratoire sur des transporteurs prédits comme étant des transporteurs de manganèse chez le peuplier. Il est donc possible que certains transporteurs de ce groupe soient en fait bien des transporteurs spécifiques du cuivre et que cette spécificité de substrat se retrouve chez d'autres organismes. Afin de vérifier cela, il serait intéressant de confirmer la fonction des trois autres transporteurs de *Magnaporthe grisea*, pour voir si ces derniers sont en charge du transport du manganèse ou du cuivre. Il pourrait être opportun de cloner des transporteurs phylogénétiquement proches de MgMnT comme FOXG10210 et FOXG04250 de *Fusarium oxysporum*, ANID10155 d'*Aspergillus nidulans* ou encore NCU06699 de *Neurospora crassa* afin de vérifier la spécificité de substrat de ces derniers.

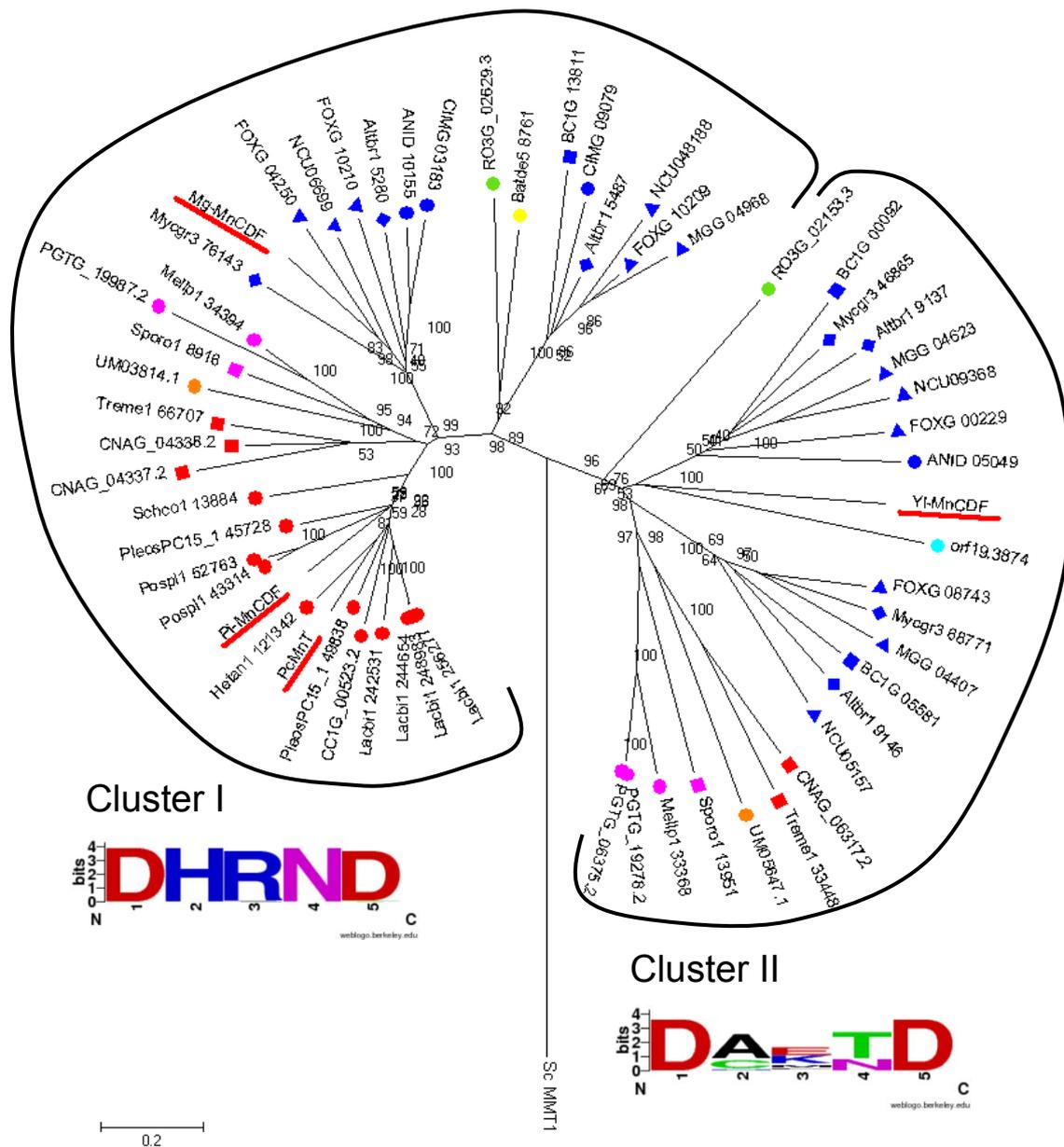


Figure 126 : Arbre phylogénétique présentant les MnT et précisant l'emplacement de PcMnT, Yl-MnCDF, Pi-MnCDF et Mg-MnCDF. Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA afin de générer un arbre selon la méthode du neighbour-joining. Les bootstraps ont été calculés à l'aide de 1000 répétitions. Sc-MMT1, un autre transporteur de la superfamille des CDF a été utilisé comme outgroup. Nous pouvons constater que nous retrouvons les clusters précédemment décrits. Ces clusters ne présentent pas la même signature au niveau du cinquième domaine transmembranaire. Le cluster I respecte fortement la signature du domaine transmembranaire V décrit par Montanini *et al*, tandis que le cluster II présente une signature différente.

Comme nous l'avions précédemment noté, les Agaricomycètes ne sont pas représentés au niveau du cluster II (Fig.126). Ceci soulève la question de la spécificité de substrat des transporteurs des autres Basidiomycètes dont des Mn-CDF groupent dans le cluster II. *Phanerochaete chrysosporium* ne possède qu'un Mn-CDF alors que *Laccaria bicolor* en possède 4, la redondance de ce groupe de CDF dans cet organisme pourrait être due à une spécificité de substrat différente pour certains d'entre eux ou, par exemple, à une différence de régulation de l'expression.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agaphonov MO, Plotnikova TA, Fokina AV, Romanova NV, Packeiser AN, Kang HA, Ter-Avanesyan MD (2007) Inactivation of the *Hansenula polymorpha* PMR1 gene affects cell viability and functioning of the secretory pathway. *FEMS Yeast Research* **7**: 1145-1152

Aitken MD, Venkatadri R, Irvine RL (1989) Oxidation of phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *phanerochaete chrysosporium*. *Water Research* **23**: 443-450

Alam S, Kodama R, Akiha F, Kamei S, Kawai S (2006) Alleviation of manganese phytotoxicity in barley with calcium. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 59-74

Ali SF, Duhart HM, Newport GD, Lipe GW, Slikker Jr W (1995) Manganese-induced reactive oxygen species: Comparison between Mn⁺² and Mn⁺³. *Neurodegeneration* **4**: 329-334

Ander P, Eriksson KE (1976) The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of microbiology* **109**: 1-8

Andersen B, Nissen AT (2000) Evaluation of media for detection of *Stachybotrys* and *Chaetomium* species associated with water-damaged buildings. *International Biodeterioration and Biodegradation* **46**: 111-116

Antebi A, Fink G (1992) The yeast Ca⁽²⁺⁾-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* **3**: 633-654

Archibald FS, Fridovich I (1981) Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **145**: 442-451

Archibald FS, Fridovich I (1982a) Investigations of the state of manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **215**: 589-596

Archibald FS, Fridovich I (1982b) The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: In vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **214**: 452-463

Aschner M, Gannon M (1994) Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: Saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Research Bulletin* **33**: 345-349

Babior BM (2004) NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology* **16**: 42-47

Bae W, Chen X (2004) Proteomic study for the cellular responses to Cd²⁺ in *Schizosaccharomyces pombe* through amino acid-coded mass tagging and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* **3**: 596-607

Baldwin M, Mergler D, Larribe F, Belanger S, Tardif R, Bilodeau L, Hudnell K (1999) Bioindicator and exposure data for a population based study of manganese. *Neurotoxicology* **20**: 343-353

Bankson DD, Kestin M, Rifai N (1993) Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clinics in Laboratory Medicine* **13**: 463-480

Bates S, MacCallum DM, Bertram G, Munro CA, Hughes HB, Buurman ET, Brown AJP, Odds FC, Gow NAR (2005) Candida albicans Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 23408-23415

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 1620-1624

Belinky PA, Flikshtein N, Dosoretz CG (2006) Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of Phanerochaete chrysosporium. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 222-228

Belinky PA, Flikshtein N, Lechenko S, Gepstein S, Dosoretz CG (2003) Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in Phanerochaete chrysosporium. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6500-6506

Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* **254**: 173-181

Berthelet S, Usher J, Shulist K, Hamza A, Maltez N, Johnston A, Fong Y, Harris LJ, Baetz K (2010) Functional genomics analysis of the Saccharomyces cerevisiae iron responsive transcription factor Aft1 reveals iron-independent functions. *Genetics* **185**: 1111-1128

Blanchette RA (1984) Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Appl Environ Microbiol* **48**: 647-653

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

Bodeker ITM, Nygren CMR, Taylor AFS, Olson A, Lindahl BD (2009) ClassII peroxidase-encoding genes are present in a phylogenetically wide range of ectomycorrhizal fungi. *ISME J* **3**: 1387-1395

Borchman D, Lamba OP, Salmassi S, Lou M, Yappert MC (1992) The dual effect of oxidation on lipid bilayer structure. *Lipids* **27**: 261-265

Bouchard M, Laforest F, Vandelac L, Bellinger D, Mergler D (2007) Hair manganese and hyperactive behaviors: Pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environmental Health Perspectives* **115**: 122-127

Bouchard MF, Sauvé S, Barbeau B, Legrand M, Brodeur M, Bouffard T, Limoges E, Bellinger DC, Mergler D (2011) Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environmental Health Perspectives* **119**: 138-143

Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* **134**: 707-716

Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* **128**: 617-630

Brautigam A, Schaumlöffel D, Krauss GJ, Wesenberg D (2009) Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides--a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Anal Bioanal Chem* **395**: 1737-1747

Bromfield SM, David DJ (1976) Sorption and oxidation of manganous ions and reduction of manganese oxide by cell suspensions of a manganese oxidizing bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* **8**: 37-43

Brookes PS (2005) Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology and Medicine* **38**: 12-23

Brouillet EP, Shinobu L, McGarvey U, Hochberg F, Beal MF (1993) Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp Neurol* **120**: 89-94

Brown MT, Foos B (2009) Assessing children's exposures and risks to drinking water contaminants: A manganese case study. *Human and Ecological Risk Assessment* **15**: 923-947

Bryant NJ, Stevens TH (1998) Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 230-247

Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y (1991) The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* **11**: 3229-3238

Burdsall HHJ, Eslyn W (1974) A new *Phanerochaete* with a *Chrysosporium* imperfect state. *Mycotaxon* **1**: 1-124

Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1999) The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**: 37-49

Cailliatte R, Lapeyre B, Briat JF, Mari S, Curie C (2009) The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem J* **422**: 217-228

Cairney J, Ashford A (1989) Reducing activity at the root surface in *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* Ectomycorrhizas. *Functional Plant Biology* **16**: 99-105

Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 10324-10330

Canovas D, Vooijs R, Schat H, de Lorenzo V (2004) The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P37 to arsenic. *J Biol Chem* **279**: 51234-51240

Carreira A, Paloma L, Loureiro V (1998) Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *Int J Food Microbiol* **41**: 223-230

Catalá A (2006) An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **38**: 1482-1495

Catalá A (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* **157**: 1-11

Cellier P, Gros P. (2004) The Nramp family. Landes Bioscience, New York, p. 194

Chen DM, Taylor AFS, Burke RM, Cairney JWG (2001) Identification of genes for lignin peroxidases and manganese peroxidases in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **152**: 151-158

Chen HJC, Row SW, Hong CL (2002) Detection and quantification of 5-chlorocytosine in DNA by stable isotope dilution and gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **15**: 262-268

Chen OS, Kaplan J (2000) CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 7626-7632

Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N, Hediger MA (1999) Yeast SMF1 mediates H⁺-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 35089-35094

Choinowski T, Blodig W, Winterhalter KH, Piontek K (1999) The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C[β] of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology* **286**: 809-827

Clemens S, Simm C (2003) *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. *New Phytologist* **159**: 323-330

Coassin M, Ursini F, Bindoli A (1992) Antioxidant effect of manganese. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **299**: 330-333

- Collin-Hansen C, Pedersen SA, Andersen RA, Steinnes E (2007) First report of phytochelatins in a mushroom: induction of phytochelatins by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia* **99**: 161-174
- Collins PJ, Dobson ADW (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3444-3450
- Collinson EJ, Grant CM (2003) Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J Biol Chem* **278**: 22492-22497
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 3678-3688
- 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**: 7413-7417
- Crossgrove JS, Allen DD, Bukaveckas BL, Rhineheimer SS, Yokel RA (2003) Manganese distribution across the blood-brain barrier. I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin. *Neurotoxicology* **24**: 3-13
- Cullen D, Kersten PJ (2004) Enzymology and molecular biology of lignin degradation. *The Mycota III : biochemistry and molecular biology*: 249-273
- Culotta VC, Yang M, Hall MD (2005) Manganese Transport and Trafficking: Lessons Learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4**: 1159-1165
- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et biophysica acta* **1763**: 747-758
- D'Acunzo F, Barreca AM, Galli C (2004) Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **31**: 25-30
- Dashtban M, Schraft H, Qin W (2009) Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences* **5**: 578-595
- Dastur DK, Manghani DK, Raghavendran KV (1971) Distribution and fate of ⁵⁴Mn in the monkey: studies of different parts of the central nervous system and other organs. *Journal of Clinical Investigation* **50**: 9-20
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779-795
- Davis CD, Greger JL (1992) Longitudinal changes of manganese-dependent superoxide dismutase and other indexes of manganese and iron status in women. *American Journal of Clinical Nutrition* **55**: 747-752

de Bie RM, Gladstone RM, Strafella AP, Ko JH, Lang AE (2007) Manganese-induced Parkinsonism associated with methcathinone (Ephedrone) abuse. *Arch Neurol* **64**: 886-889

De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE (1998) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine* **26**: 202-226

Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**: 471-481

Delhaize E, Gruber BD, Pittman JK, White RG, Leung H, Miao Y, Jiang L, Ryan PR, Richardson AE (2007) A role for the AtMTP11 gene of Arabidopsis in manganese transport and tolerance. *Plant Journal* **51**: 198-210

Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, Ryan PR (2003) Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* **15**: 1131-1142

Doddapaneni H, Chakraborty R, Yadav JS (2005) Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450_{ome}) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence for gene duplications and extensive gene clustering. *BMC Genomics* **6**

Dominguez A, Rivela I, Couto SR, Sanromán MA (2001) Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. *Process Biochemistry* **37**: 549-554

Dordas C (2009) Foliar application of manganese increases seed yield and improves seed quality of cotton grown on calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition* **32**: 160-176

Dosoretz C, Grethlein H (1991) Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **28-29**: 253-265

Durr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* **9**: 1149-1162

Dux MP, Inan M (2006) Identification and characterization of calcium and manganese transporting ATPase (PMRI) gene of *Pichia pastoris*. *Yeast* **23**: 613-621

Eguez L, Chung YS, Kuchibhatla A, Paidhungat M, Garrett S (2004) Yeast Mn²⁺ transporter, Smf1p, is regulated by ubiquitin-dependent vacuolar protein sorting. *Genetics* **167**: 107-117

Eichlerova I, Homolka L, Nerud F (2006) Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calypratus*, strain CCBAS 461. *Process Biochemistry* **41**: 941-946

Eide DJ. (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition*, Vol. 18, pp. 441-469.

Eide DJ (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et biophysica acta* **1763**: 711-722

Ellis CD, Macdiarmid CW, Eide DJ (2005) Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J Biol Chem* **280**: 28811-28818

Entian KD, Schuster T, Hegemann JH, Becher D, Feldmann H, Guldener U, Gotz R, Hansen M, Hollenberg CP, Jansen G, Kramer W, Klein S, Kotter P, Kricke J, Launhardt H, Mannhaupt G, Maierl A, Meyer P, Mewes W, Munder T, Niedenthal RK, Ramezani Rad M, Rohmer A, Romer A, Hinnen A, et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Molecular & general genetics : MGG* **262**: 683-702

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* **1**: 529-539

Eriksson KE, Nishida A. (1988) Methanol Oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, Vol. 161, pp. 322-326.

Eriksson KE, Pettersson B, Volc J, Musilek V (1986) Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**: 257-262

Farmer EE, Davoine C (2007) Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 380-386

Favero N, Bressa G, Costa P (1990) Response of *Pleurotus ostreatus* to cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **20**: 1-6

Feldman D (1985) Wood—chemistry, ultrastructure, reactions, by D. Fengel and G. Wegener, Walter de Gruyter, Berlin and New York, 1984, 613 pp. Price: 245 DM. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* **23**: 601-602

Feng Z, Ren J, Zhang H, Zhang L (2011) Disruption of PMR1 in *Kluyveromyces lactis* improves secretion of calf prochymosin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**: 100-103

Fenn P, Kent Kirk T (1981) Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of microbiology* **130**: 59-65

Fernandez-Sanchez JM, Rodragez-Vaizquez R, Ruiz-Aguilar G, Alvarez PJJ (2001) PCB biodegradation in aged contaminated soil: Interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **36**: 1145-1162

Finley JW (1999) Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration. *Am J Clin Nutr* **70**: 37-43

Finley JW, Johnson PE, Johnson LK (1994) Sex affects manganese absorption and retention by humans from a diet adequate in manganese. *Am J Clin Nutr* **60**: 949-955

Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology* **6**

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875

Fristedt U, Van Der Rest M, Poolman B, Konings WN, Persson BL (1999) Studies of cytochrome c oxidase-driven H⁺-coupled phosphate transport catalyzed by the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 permease in coreconstituted vesicles. *Biochemistry* **38**: 16010-16015

Fu D, Beeler T, Dunn T (1994) Sequence, mapping and disruption of CCC1, a gene that cross-complements the Ca²⁺-sensitive phenotype of *csg1* mutants. *Yeast* **10**: 515-521

Gaither LA, Eide DJ (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* **14**: 251-270

Garrison WM (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews* **87**: 381-398

Gehrig HH, Winter K, Cushman J, Borland A, Taybi T (2000) An Improved RNA Isolation Method for Succulent Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**: 369-376

Gelhaye E, Rouhier N, Gerard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y, Jacquot JP (2004) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14545-14550

Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. *Cell Mol Life Sci* **62**: 24-35

Ghasemi F, Tabandeh F, Bambai B, Sambasiva Rao KRS (2010) Decolorization of different azo dyes by phanerochaete chrysosporium RP78 under optimal condition. *International Journal of Environmental Science and Technology* **7**: 457-464

Gherardi MJ, Rengel Z (2003) Genotypes of lucerne (*Medicago sativa* L.) show differential tolerance to manganese deficiency and toxicity when grown in bauxite residue sand. *Plant and Soil* **249**: 287-296

Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research* **20**: 1425

Girotti AW (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* **39**: 1529-1542

Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 43, pp. 205-227.

Glenn JK, Akileswaran L, Gold MH (1986) Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* **251**: 688-696

Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S (2006) Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme and Microbial Technology* **38**: 1017-1021

Goetz G, Fkyerat A, MÃ©tais N, Kunz M, Tabacchi R, Pezet R, Pont V (1999) Resistance factors to grey mould in grape berries: Identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**: 759-767

Gold MH, Wariishi H, Valli K (1989) Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot: Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In *ACS Symposium Series*, pp 127-140. Toronto, Ont, Can

Gong X, Liu C, Wang Y, Zhao X, Zhou M, Hong M, Wang S, Li N, Hong F (2010) Inhibition of the photosynthesis in maize caused by manganese deficiency. *Cereal Research Communications* **38**: 353-365

Gonzales L, Hernandez JR, Perestelo F, Carnicero A, Falcon MA (2002) Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 474-481

Gougerot-Pocidallo MA, el Benna J, Elbim C, Chollet-Martin S, Dang MC (2002) Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. *RÃ©gulation de l'explosion oxydative des polynuclÃ©aires neutrophiles humains par les cytokines pro- et anti-inflammatoires* **196**: 37-46

Gray MW, Burger G, Lang BF (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome biology* **2**: REVIEWS1018

Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985) Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 674-676

Guerinot ML (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1465**: 190-198

Guilarte TR Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. *Environ Health Perspect* **118**: 1071-1080

Guillen F, Martinez AT, Martinez MJ (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* **209**: 603-611

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488

Gusse AC, Miller PD, Volk TJ (2006) White-rot fungi demonstrate first biodegradation of phenolic resin. *Environ Sci Technol* **40**: 4196-4199

Hafeman D, Factor-Litvak P, Cheng Z, van Geen A, Ahsan H (2007) Association between manganese exposure through drinking water and infant mortality in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* **115**: 1107-1112

Hall JL, Williams LE (2003) Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2601-2613

Halliwell B, Cross CE (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 10**: 5-12

Hamer DH (1986) Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* **VOL. 55**: 913-951

Hammel KE (1994) H₂O₂ recycling during oxidation of the arylglycerol β -aryl ether lignin structure by lignin peroxidase and glyoxal oxidase. *Biochemistry* **33**: 13349-13354

Hammel KE, Tien M, Kalyanaraman B, Kirk TK (1985) Mechanism of oxidative C α -C β cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. Stoichiometry and involvement of free radicals. *J Biol Chem* **260**: 8348-8353

Hansen SL, Ashwell MS, Legleiter LR, Fry RS, Lloyd KE, Spears JW (2009) The addition of high manganese to a copper-deficient diet further depresses copper status and growth of cattle. *Br J Nutr* **101**: 1068-1078

Harada E, Yamaguchi Y, Koizumi N, Hiroshi S (2002) Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* **159**: 445-448

Hazra TK, Hill JW, Izumi T, Mitra S. (2001) Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in Vivo functions. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 68, pp. 193-205.

Helbig K, Bleuel C, Krauss GJ, Nies DH (2008) Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **190**: 5431-5438

Henriksson G, Johansson G, Pettersson G (2000) A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology* **78**: 93-113

Henson JM, Butler MJ, Day AW (1999) The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 447-471

Hofrichter M (2002) Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 454-466

Holland HD (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **361**: 903-915

Hong J-H, Kim M-J, Park M-R, Kwag O-G, Lee I-S, Byun BH, Lee S-C, Lee K-B, Rhee S-J (2004) Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chimica Acta* **340**: 107-115

Horsburgh MJ, Wharton SJ, Karavolos M, Foster SJ (2002) Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends in Microbiology* **10**: 496-501

Horst WJ (1999) Physiology of manganese toxicity and tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **162**: 273-274

Hu G, Linning R, McCallum B, Banks T, Cloutier S, Butterfield Y, Liu J, Kirkpatrick R, Stott J, Yang G, Smailus D, Jones S, Marra M, Schein J, Bakkeren G (2007) Generation of a wheat leaf rust, *Puccinia triticina*, EST database from stage-specific cDNA libraries. *Mol Plant Pathol* **8**: 451-467

Huang X, Wang D, Liu C, Hu M, Qu Y, Gao P (2003) The roles of veratryl alcohol and nonionic surfactant in the oxidation of phenolic compounds by lignin peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311**: 491-494

Hunter JG (1942) A chlorosis of bracken due to manganese deficiency [7]. *Nature* **150**: 578-579

Hurley LS (1981) Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. *Physiological Reviews* **61**: 249-295

Ikeda S, Seki S (2001) Base excision repair: DNA glycosylase and AP endonuclease. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme* **46**: 916-923

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28

Ionescu JG, Poljsak B (2010) Metal ions mediated pro-oxidative reactions with vitamin C: Possible implications for treatment of different malignancies. *International Journal of Cancer Prevention* **3**: 149-174

Ishii T, Kumazawa S, Sakurai T, Nakayama T, Uchida K (2006) Mass spectroscopic characterization of protein modification by malondialdehyde. *Chemical Research in Toxicology* **19**: 122-129

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

Ito H, Inouhe M, Tohoyama H, Joho M (2007) Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. *Biometals* **20**: 773-780

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schuylender A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossmann AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Bodel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822

Janse BJH, Gaskell J, Akhtar M, Cullen D (1998) Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3536-3538

Jensen LT, Ajua-Alemanji M, Culotta VC (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* High Affinity Phosphate Transporter Encoded by PHO84 Also Functions in Manganese Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 42036-42040

Ji F, Luo XG, Lu L, Liu B, Yu SX (2006) Effects of manganese source and calcium on manganese uptake by in vitro everted gut sacs of broilers' intestinal segments. *Poultry Science* **85**: 1217-1225

Johansson T, Nyman PO (1993) Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys* **300**: 49-56

Jonsson L, Sjoström K, Haggström I, Nyman PO (1995) Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1251**: 210-215

Kachlishvili E, Penninckx MJ, Tsiklauri N, Elisashvili V (2006) Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**: 391-397

Kagi JH, Valee BL (1960) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *The Journal of biological chemistry* **235**: 3460-3465

Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A (1989) Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *MGG Molecular & General Genetics* **219**: 161-167

- Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, M¹/₄ller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer RH, Becker K (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **291**: 643-646
- Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* **70**: 220-233
- Kelley RL, Reddy CA (1986) Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* **166**: 269-274
- Kersten P, Cullen D (2007) Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 77-87
- Kersten PJ (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 2936-2940
- Kersten PJ, Kirk TK (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* **169**: 2195-2201
- Kersten PJ, Witek C, Vanden Wymelenberg A, Cullen D (1995) *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase is encoded by two allelic variants: Structure, genomic organization, and heterologous expression of *glx1* and *glx2*. *Journal of Bacteriology* **177**: 6106-6110
- Khan MF, Wu X, Tipnis UR, Ansari GAS, Boor PJ (2002) Protein adducts of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal in livers of iron loaded rats: quantitation and localization. *Toxicology* **173**: 193-201
- Kilaru S, Hoegger PJ, K^ues U (2006) The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics* **50**: 45-60
- Kim JI, Lee HG (2008) Increases in the proteins modified by malondialdehyde and hydroxynonenal in the hippocampus of prion-infected mice. *Journal of Bacteriology and Virology* **38**: 47-52
- Kim SA, Punshon T, Lanzirrotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Guerinot ML (2006) Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* **314**: 1295-1298
- Kitao M, Lei TT, Koike T (1997) Effects of manganese toxicity on photosynthesis of white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **101**: 249-256
- Klingenberg M (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**: 1978-2021
- Kneer R, Kutchan TM, Hochberger A, Zenk MH (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Archives of microbiology* **157**: 305-310

Kobayashi K, Kuroda J, Shibata N, Hasegawa T, Seko Y, Satoh M, Tohyama C, Takano H, Imura N, Sakabe K, Fujishiro H, Himeno S (2007) Induction of metallothionein by manganese is completely dependent on interleukin-6 production. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **320**: 721-727

Kondakis XG, Makris N, Leotsinidis M, Prinou M, Papapetropoulos T (1989) Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. *Archives of Environmental Health* **44**: 175-178

Kondo N, Isobe M, Imai K, Goto T, Murasugi A, Hayashi Y (1983) Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Tetrahedron Letters* **24**: 925-928

Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* **40**: 37-44

Kumánovics A, Poruk KE, Osborn KA, Ward DM, Kaplan J (2006) YKE4 (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 22566-22574

Kump LR (2008) The rise of atmospheric oxygen. *Nature* **451**: 277-278

Kwon E-S, Jeong J-H, Roe J-H (2006) Inactivation of Homocitrate Synthase Causes Lysine Auxotrophy in Copper/Zinc-containing Superoxide Dismutase-deficient Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 1345-1351

Lapinskas PJ, Cunningham KW, Xiu Fen L, Fink GR, Culotta VC (1995) Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 1382-1388

Lapinskas PJ, Lin SJ, Culotta VC (1996) The role of the *Saccharomyces cerevisiae* CCC1 gene in the homeostasis of manganese ions. *Molecular Microbiology* **21**: 519-528

Larrondo LF, Salas L, Melo F, Vicuna R, Cullen D (2003) A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6257-6263

Lauer Júnior CM, Bonatto D, Mielniczki-Pereira AA, Zilles Schuch A, Dias JF, Yoneama M-L, Henriques JAP (2008) The Pmr1 protein, the major yeast Ca²⁺-ATPase in the Golgi, regulates intracellular levels of the cadmium ion. *FEMS Microbiology Letters* **285**: 79-88

Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW (1997) Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 3520-3526

Leisola MSA, Schmidt B, Thanei-Wyss U, Fiechter A (1985) Aromatic ring cleavage of veratryl alcohol by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* **189**: 267-270

Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine* **32**: 790-796

Levine RL, Moskovitz J, Stadtman ER (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* **50**: 301-307

Li L, Bagley D, Ward DM, Kaplan J (2008) Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 1326-1337

Li L, Chen OS, Ward DM, Kaplan J (2001) CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 29515-29519

Li L, Kaplan J (1997) Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 28485-28493

Li L, Kaplan J (2001) The Yeast Gene *MSC2*, a Member of the Cation Diffusion Facilitator Family, Affects the Cellular Distribution of Zinc. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 5036-5043

Li L, Kaplan J (2004) A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *J Biol Chem* **279**: 33653-33661

Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczyпка M, Thiele DJ, Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 42-47

Lidon FC, Teixeira MG (2000) Oxy radicals production and control in the chloroplast of Mn-treated rice. *Plant Science* **152**: 7-15

Lin H, Burton D, Li L, Warner DE, Phillips JD, Ward DM, Kaplan J (2009) Gain-of-function mutations identify amino acids within transmembrane domains of the yeast vacuolar transporter Zrc1 that determine metal specificity. *Biochem J* **422**: 273-283

Lin SJ, Culotta VC (1996) Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 6303-6312

Lind C, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I, Cotgreave IA (1998) Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 481-486

Liu XF, Culotta VC (1999) Post-translation control of Nramp metal transport in yeast: Role of metal ions and the *BSD2* gene. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 4863-4868

Liu XF, Supek F, Nelson N, Culotta VC (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 11763-11769

Lu M, Chai J, Fu D (2009) Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1063-1067

Luk E, Carroll M, Baker M, Culotta VC (2003) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10353-10357

Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y, Culotta VC (2005) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 22715-22720

Luk EEC, Culotta VC (2001) Manganese Superoxide Dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* Acquires Its Metal Co-factor through a Pathway Involving the Nramp Metal Transporter, Smf2p. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 47556-47562

Ma LJ, Ibrahim AS, Skory C, Grabherr MG, Burger G, Butler M, Elias M, Idnurm A, Lang BF, Sone T, Abe A, Calvo SE, Corrochano LM, Engels R, Fu J, Hansberg W, Kim JM, Kodira CD, Koehrsen MJ, Liu B, Miranda-Saavedra D, O'Leary S, Ortiz-Castellanos L, Poulter R, Rodriguez-Romero J, Ruiz-Herrera J, Shen YQ, Zeng Q, Galagan J, Birren BW, Cuomo CA, Wickes BL (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genetics* **5**

MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D (2000a) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* **19**: 2845-2855

MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D (2000b) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**: 2845-2855

Maeda T, Sugiura R, Kita A, Saito M, Deng L, He Y, Lu Y, Fujita Y, Takegawa K, Shuntoh H, Kuno T (2004) Pmr1, a P-type ATPase, and Pdt1, an Nramp homologue, cooperatively regulate cell morphogenesis in fission yeast: The importance of Mn²⁺ homeostasis. *Genes to Cells* **9**: 71-82

Manchanda R, Brudvig GW, Crabtree RH (1995) High-valent oxomanganese clusters: structural and mechanistic work relevant to the oxygen-evolving center in photosystem II. *Coordination Chemistry Reviews* **144**: 1-38

Mandal D, Rulli SJ, Rao R (2003) Packing Interactions between Transmembrane Helices Alter Ion Selectivity of the Yeast Golgi Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase PMR1. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 35292-35298

Mandal D, Woolf TB, Rao R (2000) Manganese selectivity of Pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue Gln783 in transmembrane segment 6: Residue Asp778 is essential for cation transport. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 23933-23938

Mandal TK, Chatterjee SN (1980) Ultraviolet- and sunlight-induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiation Research* **83**: 290-302

- Mansur M, Arias ME, Copa-Patino JL, Flardh M, Gonzalez AE (2003) The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* **95**: 1013-1020
- Margoshes M (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 4813-4814
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation--DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**: 83-95
- Marschner H (1991) Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant and Soil* **134**: 1-20
- Marschner P, Ascher JS, Graham RD (1991) Effect of manganese-reducing rhizosphere bacteria on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and on manganese uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biology and Fertility of Soils* **12**: 33-38
- Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Sollewijn Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* **22**: 695-700
- Martinez MJ, Ruiz-Duenas FJ, Guillen F, Martinez AT (1996) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* **237**: 424-432
- Matityahu A, Hadar Y, Dosoretz CG, Belinky PA (2008) Gene silencing by RNA Interference in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5359-5365
- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551-565
- McDougall DN, Blanchette RA (1996) Metal ion adsorption by pseudosclerotial plates of *Phellinus weirii*. *Mycologia* **88**: 98-103
- Meharg AA (2003) The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycological research* **107**: 1253-1265
- Mercer FV, Nittim M, Possingham JV (1962) The effect of manganese deficiency on the structure of spinach chloroplasts. *The Journal of cell biology* **15**: 379-381
- Mercier A, Pelletier B, Labbé S (2006) A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* **5**: 1866-1881
- Minet M, Dufour ME, Lacroute F (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant Journal* **2**: 417-422

- Momonoi K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K, Nitta A, Nishimura M (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant Journal* **59**: 437-447
- Monsen ER (1989) The 10th edition of the recommended dietary allowances: What's new in the 1989 RDAs? *Journal of the American Dietetic Association* **89**: 1748-1752
- Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* **8**: 107
- Moriarty-Craige SE, Jones DP (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* **24**: 481-509
- Moroni JS, Scott BJ, Wratten N (2003) Differential tolerance of high manganese among rapeseed genotypes. *Plant and Soil* **253**: 507-519
- Mouillon JM, Persson BL (2005) Inhibition of the protein kinase A alters the degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **48**: 226-234
- Muheim A, Waldner R, Leisola MSA, Fiechter A (1990) An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technology* **12**: 204-209
- Muheim A, Waldner R, Sanglard D, Reiser J, Schoemaker HE, Leisola MSA (1991) Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry* **195**: 369-375
- Mullis KB, Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, Vol. 155, pp. 335-350.
- Murphy VA, Wadhvani KC, Smith QR, Rapoport SI (1991) Saturable transport of manganese(II) across the rat blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* **57**: 948-954
- Nevo Y, Nelson N (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et biophysica acta* **1763**: 609-620
- Nicholas DJD (1946) Detection of manganese deficiency in plants by tissue tests, using tetramethyldiaminodiphenylmethane [13]. *Nature* **157**: 696
- Nicholas KB, Nicholas HBJ (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *Distributed by the author* <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>

Nishida S, Morinaga Y, Obata H, Mizuno T (2011) Identification of the N-terminal region of TjZNT2, a Zrt/Irt-like protein family metal transporter, as a novel functional region involved in metal ion selectivity. *FEBS Journal* **278**: 851-858

Nishimura K, Yasumura K, Igarashi K, Harashima S, Kakinuma Y (1999) Transcription of some PHO genes in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by spt7p. *Yeast* **15**: 1711-1717

Okubo M, Yamada K, Hosoyamada M, Shibasaki T, Endou H (2003) Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **187**: 162-167

Oracz K, Bouteau HEM, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal* **50**: 452-465

Orgad S, Nelson H, Segal D, Nelson N (1998) Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant malvolio. *Journal of Experimental Biology* **201**: 115-120

Orhan Y, Buyukgungor H (2000) Enhancement of biodegradability of disposable polyethylene in controlled biological soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* **45**: 49-55

Padua M, Cavaco AM, Aubert S, Bligny R, Casimiro A (2010) Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: Interaction with manganese. *Physiologia Plantarum* **138**: 301-311

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G (2000) Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 920-924

Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G (2000) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development* **112**: 169-183

Park CS, Kim JY, Crispino C, Chang CC, Ryu DDY (1998) Molecular cloning of YIPMR1, a *S. cerevisiae* PMR1 homologue encoding a novel P-type secretory pathway Ca²⁺-ATPase, in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **206**: 107-116

Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, Margis-Pinheiro M, Ioannidis V, Penel C, Falquet L, Dunand C (2007) PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry* **68**: 1605-1611

Paszczynski A, Huynh VB, Crawford R (1985) Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters* **29**: 37-41

Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJM, Brandolin G (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**: 39-44

Pedrajas JR, Miranda-Vizuete A, Javanmardy N, Gustafsson JA, Spyrou G (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* **275**: 16296-16301

Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pedas P, Husted S, Maathuis FJM, Blaudez D, Chalot M, Sanders D (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 8532-8537

Petersson J, Pattison J, Kruckeberg AL, Berden JA, Persson BL (1999) Intracellular localization of an active green fluorescent protein-tagged Pho84 phosphate permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **462**: 37-42

Piontek K, Antorini M, Choinowski T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å... resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 37663-37669

Piper CS (1944) Manganese deficiency in oats [6]. *Nature* **153**: 197

Pisanelli I, Kujawa M, Spadiut O, Kittl R, Halada P, Volc J, Mozuch MD, Kersten P, Haltrich D, Peterbauer C (2009) Pyranose 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*-Expression in *E. coli* and biochemical characterization. *Journal of Biotechnology* **142**: 97-106

Podgornik H, Stegu M, Zibert E, Perdih A (2001) Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium*—an artefact caused by Mn(III)? *Letters in Applied Microbiology* **32**: 407-411

Pointing SB (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**: 20-33

Portnoy ME, Jensen LT, Culotta VC (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochemical Journal* **362**: 119-124

Posey JE, Gherardini FC (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**: 1651-1653

Puig S, Askeland E, Thiele DJ (2005) Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**: 99-110

Rabinovich ML, Bolobova AV, Vasil'chenko LG (2004) [Decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics by fungi]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **40**: 5-23

Rai LC, Gaur JP, Kumar HD (1981) Protective effects of certain environmental factors on the toxicity of zinc, mercury, and methylmercury to *Chlorella vulgaris*. *Environmental Research* **25**: 250-259

Ram Kumar M, Praveen Kumar K, Kavitha V, Rajarami Reddy G (2010) Calcium addition potentially reverses lead and manganese induced enzymatic and behavioral alterations in rats. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* **5**: 1193-1205

Reddi AR, Jensen LT, Culotta VC (2009) Manganese homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Reviews* **109**: 4722-4732

Rengel Z (1994) Control of Mn status in plants and rhizosphere: Genetic aspects of host and pathogen effects in the wheat take-all interaction. *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*: 125-145

Rengel Z (2002) Genetic control of root exudation. *Plant and Soil* **245**: 59-70

Rengel Z, Marschner P (2005) Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic differences. *New Phytologist* **168**: 305-312

Rodrigues V, Yean Cheah P, Ray K, Chia W (1995) Malvolio, the Drosophila homologue of mouse NRAM1 (Bcg), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *EMBO Journal* **14**: 3007-3020

Rodríguez-Rincón F, Suarez A, Lucas M, Larrondo L, de la Rubia T, Polaina J, Martínez J (2010) Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavido-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. *Archives of Microbiology* **192**: 883-892

Rosas A, Rengel Z, Mora MDLL (2007) Manganese supply and pH influence growth, carboxylate exudation and peroxidase activity of ryegrass and white clover. *Journal of Plant Nutrition* **30**: 253-270

Rosas A, Rengel Z, Ribera A, de La Luz Mora M (2011) Phosphorus nutrition alleviates manganese toxicity in *Lolium perenne* and *Trifolium repens*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **174**: 210-219

Rosch JW, Gao G, Ridout G, Wang YD, Tuomanen EI (2009) Role of the manganese efflux system *mntE* for signalling and pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **72**: 12-25

Rothschild N, Levkowitz A, Hadar Y, Dosoretz CG (1999) Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 483-488

Rouhier N, Jacquot J-P (2002) Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynthesis Research* **74**: 259-268

Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, LeVitre J, Davidow LS, Mao JI, Moir DT (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca^{2+} ATPase family. *Cell* **58**: 133-145

Ruiz-Duenas FJ, Morales M, Garcia E, Miki Y, Martinez MJ, Martinez AT (2009) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany* **60**: 441-452

Sadlik JK (2002) 7th Internal Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine: Saint Petersburg (Russia), 5-9 May, 2002. 7 MiÉ©dzynarodowe Sympozjum "Jony Metali w Biologii i Medycynie": Sankt Petersburg (Rosja), 5-9 Maja 2002 roku **51**: 175-177

Saier Jr MH (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 354-411

Saier Jr MH, Yen MR, Noto K, Tamang DG, Elkan C (2009) The Transporter Classification Database: Recent advances. *Nucleic acids research* **37**: D274-D278

Saiki RK, Scharf S, Faloona F (1985) Enzymatic amplification of β^2 -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354

Sambrook J, Fritsch EF, T. M (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manuel, 2nd edition. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Sanotsky Y, Lesyk R, Fedoryshyn L, Komnatska I, Matviyenko Y, Fahn S (2007) Manganic encephalopathy due to "ephedrone" abuse. *Mov Disord* **22**: 1337-1343

Schmidt O (2007) Indoor wood-decay basidiomycetes: Damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycological Progress* **6**: 261-279

Selikhova M, Fedoryshyn L, Matviyenko Y, Komnatska I, Kyrylchuk M, Krolicki L, Friedman A, Taylor A, JÄger HR, Lees A, Sanotsky Y (2008) Parkinsonism and dystonia caused by the illicit use of ephedrone - A longitudinal study. *Movement Disorders* **23**: 2224-2231

Shimaoka I, Kodama J, Nishino K, Itokawa Y (1993) Purification of a copper binding peptide from the mushroom *Grifola frondosa* and its effect on copper absorption. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **4**: 33-38

Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Pérez-Boada M, Martínez MJ, Sigoillot J-C, Asther M, Colom JF, Martínez ÁT (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* **115**: 333-343

Silber A, Bar-Tal A, Levkovitch I, Bruner M, Yehezkel H, Shmuel D, Cohen S, Matan E, Karni L, Aktas H, Turhan E, Aloni B (2009) Manganese nutrition of pepper (*Capsicum annum* L.): Growth, Mn uptake and fruit disorder incidence. *Scientia Horticulturae* **123**: 197-203

Singh D, Zeng J, Laskar DD, Deobald L, Hiscox WC, Chen S (2011) Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomass and Bioenergy* **35**: 1030-1040

Sollewijn Gelpke MD, Lee J, Gold MH (2002) Lignin peroxidase oxidation of veratryl alcohol: Effects of the mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L. *Biochemistry* **41**: 3498-3506

Soriani FM, Martins VP, Magnani T, Tudella VG, Curti C, Uyemura SA (2005) A PMR1-like calcium ATPase of *Aspergillus fumigatus*: Cloning, identification and functional expression in *S. cerevisiae*. *Yeast* **22**: 813-824

Spencer D, Possingham JV (1961) The effect of manganese deficiency on photophosphorylation and the oxygen-evolving sequence in spinach chloroplasts. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* **52**: 379-381

Spiteller D, Spiteller G (2000) Identification of toxic 2,4-Decadienal in oxidized, low-density lipoprotein by solid-phase microextraction. *Angewandte Chemie - International Edition* **39**: 583-585

Stadtman ER, Berlett BS, Chock PB (1990) Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 384-388

Stepens A, Logina I, Liguts V, Aldiņā P, Ekņeina I, Platkajis A, Martiņšone I, Terauds E, Rozentale B, Donaghy M (2008) A Parkinsonian syndrome in methcathinone users and the role of manganese. *New England Journal of Medicine* **358**: 1009-1017

Stocker R, Bowry VW, Frei B (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 1646-1650

Sundaramoorthy M, Gold MH, Poulos TL (2010) Ultrahigh (0.93Å) resolution structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: implications for the catalytic mechanism. *J Inorg Biochem* **104**: 683-690

Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5105-5110

Suttle NF (2010) The mineral nutrition of livestock, 4th edition. *Commonwealth Agricultural Bureaux*

Tanabe Y, Watanabe MM, Sugiyama J (2005) Evolutionary relationships among basal fungi (Chytridiomycota and Zygomycota): Insights from molecular phylogenetics. *The Journal of General and Applied Microbiology* **51**: 267-276

Tanaka T, Izawa S, Inoue Y (2005) GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 42078-42087

Taneja SK, Mandal R (2008) Attenuation of Zn-induced acute pancreatitis in wistar rat fed on Cu- and Mg- enriched modified poultry Egg. *Biological Trace Element Research* **125**: 245-254

Taudte N, Grass G (2010) Point mutations change specificity and kinetics of metal uptake by ZupT from *Escherichia coli*. *Biometals* **23**: 643-656

- Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26
- Tien M (1987) Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *Crit Rev Microbiol* **15**: 141-168
- Tien M, Berlett BS, Levine RL, Chock PB, Stadtman ER (1999) Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7809-7814
- Tien M, Kirk TK (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 2280-2284
- Tien M, Kirk TK (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* **161**: 238-249
- Ton V-K, Mandal D, Vahadji C, Rao R (2002) Functional Expression in Yeast of the Human Secretory Pathway Ca²⁺, Mn²⁺-ATPase Defective in Hailey-Hailey Disease. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 6422-6427
- Toneva VT, Shalygo NV, Voronetskaya VV, Averina NG, Gechev TS, Minkov IN (2002) Investigation of the porphyrins accumulation in barley leaves incubated with Mn²⁺ cations and Î'-aminolevulinic acid. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1047-1053
- Tripathi BN, Bhatt I, Dietz KJ (2009) Peroxiredoxins: A less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* **235**: 3-15
- Truog E (1946) Soil reaction influence on availability of plant nutrients. *Soil Science Society of America Proceedings* **11**: 305-308
- Twyman ES (1943) Manganese deficiency in oats [4]. *Nature* **152**: 216
- Uchida K, Kawakishi S (1993) 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Letters* **332**: 208-210
- Ueno Y (1985) The toxicology of mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology* **14**: 99-132
- Vacchina V, Baldrian P, Gabriel J, Szpunar J (2002) Investigation of the response of wood-rotting fungi to copper stress by size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with ICP MS detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **372**: 453-456

Valderrama B, Oliver P, Medrano-Soto A, Vazquez-Duhalt R (2003) Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **84**: 289-299

Van der Woude MW, Boominathan K, Adinarayana Reddy C (1993) Nitrogen regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production is independent of carbon and manganese regulation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of microbiology* **160**: 1-4

Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**: 249-259

Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell* **73**: 469-485

Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 8469-8474

Vouldoukis I, Conti M, Krauss P, Kamate C, Blazquez S, Tefit M, Mazier D, Calenda A, Dugas B (2004) Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytother Res* **18**: 957-962

Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808

Waldeck AR, Stocker R (1996) Radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: insights obtained from kinetic modeling. *Chem Res Toxicol* **9**: 954-964

Wallace MA, Liou LL, Martins J, Clement MHS, Bailey S, Longo VD, Valentine JS, Gralla EB (2004) Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 32055-32062

Walsh T (1945) Susceptibility of grasses to manganese deficiency [9]. *Nature* **155**: 429-430

Wang C, Sun H, Li J, Li Y, Zhang Q (2009a) Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere* **77**: 733-738

Wang H, Xu Z, Gao L, Hao B (2009b) A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evolutionary Biology* **9**

Wariishi H, Dunford HB, MacDonald ID, Gold MH (1989) Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *J Biol Chem* **264**: 3335-3340

Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Levy D, Factor-Litvak P, Kline J, van Geen A, Slavkovich V, Lolocono NJ, Cheng Z, Zheng Y, Graziano JH (2006) Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihaazar, Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* **114**: 124-129

Wedepohl KH (2008) The Composition of Earth's Upper Crust, Natural Cycles of Elements, Natural Resources. In *Elements and Their Compounds in the Environment*, pp 2-16. Wiley-VCH Verlag GmbH

Wei W, Chai T, Zhang Y, Han L, Xu J, Guan Z (2009) The *Thlaspi caerulescens* NRAMP homologue TcNRAMP3 is capable of divalent cation transport. *Molecular Biotechnology* **41**: 15-21

Wei Y, Marchi V, Wang R, Rao R (1999) An N-terminal EF hand-like motif modulates ion transport by Pmr1, the yeast Golgi Ca(2+)/Mn(2+)-ATPase. *Biochemistry* **38**: 14534-14541

Wei Yang TJ, Perry PJ, Ciani S, Pandian S, Schmidt W (2008) Manganese deficiency alters the patterning and development of root hairs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3453-3464

Weng JK, Chapple C (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist* **187**: 273-285

West TP, Strohfus B (1997) Effect of manganese on polysaccharide production and cellular pigmentation in the fungus *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 233-235

White PJ, Brown PH (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* **105**: 1073-1080

Whittaker MM, Kersten PJ, Nakamura N, Sanders-Loehr J, Schweizer ES, Whittaker JW (1996) Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 681-687

Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in *C₃* plants. *EMBO Journal* **16**: 4806-4816

Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Veronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**: 901-906

Wójcik M, Tukiendorf A (2011) Glutathione in adaptation of *Arabidopsis thaliana* to cadmium stress. *Biologia Plantarum* **55**: 125-132

Woolf A, Wright R, Amarasiwardena C, Bellinger D (2002) A child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environmental Health Perspectives* **110**: 613-616

Wu H, Gong C, Liu P, Wang Z, Chen J (2010) Phytochelatins and metallothionein-like proteins in *Solanum nigrum* L. and *Conyza canadensis* L. roots and leaves under Mn stress. *Huanjing Kexue Xuebao/Acta Scientiae Circumstantiae* **30**: 2058-2064

Wu Sun h (1994) Effect of manganese excess on the soybean plant cultivated under various growth conditions. *Journal of Plant Nutrition* **17**: 991-1003

Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 18381-18385

Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shi YY, Wu J, Hong YZ, Wang YP (2004) Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia* **96**: 26-35

Xu F (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* **35**: 7608-7614

Yang J, Kang HA, Ko SM, Chae SK, Ryu DDY, Kim JY (2001) Cloning of the *Aspergillus niger* pmr A gene, a homologue of yeast PMR1, and characterization of a pmr A null mutant. *FEMS Microbiology Letters* **199**: 97-102

Yokel RA, Crossgrove JS, Bukaveckas BL (2003) Manganese distribution across the blood-brain barrier. II. Manganese efflux from the brain does not appear to be carrier mediated. *Neurotoxicology* **24**: 15-22

Zhao H, Eide D (1996) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 23203-23210

Zhou J, Goldsbrough PB (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 875-884

Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, MartÃ-nez AT, MartÃ-nez MJ (2006) Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 141-148

ANNEXES

Annexe 1 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR. Les températures d'hybridation (TM) sont indiquées en degrés celcius. Le nombre de cycle est précisé pour la RT-PCR, il est fixé à 40 pour le clonage.

Gène	Nombres de Cycles pour la RT-PCR	Tm	Orientation	Séquence (5'→3')	Fonction de l'amorce
PcPhT1	31	58	F	ATGGCTTCCTACGCAGGTGACAA	RT-PCR et clonage pFL61
			R	CTACACGCGGACGACTGCC	RT-PCR et clonage pFL61
PcSMFa	31	58	F	CCCAAGCTTATGGCTTCTACGCAGGTGACAA	Clonage pYES2-GFP
			R	CCCGGATCCCCACGGCGACGACTGCC	Clonage pYES2-GFP
			F	GACCGTCTCTGCCACCGGAG	RT-PCR
			R	AGCACCCAGTCCGCTTCTCTCCTC	RT-PCR
			F	ATGCCCTTTAACGTCCTCCCTCTG	Clonage pFL61
			R	CTAGCTCTCGCCAGACACAGACTC	Clonage pFL61
PcSMFb	31	58	F	CCACTCGGGAACAAGCATAACAC	RT-PCR
			R	GCGACGACGAGAGCCAGATG	RT-PCR
			F	ATGCCGCCGCTCGGGAACA	Clonage pFL61
			R	TCAGCAGCCATCCGTTGCTAAAG	Clonage pFL61
			F	ATGACGGGCTTGGTGAGCTTGTT	RT-PCR et clonage pFL61
			R	TCAGTGGTCTGTCCAAACGACTG	RT-PCR et clonage pFL61
PcATX2	31	58	F	CCCAAGCTTATGACGGGCTTGGTGAGCTTGTT	Clonage pYES2-GFP
			R	CCCGGATCCCCGTTGGTCTCCAAACGACTG	Clonage pYES2-GFP
			F	ATGGAACCTCAGCAGGCAAAAAC	RT-PCR et clonage pFL61
			R	GCGATCATGATACCACACGCAGG	RT-PCR
			F	TCATAATCCGCTCATCTCTCTTTCTT	Clonage pFL61
			R	CCCAAGCTTATGGAACCTCAGCACGCAAAAAC	Clonage pYES2-GFP
			F	CCCGGATCCCCCTATCCGCTCATCTCTCTTTCTT	Clonage pYES2-GFP
			R	ATGGTTCATCGTGAATCCACCG	RT-PCR et clonage pFL61
			F	TCACACATGCTTGGGTGCTC	RT-PCR et clonage pFL61
			R	CCCAAGCTTATGGTTCATCGTGAATCCACCG	Clonage pYES2-GFP
PcMnT	31	58	F	CCCGGATCCCCACATGCTTGGGTGCTC	Clonage pYES2-GFP
			R	CCCGGATCCCCACATGCTTGGGTGCTC	Clonage pYES2-GFP

Gène	Nombre de Cycles pour la RT-PCR	Tm	Orientation	Séquence (5' → 3')	Fonction de l'amorce
PeCCC1	31	58	F	CCATCAGCGAGCAAGGCCAG	RT-PCR
		58	R	CTGACCAGCAGCACCCGTGACA	RT-PCR
		56	F	ATGTCTTCCTCGCAACCCCC	clonage pFL61
		56	R	TCATTCTGGCGCTTCAAGGCAG	clonage pFL61
PePMR1	29	56	F	CCCAAGCTTATGCTCTCCICGCAACCCCC	Clonage pYES2-GFP
		56	R	CCCCGGATCCCCCTTCGGCCCTTCAAAGGCAG	Clonage pYES2-GFP
		58	F	CGCAGCTCTGACGTTGATCAG	RT-PCR
		58	R	TCAGAGCGGCTCCTCCGCGA	RT-PCR et clonage pFL61
PeActine	29	58	F	ATGGCGTTGAACGGAAAGAT	clonage pFL61
		58	F	ACTATATCAAAGGCTCTATCGACGC	clonage pFL61
		58	R	CCGAAACGTAGTAGAACTTGCAGC	clonage pFL61
		72	R	AGCCCGAACAGCGTACTAAGCGTGATCAA	Race-PCR
		58	F	GCTCTGATAAGACAGGTACCC TGAC	clonage pFL61
		58	R	GTCGCCGTGATCATCACGACC	clonage pFL61
		58	F	CTCGCTGTGGCTGCCATTCC	clonage pFL61
		58	R	CCAAGGCCACGGTCTGCAGC	clonage pFL61
		58	F	CAAGGCTAACCGTGAGAAGATG	RT-PCR
		58	R	TGTTGCCGTAGAGGTCACGAC	RT-PCR
		58	F	TGTGTTACCCACCACCCGAGAAG	RT-PCR
		58	R	AAGATCGACGAGTTGTCGTTGC	RT-PCR
PePhT2	31	58	F	ATGATCTTCGCACGACTTGCTC	clonage pFL61
		58	R	ATGGACCCACAAACTAGCCAAG	clonage pFL61
PePhT3	31	58	F	ATGGCCATTCCCGGACCC	clonage pFL61
		58	R	TTACCCCAACCATAAGGTCCAG	clonage pFL61
PePhT4	31	58	F	ATGTCTTCGTCACTCTCCCT	clonage pFL61
		58	R	CTACTGCTCGACCGCTTCG	clonage pFL61

Gène	Nombre de Cycles pour la RT-PCR	Tm	Orientation	Séquence (5' →3')	Fonction de l'amorce
MnT-TM2ZN		58	F	ATCGTTTAGCATAATGGATGCCAGTAGCAAGCAAGGA	Mutagenèse dirigée
MnT-TM2ZN		58	R	GGCATCCATATGCTAAACGATAATGGCAGCAACGTCCTCCT	Mutagenèse dirigée
MnT-TM5ZN		58	F	GTCCCCGAAGACGTGCTCCCATAAACACCATGACCTGA	Mutagenèse dirigée
MnT-TM5ZN		58	R	GGAGCACGTCTTCGGGGACCTGTTTCATCAACGGCTTCGG	Mutagenèse dirigée
MnT-TM2MTM		58	F	ATCGCTTAGGCTATGGATGCCAGTAGCAAGCAAGGA	Mutagenèse dirigée
MnT-TM2MTM		58	R	GGCATCCATAGCCTAAGCGATAATGGCAGCAACGTCCTCCT	Mutagenèse dirigée
MnT-TM5MTM		58	F	GTCGCTCCGGTGGTGTCTCCCATAACACCATGACCTG	Mutagenèse dirigée
MnT-TM5MTM		58	R	GGGAGCACCCACCGGAGCGGACCTGTTTCATCAACGGCTTCGG	Mutagenèse dirigée
SP6		55	F	TATTTAGGTGACACTATAGAAAT	vecteur pGEMT
T7		55	R	GTAATACGACTCACTATAGGGC	vecteur pGEMT
L2		55	F	CAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTAC	vecteur pFL61
R2		55	R	GCGTAAAGGATGGGGAAAGAGAAAAG	vecteur pFL61

Annexe 2 : Protéines utilisées pour les études phylogénétiques. Les protéines sont regroupées par famille. L'organisme, le nom du gène ainsi que des informations sur ces derniers sont regroupées dans le tableau.

PH084	Organisme	Souche	gène/locus	ID protéine	Longueur	Brin	chromosome/scaffold	Début	Stop
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C	YML123C	pho84	587	Rev	Chromosome 13	24038	25801
	<i>Candida albicans</i>	sc5314 v21	orf19_655	orf19_655	545	Fow	Supercontig 1	2522427	2524064
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	972h-	SPBC8E4_01c	SPBC8E4_01c	572	Fow	Chromosome 2	4444252	4445970
SPBC1683_01			SPBC1683_01	573	Fow	Chromosome 2	134303	136024	
SPAC23D3_12			SPAC23D3_12	559	Fow	Chromosome 1	4362901	4364580	
SPCC2H8_02			SPCC2H8_02	583	Fow	Chromosome 3	828546	830297	
	<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	ANID_01612.1	ANID_01612.1	664	Rev	Contig 26	36716	34512
			ANID_00217.1	ANID_00217.1	384	Fow	Contig 5	199358	200946
	<i>Coccidioides immitis</i>	RS	CIMG_00339.3	CIMG_00339.3	587	Fow	Supercontig 3	2193434	2196418
	<i>Botrytis cinerea</i>	B05.10	BC1G_08663.1	BC1G_08663.1	586	Rev	Supercontig 51	239315	237398
			BC1G_04126.1	BC1G_04126.1	597	Rev	Supercontig 15	49011	46642
			BC1G_06625.1	BC1G_06625.1	632	Rev	Supercontig 33	27053	24667
	<i>Fusarium oxysporum</i>	4287 (FGSC 4286)	FOXG_03789.2	FOXG_03789.2	567	Rev	Supercontig 4	269454	267344
			FOXG_17519.2	FOXG_17519.2	571	Fow	Supercontig 52	36924	38861
			FOXG_09224.2	FOXG_09224.2	712	Rev	Supercontig 11	1007230	1004535
			FOXG_00090.2	FOXG_00090.2	681	Fow	Supercontig 1	286313	288706
			FOXG_16467.2	FOXG_16467.2	669	Rev	Supercontig 35	4230	1910
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	70-15	MGG_03299.6	MGG_03299.6	584	Rev	Supercontig 13	3202528	3200325
			MGG_01439.6	MGG_01439.6	783	Fow	Supercontig 27	3084830	3087630
			MGG_05722.6	MGG_05722.6	650		Supercontig 15	1153825	1156593
	<i>Neurospora crassa</i>	OR74A	NCU08325.4	NCU08325.4	570	Rev	Supercontig 4	2398793	2397018
	<i>Alternaria brassicicola</i>		AB08767.1	8767	623	Rev	Contig 11	336532	334378
			AB03732.1	3732	223	Fow	Contig 3	320059	320828
			AB08232.1	8232	680	Fow	Contig 9	1227477	1229911
	<i>Mycosphaerella graminicola</i>		estExt_igenesh1_pm.C_chr_110125	101590	581	Fow	Chromosome 11	862174	864087

Ustilago maydis	521	UM06490.1	UM06490.1	531	Rev	Contig 256	6248	4653
		UM00800.1	UM00800.1	723	Fow	Contig 25	14330	16501
Coprinus cinereus	Okayama 7#130	CC1G_03170.3	CC1G_03170.3	559	Rev	Chromosome 8	2455890	2453368
Laccaria bicolor	S238N H82	e_gww1.61.11.1	255397	515	Fow	Scaffold 61	65219	67605
		Eugenev2.0000610050	396315	542	Fow	Scaffold 61	142342	144839
		eu2.Lbsef0061g00610	314480	553	Fow	Scaffold 61	147763	150285
		eu2.Lbsef0011g04480	297291	544	Rev	Scaffold 11	1076805	1074620
		estExt_GeneWisePlus_worm.C_530015	191924	562	For	Scaffold 53	75134	77432
Pleurotus ostreatus	PC15	estExt_GeneWise1.C_80747	46383	547	Fow	Scaffold 8	1435240	1437626
		genemark.9208_g	161341	542	Fow	Scaffold 8	1438336	1440500
		estExt_GeneWise1Plus.C_30343	38236	540	Rev	Scaffold 3	107725	1075022
		fgenes1_pm.C_scaffold_5000634	51297	497	Fow	Scaffold 5	3348778	3351428
		genemark.2786_g	154921	548	Rev	Scaffold 3	956939	954367
		fgenes1_pm.C_scaffold_5000641	51304	505	Fow	Scaffold 5	3395242	3397921
Schizophyllum commune	H4-8	estExt_GeneWise1Plus.C_50921	68152	548	Rev	Scaffold 5	1910263	1908040
		estExt_GeneWise1.C_12495	72891	532	Fow	Scaffold 1	4151304	4153608
Phanerochaete chrysosporium	RP78	e_gwh2.4.612.1	128372	548	Rev	Scaffold 4	851897	849969
		e_gwh2.27.9.1	125289	576	Fow	Scaffold 27	67031	69110
		e_gww2.3.194.1	137755	547	Fow	Scaffold 3	2293742	2295977
		e_gww2.5.161.1	131308	555	Fow	Scaffold 5	2133765	2135853
Postia placenta	MAD-698	estExt_fgennes3_pg.C_870027	128124	550	Fow	Scaffold 87	183702	186219
		e_gw1.20.90.1	44327	614	Rev	Scaffold 20	354239	351851
		fgennes3_pg.20_54	91610	610	Fow	Scaffold 20	360982	363411
		estExt_GeneWise1.C_1070001	121375	533	Fow	Scaffold 107	4975	7864
Heterobasidion annosum	TC 32-1	estExt_fgennes2_pm.C_110008	157041	564	Fow	Scaffold 11	66645	69160
		estExt_GeneWise1.C_30113	33030	543	Fow	Scaffold 3	199580	202605
Cryptococcus neoformans	H99	CNAG_02777.2	CNAG_02777.2	553	Rev	Chromosome 3	787329	785007
Tremella mesenterica	DSM 1558	estExt_fgennes1M_pg.C_50332	73902	546	Fow	Scaffold 5	1110043	1113227
Puccinia graminis	CRL 75-36-700-3	PGTG_01917.2	PGTG_01917.2	539	Rev	Supercontig 2	2204889	2202192
		PGTG_04147.2	PGTG_04147.2	543	Rev	Supercontig 8	1307527	1304651

Melampsora laticis-populina	98AG31_300	gw1.40.17.1	24217	552	Rev	Scaffold 40	493668	490934
		esExt_Genewise1.C_130027	42986	547	Rev	Scaffold 13	302328	298931
Sporobolomyces roseus	IAM13481	esExt_Genewise1Plus.C_30353	21266	537	Rev	Scaffold 3	863655	881200
Rhizopus oryzae	RA.99-880	RO3G_01668.3	RO3G_01668.3	535	Fow	Supercontig 1	4320304	4321956
		RO3G_04857.3	RO3G_04857.3	519	Fow	Supercontig 3	1737475	1739125
		RO3G_00398.3	RO3G_00398.3	538	Rev	Supercontig 1	960071	978455
		RO3G_15988.3	RO3G_15988.3	546	Fow	Supercontig 18	293924	295564
Batrachomyces dendrobatidis	JAM81	esExt_Genewise1Plus.C_90017	20090	530	Fow	Scaffold 9	114577	116408
		e_gw1.7.117.1	12018	519	Fow	Scaffold 7	321122	322785
MnCDF								
Organisme	Souche	gène/locus	ID protéine	Longueur	Brin	chromosome/scaffold	Début	Stop
Saccharomyces cerevisiae	S288C							
Candida albicans	sc5314 v21	orf19.3874	orf19.3874	616	Fow	Supercontig 8	1326382	1326232
Schizosaccharomyces pombe	972h-							
Aspergillus nidulans	FGSC A4	ANID_05049.1	ANID_05049.1	527	Rev	Contig 84	610895	609149
		ANID_10155.1	ANID_10155.1	401	Rev	Contig 16	304949	303525
Coccidioides immitis	RS	CIMG_03183.3	CIMG_03183.3	483	Rev	Supercontig 6	672019	670026
		CIMG_09079.3	CIMG_09079.3	430	Rev	Supercontig 5	1911854	1909357
Botrytis cinerea	B05.10	BC1G_13811.1	BC1G_13811.1	395	Fow	Supercontig 129	41574	43118
		BC1G_00092.1	BC1G_00092.1	429	Rev	Supercontig 1	209098	210969
		BC1G_05581.1	BC1G_05581.1	434	Fow	Supercontig 26	246340	247892
Fusarium oxysporum	4287 (FGSC 4286)	FOXG_04250.2	FOXG_04250.2	454	Fow	Supercontig 4	1560141	1561503
		FOXG_10210.2	FOXG_10210.2	419	Fow	Supercontig 12	1766623	1767897
		FOXG_10209.2	FOXG_10209.2	305	Rev	Supercontig 12	1765056	1763616
		FOXG_08743.2	FOXG_08743.2	471	Fow	Supercontig 10	1690116	1691531
		FOXG_00229.2	FOXG_00229.2	588	Fow	Supercontig 1	752776	755097

Magnaporthe grisea	70-15	MGG_04407.6	MGG_04407.6	481	Fow	Supercontig 16	63537	65040
		MGG_04623.6	MGG_04623.6	526	Rev	Supercontig 16	442407	440342
		MGG_04968.6	MGG_04968.6	451	Fow	Supercontig 22	911155	913744
		MGG_07494.6	MGG_07494.6	492	Rev	Supercontig 20	843459	841981
Neurospora crassa	OR74A	NCU09368.3	NCU09368.3	544	Fow	Supercontig 1	3566627	3569405
		NCU05157.3	NCU05157.3	492	Fow	Supercontig 6	3543102	3544913
		NCU04818.3	NCU04818.3	441	Rev	Supercontig 6	932717	931004
		NCU06699.3	NCU06699.3	500	Rev	Supercontig 5	4324825	4322521
Alternaria brassicicola		AB05280.1	5280	474	Rev	Contig 4	1979005	1977490
		AB09137.1	9137	583	Fow	Contig 12	419770	421577
		AB09146.1	9146	466	Rev	Contig 12	440526	438926
		AB05487.1	5487	244	Fow	Contig 5		42138
Mycosphaerella graminicola		estExt_Genewise1Plus.C_chr_21662	68771	482	Rev	Chromosome 2	2638497	2636861
		estExt_Genewise1Plus.C_chr_100264	76143	466	Fow	Chromosome 10	434492	436433
		e_gw1.8.222.1	46865	486	Rev	Chromosome 8	242192	240596
Ustilago maydis	521	UM03814.1	UM03814.1	514	Fow	Contig 128	39832	41376
		UM05647.1	UM05647.1	801	Fow	Contig 206	44882	47287
Coprinus cinereus	Okayama 7#130	CC1G_00523.2	CC1G_00523.2	415	Rev	Chromosome 1	3140669	3136748
Laccaria bicolor	S238N H82	e_gww1.75.46.1	256277	384	Rev	Scaffold 75	190671	188894
		e_gww1.9.136.1	248983	384	Rev	Scaffold 9	324074	322297
		e_gww1.1.466.1	242531	355	Fow	Scaffold 1	1740927	1742847
		e_gww1.2.941.1	244654	389	Rev	Scaffold 2	1240504	1238725
Pleurotus ostreatus	PC15	estExt_Genewise1.C_60967	45728	381	Rev	Scaffold 6	1997414	1995619
		fgenes1_pn.C_Scaffold3000768	49838	380	Fow	Scaffold 3	3940354	3942275
Schizophyllum commune	H4-8	fgenes1_pn.C_scaffold_1001423	13884	364	Rev	Scaffold 1	6885345	6883628
Phanerochaete chrysosporium	RP78	e_gww2.13.213.1	135578	355	Fow	Scaffold 13	386347	388252
Postia placenta	IMAD-698	e_gw1.8.7.1	43314	369	Fow	Scaffold 8	341543	343464
		e_gw1.302.5.1	52763	328	Fow	Scaffold 302	34229	36142
Heterobasidium annosum	TC 32-1	fgenes2_pn.C_scaffold_1000163	121342	348	Fow	Scaffold 1	899538	902068

Cryptococcus neoformans	H99	CNAG_06317.2	CNAG_06317.2	569	Rev	Chromosome 13	177180	174905
		CNAG_04338.2	CNAG_04338.2	419	Rev	Chromosome 9	609019	607243
		CNAG_04337.2	CNAG_04337.2	319	Rev	Chromosome 9	606773	605058
Tremella mesenterica	DSM 1558	igeneshTM_pm.1_#_88	66707	390	Fow	Scaffold 1	753262	755627
		e_gw1.10.135.1	33448	494	Fow	Scaffold 10	561980	564924
Puccinia graminis	CRL 75-36-700-3	PGTG_19278.2	PGTG_19278.2	456	Fow	Supercontig 128	35399	37619
		PGTG_06375.2	PGTG_06375.2	456	Fow	Supercontig 14	1168363	1170570
		PGTG_19987.2	PGTG_19987.2	323	Rev	Supercontig 157	1465	1
Melampsora laticis-populina	98AG31_300	e_gw1.8.39.1	34394	380	Rev	Scaffold 8	1006740	1004934
		e_gw1.4.134.1	33368	251	Rev	Scaffold 4	1908433	1906367
Sporobolomyces roseus	IAM 13481	e_gw1.7.136.1	13951	301	Rev	Scaffold 7	1181682	1180176
		e_gw1.1.636.1	8916	375	Fow	Scaffold 1	624032	625754
Rhizopus oryzae	RA 99-880	RO3G_02153.3	RO3G_02153.3	324	Fow	Chromosome 1	5536558	5537589
		RO3G_02629.3	RO3G_02629.3	392	Fow	Chromosome 2	1048155	1049635
Batrachomyces dendrobatidis	JAM81	e_gw1.1.600.1	8761	361	Rev	Scaffold 1	3087643	3086295
ATX2								
Organisme	Souche	gène/locus	ID protéine	Longueur	Brin	chromosome/scaffold	Début	Stop
Saccharomyces cerevisiae	S288C	YOR079C	ScATX2	313	Rew	Chromosome 15	474418	473477
Candida albicans	sc5314 v21	orf19.5428	orf19.5428	270	For	Supercontig 3	55651	556463
Schizosaccharomyces pombe	972h-							
Aspergillus nidulans	FGSC A4	ANID_06216.1	ANID_06216	385	For	Contig 105	265658	267082
Coccidioides immitis	RS	CIMG_05400.3	CIMG_05400	401	Rev	Chromosome 2	6695142	6693168
Botrytis cinerea	B05.10	BC1G_02850.1	BC1G_02850	404	For	Supercontig 9	496261	497470
Fusarium oxysporum	4287 (FGSC 4286)	FOXG_09445.2	FOXG_09445	443	For	Supercontig 11	1709308	1711363

Magnaporthe grisea	70-15	MGG_06374.6	MGG_06374	422	Rev	Supercontig 13	1576070	1574562
Neurospora crassa	OR74A	NCU06473.4	NCU06473	429	For	Supercontig 3	1534380	1536027
Alternaria brassicicola		AB06373.1	AB06373.1	486	For	Contig 6	371411	372636
Mycosphaerella graminicola		estExt_fggenes1_pg.C_chr_30651	108762	402	For	Chromosome 3	2579066	2580462
Ustilago maydis	521	UM00803.1	UM00803	203	For	Contig 26	23	634
Coprinus cinereus	Okayama 7#130	CC1G_02991.2	CC1G_02991	321	For	Chromosome 8	1482493	1483890
Laccaria bicolor	S238N H82	eu2.Lbscf003907730	309134	306	Rev	Scaffold 3	2322830	2321642
Pleurotus ostreatus	PC15	fgenes1_pm.C_scaffold_7000322	52053	317	For	Scaffold 7	2136696	2137868
Schizophyllum commune	H4-8	fgenes1_pm.C_scaffold_3000294	14977	283	Rev	Scaffold 3	2396434	2395254
Panerochaete chrysosporium	RP78	fgenes1_pg.C_scaffold_8000366	5191	304	Rev	Scaffold 8	1195847	1194710
Positia placenta	MAD-698	fgenes3_pg.93_8	103053	325	Rev	Scaffold 9	44780	47031
Heterobasidion annosum	TC 32-1	fgenes2_pm.C_scaffold_7000174	125108	326	For	Scaffold 7	961986	963377
Cryptococcus neoformans	H99	CNAG_02221.2	CNAG_02221.2	355	For	Chromosome 6	874673	876000
Tremella mesenterica	DSM 1558	estExt_fggenesTM_pm.C_80011	71929	352	Rev	Scaffold 8	60224	58439
Puccinia graminis	CRL 75-36-700-3	PGTG_11997.2	PGTG_11997.2	444	For	Supercontig 37	162926	164517
Melampsora laticis-populina	98AG31_300	EuGene.00230074	87847	392	For	Scaffold 23	552418	550981
Sporobolomyces roseus	IAM 13481	No accession number	No ID	342	For	Scaffold 10	206097	207191
Rhizopus oryzae	RA 99-880	RO3G_10706.3	RO3G_10706.3	321	Rev	Supercontig 8	1327101	1326136
Batrachomyces dendrobatis	JAM81	gw1.1.714.1	3584	351	Rev	Scaffold 1	3708364	3706873

MTM1	Organisme	Souche	gène/locus	ID protéine	Longueur	Brin	chromosome/scaffold	Début	Stop
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C	YGR257C	YGR257C	366	Rev	Chromosome 7	1007311	1006211
	<i>Candida albicans</i>	sc5314 v21	orf19.417	orf19.417	349	Fow	Supercontig 1	1149184	1150233
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	972h-	SPBP23A10_06	SPBP23A10	335	Fow	Chromosome 2	2005968	2006975
	<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	ANID_06087.1	ANID_06087	466	Fow	Contig_104	154603	156516
	<i>Coccidioides immitis</i>	RS	CIMG_01046.3	CIMG_01046	485	Rev	Supercontig 1	5730224	5728097
	<i>Botrytis cinerea</i>	B05.10	BC1G_01725.1	BC1G_01725	451	Rev	Supercontig 5	147583	146168
	<i>Fusarium oxysporum</i>	4287 (FGSC 4286)	FOXG_05911.2	FOXG_05911	471	Fow	Supercontig 6	961279	953103
	<i>Magnaporthe grisea</i>	70-15	MGG_03631.6	MGG_03631	463	Fow	Supercontig 26	766552	768180
	<i>Neurospora crassa</i>	OR74A	NCU07478.4	NCU07478.4	488	Rev	Supercontig 1	493625	491457
	<i>Alternaria brassicicola</i>		AB02085.1	2085	424	Rev	Contig 1	2083585	2082191
	<i>Mycosphaerella graminicola</i>		estExt_GenewiserPlus.C_chr_110884	77145	420	For	Chromosome 11	1566923	1566392
	<i>Ustilago maydis</i>	521	UM00207.1	UM00207.1	574	Fow	Contig 2	500865	502589
	<i>Coprinus cinereus</i>	Okayama 7#130	CC1G_06755.2	CC1G_06755.2	335	Rev	Supercontig 1	1748426	1747266
	<i>Laccaria bicolor</i>	S238N H82	eu2.Lbsef001g01610	300712	336	Rev	Scaffold 1	337382	336121
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	PC15	fgenes1_pm.C_scaffold_3000373	49443	335	Rev	Scaffold 3	2307894	2308896
	<i>Schizophyllum commune</i>		e_gw1.1.2758.1	47483	349	Rev	Scaffold 1	5134215	5133008
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	RP78	e_gww2.11.296.1	134774	341	For	Scaffold 11	1248414	1249597
	<i>Postia placenta</i>	MAD-698	estExt_fggenes13_pg.C_1430038	127305	335	Rev	Scaffold 143	146057	144726

Heterobasidium annosum	TC 32-1	es:Ext_Genewise1Plus.C_11344	59309	344	Rev	Scaffold 1	2145063	2143863
Cryptococcus neoformans	H99	CNAG_05296.2	CNAG_05296.2	650	Fow	Chromosome 4	968292	970194
Tremella mesenterica	DSM 1558	fgenesTM_pg.1_#_1584	59594	495	Rev	Scaffold 1	5037088	5035249
Puccinia graminis	CRL 75-36-700-3	PGTG_01688.2	PGTG_01688.2	404	Fow	Supercontig 2	1348274	1349644
Melampsora laticis-populina	98AG31_300	fgenes1_pg.C_scaffold_6000125	60557	483	Rev	Scaffold 6	905247	903496
Sporobolomyces roseus	IAM 13481	fgenes1_pg.C_scaffold_2000422	25572	485	Rev	Scaffold 2	1620026	1618165
Rhizopus oryzae	RA 99-880	RO3G_12808.3	RO3G_12808.3	327	Fow	Supercontig 11	361128	352263
Bartrachomyces dendrobatidis	JAM81	fgenes1_pg.C_scaffold_1000740	21867	386	Rev	Scaffold 1	2150410	2148564
NRAMP								
Organisme	Souche	gène/locus	ID protéine	Longueur	Brin	chromosome/scaffold	Début	Stop
Saccharomyces cerevisiae	S288C	YOL122C	SMF1	575	Rev	Chromosome 15	91419	89692
		YHR050W	SMF2	549	Fow	Chromosome 8	207648	209297
		YLR034C	SMF3	473	Rev	Chromosome 10	211934	210513
Candida albicans	sc5314 v21	orf19.2270	orf19.2270	584	Fow	Supercontig 2	1460018	1461772
		orf19.4690	orf19.4690	577	Fow	Supercontig 4	195207	196940
		orf19.2069	orf19.2069	514	Rev	Supercontig 2	94103	92559
		orf19.5022	orf19.5022	651	Fow	Supercontig 1	3041570	3043585
Schizosaccharomyces pombe	972h-	SPAC27F1_08	SPAC27F1_08	521	Fow	Chromosome 1	4331339	4332904
Aspergillus nidulans	FGSC A4	ANID_05633.1	ANID_05633	566	Fow	Contig 98	85784	88309
Coccidioides immitis	RS	CIMG_01517.3	CIMG_01517	590	Fow	Supercontig 1	4466791	4468697
Botrytis cinerea	B05.10	BC1G_00651.1	BC1G_00651	570	Rev	Supercontig 2	313141	311237
Fusarium oxysporum	4287 (FGSC 4286)	FOXG_12012.2	FOXG_12012	403	Fow	Chromosome 13	380754	382797

	FOXG_04747.2	FOXG_04747.2	492	Rev	Chromosome 7	176758	174781
Magnaporthe grisea	70-15						
Neurospora crassa	OR74A	NCU07530.4	623	Fow	Supercontig 3	4485732	4487909
		NCU08489.4	555	Fow	Supercontig 2	3482688	3484524
Alternaria brassicicola							
Mycosphaerella graminicola		estExt_GeneWisePlus.C_chr_30731	589	Fow	Chromosome 3	1290876	1292695
Ustilago maydis	521	UM05420.1	668	Rev	Contig 192	287960	285854
Coprinus cinereus	Okayama 7#130	CC1G_00707.2	619	Fow	Chromosome 1	3653161	3655776
Laccaria bicolor	S238N H82	estExt_GeneWisePlus_worm.C_10257	506	Fow	Scaffold 1	2302672	2304930
Pleurotus ostreatus	PC15	tgenes3_pm.3 # 213	530	Rev	Scaffold 3	1689200	1687010
		e_gw1.3.2350.1	508	Rev	Scaffold 3	4445414	4443215
Schizophyllum commune	H4-8	estExt_GeneWisePlus.C_12825	548	Rev	Scaffold 1	4617146	4615097
Phanerochaete chrysosporium	RP78	e_gwh2.18.25.1	586	Rev	Scaffold 18	208906	206819
		e_gww2.11.188.1	462	Rev	Scaffold 11	317069	314771
Postia placenta	MAD-698	e_gw1.302.22.1	518	Fow	Scaffold 302	6714	8860
		e_gw1.8.63.1	569	Fow	Scaffold 8	313427	315578
Heterobasidion annosum	TC 32-1	e_gw1.1.396.1	504	Fow	Scaffold 1	2866742	2869016
		estExt_GeneWisePlus.C_10415	587	Fow	Scaffold 1	861485	863782
Cryptococcus neoformans	H99	CNAG_05640.2	638	Fow	Chromosome 14	834524	837140
Tremella mesenterica	DSM 1558	e_gw1.6.580.1	488	Fow	Scaffold 6	846628	848977
Puccinia graminis	CRL 75-36-700-3	PGTG_05644.2	578	Rev	Supercontig 11	1088955	1086593
		PGTG_18384.2	373	Fow	Supercontig 102	209071	211642
		PGTG_10404.2	380	Fow	Supercontig 31	792125	794704
		PGTG_18386.2	298	Rev	Supercontig 102	221728	220321
		PGTG_10406.2	302	Rev	Supercontig 31	807369	804554

Melampsora laticis-populina	98AG31_300	es:Et_fgenes1_kg.C_40015	70865	563	Rev	Scaffold 4	456251	453428
		EuGene.00190040	86561	588	Rev	Scaffold 19	319547	317177
		fgenes2_pg.35_82	109257	401	Rev	Scaffold 35	583246	581260
		fgenes2_pg.19_52	106676	315	Rev	Scaffold 19	500224	497815
Sporobolomyces roseus	IAM13481	gw1.4.315.1	3112	432	Rev	Scaffold 4	724380	721679
Rhizopus oryzae	RA99-880	RO3G_04616.3	RO3G_04616	405	Rev	Supercontig 3	1084377	1082511
		RO3G_06548.3	RO3G_06548	414	Rev	Supercontig 4	2830957	2829124
		RO3G_07151.3	RO3G_07151	72	Fow	Supercontig 5	1074096	1076005
		RO3G_04647.3	RO3G_04647	147	Fow	Supercontig 3	1175697	1177379
Batrachomyces dendrobatis	JAM81	fgenes1_pm.C_scaffold_1000014	29076	489	Fow	Scaffold 1	188175	190470
CCC1								
Organisme	Souche	gène/locus	ID protéine	Longueur	Brin	chromosome/scaffold	Début	Stop
Saccharomyces cerevisiae	S288C	YLR220W	CCC1	322	Fow	Chromosome 12	576827	577795
Candida albicans	sc5314 v21	orf19.6948	orf19.6948	312	Fow	Supercontig 3	762745	763683
Schizosaccharomyces pombe	972h-	SPBC1683_10c	SPBC1683_10c	242	Rev	Chromosome 2	165158	164430
Aspergillus nidulans	FGSC A4	ANID_03681.1	ANID_03681.1	308	Fow	Contig 61	425955	427012
		ANID_04990.1	ANID_04990.1	298	Fow	Contig 84	413152	414082
Coccidioides immitis	RS	CIMG_07032.3	CIMG_07032.3	303	Rev	Supercontig 2	4130281	4128700
Botrytis cinerea	B05.10	BC1G_14756.1	BC1G_14756.1	314	Fow	Supercontig 147	75018	76097
Fusarium oxysporum	4287 (FGSC 4286)	FOXG_04047.2	FOXG_04047.2	273	Fow	Supercontig 4	964302	965499
		FOXG_06994.2	FOXG_06994.2	235	Rev	Supercontig 9	280894	280029
		FOXG_16877.2	FOXG_16877.2	275	Rev	Supercontig 39	209573	208746
Magnaporthe grisea	70-15	MGG_00993.6	MGG_00993.6	337	Rev	Supercontig 21	594146	595246
Neurospora crassa	OR74A	NCU11307.4	NCU11307.4	307	Fow	Supercontig 7	129399	130597

Batrachochytrium dendrobatidis	JAM81	gw1.1.1020.1	5214	283	Fow	Scaffold 1	4067150	4068814
		est:xt_fgeneh1_pg.C_11348	34308	322	Fow	Scaffold 1	4069740	4071939
PMR1								
Organisme	Souche	gène/locus	ID protéine	Longueur	Brin	chromosome/scaffold	Début	Stop
Saccharomyces cerevisiae	S288C	YGL167C	PMR1	950	Rev	Chromosome 7	187622	190474
Candida albicans	sc5314 v21	orf19.7089	orf19.7089	917	Rev	Supercontig 7	51214	48461
Schizosaccharomyces pombe	972h-	SPBC31E1_02c	SPBC31E1.02c	899	Rev	Chromosome 2	243069	240370
Aspergillus nidulans	FGSC A4	ANID_07464.1	ANID_07464.1	1062	Rev	Contig 129	130738	127439
Coccidioides immitis	RS	CIMG_01003.3	CIMG_01003.3	1073	Fow	Supercontig 1	5644569	5848395
Botrytis cinerea	B05.10	BC1G_02758.1	BC1G_02758.1	1017	Fow	Supercontig 9	276327	279482
Fusarium oxysporum	4287 (FGSC 4286)	FOXG_00549.2	FOXG_00549.2	1069	Fow	Supercontig 1	1754674	1758060
Magnaporthe grisea	70-15	MGG_11727.6	MGG_11727.6	1073	Rev	Supercontig 18	278958	275660
Neurospora crassa	OR74A	NCU03292.4	NCU03292.4	1025	Fow	Supercontig 1	5201681	5205097
Alternaria brassicicola		AB08417.1	8417	1039	Fow	Contig 10	534897	538200
Mycosphaerella graminicola		est:xt_fgeneh1_pm.C_chr_60198	100515	1040	Fow	Chromosome 6	1433699	1437007
Ustilago maydis	521	UM04461.1	UM04461.1	1050	Fow	Contig 157	224926	228078
Coprinus cinereus	Okayama 7#130	CC1G_06823.2	CC1G_06823.2	1054	Fow	Supercontig 3	2283287	2287191
Laccaria bicolor	S238N H82	est:xt_GeneWisePlus_worm.C_730009	192284	1053	Rev	Scaffold 73	82652	78759
Pleurotus ostreatus	PC15	est:xt_fgeneh1_pm.C_50044	61598	1108	Fow	Scaffold 5	334020	337877
Schizophyllum commune		est:xt_GeneWise1.C_40005	75697	1094	Rev	Scaffold 4	56510	53693
Panerochaete chrysosporium	RP78	e_gwh2.4.43.1	128266	1073	Rev	Scaffold 4	1026742	1022914

<i>Postia placenta</i>	IMAD-698	fgenes3_pm.51_3 e_gw1.7.140.1	88718 53578	1091 1084	Rev Fow	Scaffold 51 Scaffold 7	145177 676406	141209 680418
<i>Heterobasidium annosum</i>	TC 32-1	estExt_Genewise1.C_140595	39936	1079	Rev	Scaffold 14	1171533	1167580
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H99	CNAG_05135.2		1117	Rev	Chromosome 4	519102	515400
<i>Tremella mesenterica</i>	DSM 1558	estExt_Genewise1Plus.C_30322	43224	1076	Rev	Scaffold 3	638337	634216
<i>Puccinia graminis</i>	CRL 75-36-700-3	PGTG_04266.2	PGTG_04266.2	1012	Rev	Supercontig 9	144066	140317
<i>Melampsora laticis-populina</i>	98AG31_300	gw1.8.5.1	22745	997	Fow	Scaffold 8	971050	974322
<i>Sporobolomyces roseus</i>	IAM 13481	estExt_Genewise1Plus.C_20652	20878	1005	Fow	Scaffold 2	1876832	1880865
<i>Rhizopus oryzae</i>	RA 99-880	RO3G_04701.3	RO3G_04701.3	909	Fow	Supercontig 3	1319562	1322809
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	JAM81	estExt_Genewise1Plus.C_10167	18216	969	Rev	Scaffold 1	455374	451276

PUBLICATIONS

Loth-Pereda V, Orsini E, Courty P-E, Lota F, Kohler A, **Diss L**, Blaudez D, Chalot M, Nehls U, Bucher M, Martin F. Structure and expression profile of the phosphate Pht1 transporter gene family in mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant physiol.* 2011.

Diss L, Blaudez D, Gelhaye E, Chalot M. Genome-wide analysis of fungal manganese transporters, with an emphasis on *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Microbiology reports*. 2011.

Kastner PE, Le Calvé S, **Diss L**, Sauveplane V, Franke R, Schreiber L, Pinot F. Specific accumulation of CYP94A1 transcripts after exposure to gaseous benzaldehyde: Induction of lauric acid ω -hydroxylase activity in *Vicia sativa* exposed to atmospheric pollutants. *Environmental Research*. 2010.

Kandel S, Sauveplane V, Olry A, **Diss L**, Benveniste I, Pinot F. Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2006.

La publication Genome-wide analysis of fungal manganese transporters, with an emphasis on *Phanerochaete chrysosporium* à été incorporé à la suite de ce manuscrit.

Genome-wide analysis of fungal manganese transporters, with an emphasis on *Phanerochaete chrysosporium*

Loïc Diss, Damien Blaudez, Eric Gelhaye and Michel Chalot*

UMR INRA/UHP 1136 'Tree-microbe Interactions', Faculty of Sciences and Technology, Nancy-University, BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Summary

Genome-wide analysis of fungal manganese transporters was undertaken, making use of whole genome sequences available in fungal databases. A repertoire of 281 putative manganese transporters was found in total across 26 fungal species representing 20 fungal orders. The process of gene duplication was apparently accompanied by gene loss events, and this resulted in a great variety of manganese transporters that can be observed in the genome of modern fungi. Eleven transporters belonging to gene families in which manganese transporters have been found were identified in the *Phanerochaete chrysosporium* genome. This whole set of transporters may cover the need of *P. chrysosporium* cells for manganese loading in and unloading out of the cytosol, thereby insuring manganese homeostasis. The tight control of intracellular Mn²⁺ ion concentration is for instance of crucial importance for the control of lignin-degradative systems by saprotrophic fungi, and thereof the carbon cycle in forest ecosystems.

Introduction

Manganese is an essential trace element that is required by organisms across every kingdom of life (Reddi *et al.*, 2009), but it can be toxic at high concentrations. Mn²⁺ homeostasis is therefore crucial for all eukaryotes. The mechanisms of Mn²⁺ transport and homeostasis are well understood in a few models of microorganisms. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Mn²⁺ transport pathways have been reviewed (Luk *et al.*, 2003a; Pittman, 2005; Reddi *et al.*, 2009). Currently identified Mn²⁺ transport pathways are: SMF1, a plasma membrane, and

SMF2, an intracellular vesicle Mn²⁺ transporters of the natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family; PHO84, a plasma membrane phosphate transporter that can transport Mn²⁺ under excess conditions; PMR1, a Golgi Ca²⁺- and Mn²⁺-transporting of the P-type ATPase family; CCC1, a Mn²⁺ and Fe²⁺ vacuolar transporter (Lapinskas *et al.*, 1996) from the Vacuolar Iron Transporter (VIT) Family; MTM1, the mitochondrial inner membrane protein member of the mitochondrial carrier (MC) family, which delivers Mn²⁺ to the mitochondrial superoxide dismutase SOD2; and ATX2, a member of the zinc-iron permease (ZIP) family that localizes to the membrane of a vesicular compartment in yeast (Lin and Culotta, 1996). In addition, Mn²⁺ transport in other eukaryotes has been ascribed to metal transporters of the cation diffusion facilitator (CDF) family (Blaudez *et al.*, 2003; Pittman, 2005).

Mn²⁺ is an effector for a diverse range of redox and non-redox functions, and is therefore essential for many physiological processes, notably for the degradation of lignin. Lignin-degrading basidiomycetes, collectively referred to as white rot fungi, are common inhabitants of forest litter and dead trees. These are the only microbes that have been convincingly shown to efficiently depolymerize, degrade and mineralize all components of plant cell walls, including cellulose, hemicellulose and the more recalcitrant lignin. Manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) have been the most intensively studied extracellular enzymes of *P. chrysosporium*, and several reviews summarize their biochemistry (Kersten and Cullen, 2007). Mn²⁺ has been proven to have a key regulatory role in the production of lignin-degrading peroxidases and laccase (Scheel *et al.*, 2000; Schlosser and Höfer, 2002; Singh and Chen, 2008). Moreover, studies with ligninolytic fungi, such as *Phanerochaete chrysosporium* (Brown *et al.*, 1990), *Dichotomus squalens* (Perie and Gold, 1991), *Trametes versicolor* (Johansson *et al.*, 2002), *Ceriporiopsis subvermispora* (Mancilla *et al.*, 2010) and *Pleurotus ostreatus* (Cohen *et al.*, 2001), have demonstrated that there is a correlation between transcript levels and Mn peroxidase (MnP) production. This suggests a transcriptional role for Mn²⁺, which would likely imply a putative transcription factor that has not yet been identified.

Received 9 July, 2010; accepted 29 November, 2010. *For correspondence. E-mail michel.chalot@scbiol.uhp-nancy.fr; Tel. (+33) 3 83684238; Fax (+33) 3 83684292.

© 2011 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd

Except for the yeast model *S. cerevisiae*, only few Mn²⁺ transporter proteins from fungal species have been functionally characterized. Trying to fill this gap, we analysed a representative set of genomes for their content and distribution of Mn²⁺ transporter proteins belonging to the seven transporter families described above (MFS, NRAMP, ZIP, MC, CDF, VIT and P-ATPase). We performed this phylogenetic analysis of the protein extracted from the genomes of 26 fungal species from 20 orders representing four fungal phyla thereby covering the most important groups. In addition, we performed expression and functional analysis on selected genes from the saprophytic fungus *P. chrysosporium*.

Results and discussion

A set of 26 fungal species representing major evolutionary lineages within fungal kingdom (James *et al.*, 2006) was used in order to obtain a representative set that covers the diversity of modern fungi as much as possible. This study includes major model organisms (*S. cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe*) and a number of basidiomycetes, including the white rot fungus *P. chrysosporium* (Table S1). The transporter proteins from the selected genomes were identified by multiple BLAST searches against the selected genome sequences. All BLAST hits with the *E*-value below 10⁻⁴ were taken into subsequent analysis. In total, we analysed 281 predicted open reading frames (ORFs) encoding transporter proteins from seven metal transporter families, in which Mn²⁺ transporters have been identified (Table 1). Evolutionary relationships within each transporter family were examined using phylogenetic trees that allow classification in different clusters. In the next sections, the results of our analysis are discussed for each transporter family, with reference to the *S. cerevisiae* protein, except for the Mn-CDF family. Further functional and expression data are provided for genes from *P. chrysosporium*. Transporters are grouped into (i) proteins that allow Mn²⁺ entry into the cytosol, including those responsible for extrusion from internal compartments, and (ii) proteins that allow Mn²⁺ extrusion from the cytosol.

Mn²⁺ loading into the cytosol

PHO84 homologues from the Mn²⁺ transporter from the Major Facilitator Superfamily (MFS, TC# 2.A.1). The PHO84 protein belongs to a family of phosphate/proton symporters and is a member of the MFS. Its ability to function in Mn²⁺ homeostasis was demonstrated in *S. cerevisiae* (Jensen *et al.*, 2003). PHO84 appears to be the major transporter implicated in the uptake of Mn²⁺ under high concentrations of external Mn²⁺ and does not seem to be regulated by external Mn²⁺ but rather by a

phosphate signal transduction pathway (Fristedt *et al.*, 1999).

Genes encoding PHO84-like transporters are abundantly distributed among the fungal genomes and have undergone an extensive amplification, which is especially remarkable in members of the agaricomycetes (six genes in *P. ostreatus*) and sordariomycetes (five genes in *F. oxysporum*) (Table 1, Fig. 1). Two genes are present in the genome of the chytridiomycete *Batrachochytrium dendrobatidis*, while there is a single corresponding gene in the genomes of saccharomycetes, tremelomycetes, *Coccidioides immitis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Neurospora crassa* and *Sporobolomyces roseus*. Both the highest and lowest number of PHO84-like transporters is observed in genomes of agaricomycetes. Phylogenetic analysis of the 64 PHO84-like transporters separates them in three clusters. Cluster I consists of PHO84 members from all analysed classes except for ustilagomycetes, schizosaccharomycetes and chytridiomycetes (Fig. 1). Members of cluster II were found mainly in the classes agaricomycete, mucoromycete, as well as in the ustilagomycetes, schizosaccharomycetes and chytridiomycetes. They contain up to four members within this subgroup. The next group of PHO84-like transporters (cluster III) is limited in its distribution to species of the subphylum pezizomycotina that are not found in cluster II. They contain one or two members within this subgroup. The observed distribution indicates that a loss of PHO84 genes occurred several times independently in the different fungal lineages.

We isolated and cloned a PHO84-like transporter from *P. chrysosporium* in a pFL61 vector, and named it PcPHO84 (accession number 128372) by homology (45% of identity with ScPHO84) with the yeast protein. We expressed PcPHO84 in the *pho84Δ* mutant strain, which exhibits a much higher tolerance to high Mn²⁺, as compared with the wild-type (Fig. 2A and B), due to its restricted ability to take up Mn-P complexes (Fristedt *et al.*, 1999). Expression of the *P. chrysosporium* PHO84 protein in the *pho84Δ* mutant strain induced a restricted growth on 45 mM Mn²⁺, similar to the wild-type strain (Fig. 2A and B). Noticeably, the *pho84Δ* mutant strain also exhibits a restricted growth phenotype on low (50 μM) inorganic phosphate (Pi) (Wykoff and O'Shea, 2001), and was fully complemented by PcPHO84 (Fig. 2A and C). We constructed a *PcPHO84:GFP* fusion protein to determine the localization of PcPHO84 more precisely. When expressed in yeast cells grown on low Pi (100 μM) medium, the GFP fluorescence was found mostly at the periphery of the cell, and in some sparse intracellular vesicles (Fig. 3A and B). When transferred on high Pi (1 mM) containing-medium, the GFP was mostly located on intracellular vesicles, probably due to the internalization of the protein for further degradation (not shown). We found two ESTs in database corresponding to this transporter gene. The expression of *PcPHO84*

Table 1. Evolution of the fungal metal transporters belonging to the CDF, MC, MFS, NRAMP, P-ATPase, VIT and ZIP families.

Phylum	Class	Order	Species	References	MFS (PHO84)	NRAMP (SIMF)	ZIP (ATX2)	MC (MTM1)	CDF	VIT (OCC1)	P-ATPase (PMF1)	Total
Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Goffeau et al. (1996)	1	3	1	1	0	1	1	8
			<i>Candida albicans</i>	Jones et al. (2004)	1	4	1	1	0	1	1	10
			<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Wood et al. (2002)	4	1	0	1	0	2	1	10
			<i>Spiegelia indiana</i>	Galagan et al. (2005)	2	1	1	1	1	2	1	8
			<i>Coccidioides immitis</i>	Sharpton et al. (2009)	1	1	1	1	1	2	1	11
			<i>Burysia cinerea</i>		3	1	1	1	1	3	1	11
			<i>Fusarium oxysporum</i>		5	2	1	1	1	5	3	18
			<i>Magnaporthe grisea</i>		3	0	1	1	1	4	1	11
			<i>Neurospora crassa</i>		1	2	1	1	1	4	1	11
			<i>Alternaria brassicicola</i>		3	0	1	1	1	4	0	10
Ustilaginomycotina	Ustilaginomycetes	Ustilaginetales	<i>Mycophtherella graminicola</i>	Dean et al. (2005)	1	0	1	1	3	1	1	9
			<i>Ustilago maydis</i>	Galagan et al. (2003)	1	1	1	1	3	1	1	9
			<i>Capriinus cinereus</i>	Kämpfer et al. (2006)	2	1	1	1	2	1	1	9
			<i>Laccaria bicolor</i>	Martin et al. (2008)	1	1	1	1	1	1	1	7
			<i>Pleurotus ostreatus</i>		5	1	1	1	1	4	1	14
			<i>Schizophyllum commune</i>		6	2	1	1	1	2	1	14
			<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ohm et al. (2010)	2	1	1	1	1	1	1	8
				Martinez et al. (2004)	4	2	1	1	1	1	1	11
				Wymelenberg et al. (2006)	4	2	1	1	1	1	1	11
				Martinez et al. (2009)	4	2	1	1	1	2	2	14
Pucciniomycotina	Pucciniomycetes	Pucciniales	<i>Heterobasidium annosum</i>	Martinez et al. (2009)	2	2	1	1	2	2	2	14
			<i>Cryptococcus neoformans</i>		1	1	1	1	1	1	1	9
			<i>Tremella mesenterica</i>	Loftus et al. (2005)	1	1	1	1	3	1	1	9
			<i>Puccinia graminis</i>		2	5	1	1	2	1	1	8
			<i>Melampsora larici-populina</i>		2	4	1	1	3	5	1	18
			<i>Sporobolomyces roseus</i>		1	1	1	1	2	2	1	13
			<i>Rhizopus oryzae</i>		1	1	1	1	2	1	1	8
			<i>Batrachium dendrobatidis</i>	Ma et al. (2009)	4	4	1	2	2	2	2	16
Chytridiomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	Total		64	45	25	27	57	36	27	281

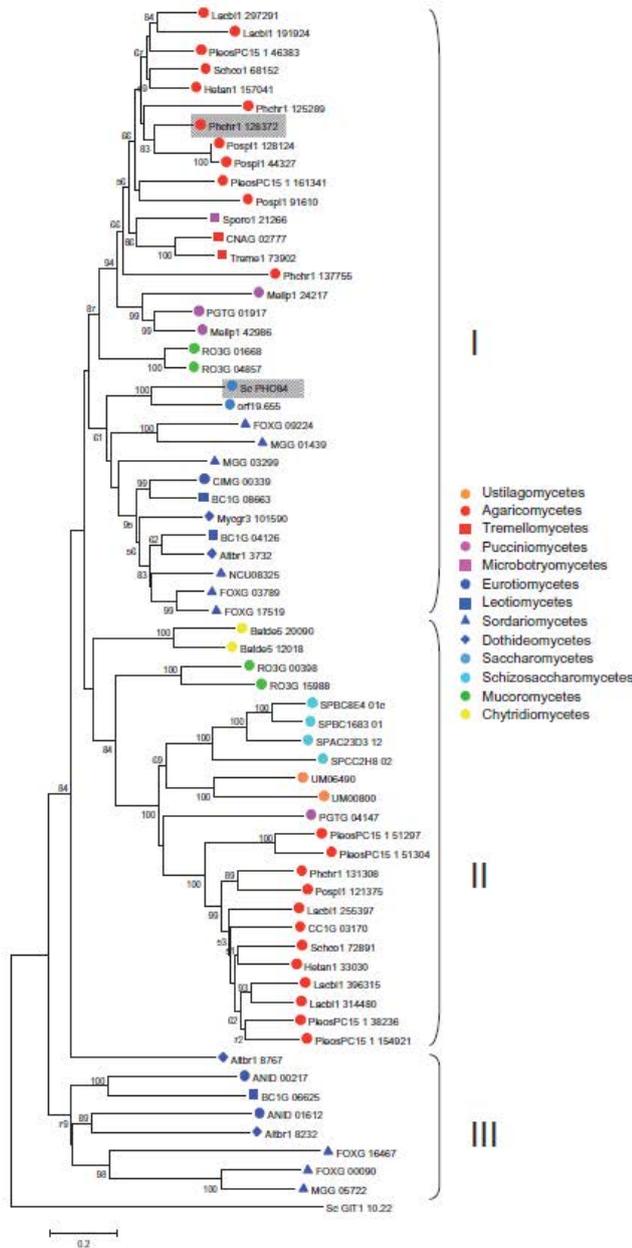


Fig. 1. Phylogenetic tree of fungal PHO84-like proteins. Predicted amino acid sequences of analysed proteins were aligned by clustalW and imported into the MEGA 4.1 software package to generate a phylogenetic tree using the neighbour-joining method. Numbers next to the branching points indicate the relative support from 1000 replicates. Corresponding gene loci are given in Table S1 together with the full names of the fungal species used in the study. The scale at the bottom indicates genetic distance proportional to the amino acid substitutions per site. Grey shading indicates that the gene has been functionally characterized. The MFS GIT1 from *S. cerevisiae* was employed as an outgroup.

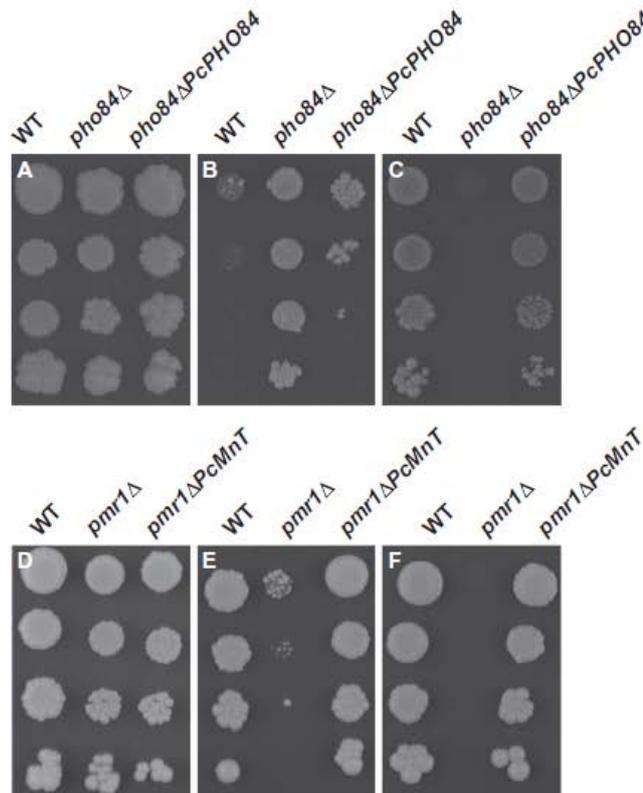


Fig. 2. Functional characterization of PcPHO84 and PcMnT. Plates were inoculated with the wild-type *S. cerevisiae* strain BY4741 (WT) or with mutant strains transformed with pFL61 alone or with pFL61 harbouring *P. chrysosporium* cDNAs. The mutant yeast strains used were *pho84Δ* (A, B and C) or *pmr1Δ* (D, E and F), transformed with PcPHO84 (A, B and C) or PcMnT (D, E and F) respectively. Selective media were as followed: (B) 45 mM Mn²⁺; (C) 50 μM Pi; (E) 2 mM Mn²⁺; (F) 5 mM Mn²⁺. Plates were incubated at 30°C for 3 days. A representative plate (from three to four) is shown and the experiments were carried out at least twice with similar results.

was measured after transfer of *P. chrysosporium* fungal colonies on Mn-depleted or Mn-supplemented medium (Fig. 4). Although some statistically significant variations in transcript levels were observed during the course of the experiment (independently of the treatment), only the 6 h and 3 days samples showed some statistically significant between treatments, with a decrease on Mn-supplemented growth medium, as compared with a Mn-depleted growth medium. Taken together, these data indicate that PcPHO84 has a similar function to the yeast PHO84 protein, being involved in Mn²⁺ homeostasis. The function of the three other PcPHO84 proteins was not investigated. However, in *Laccaria bicolor* that we have investigated for phosphate transporter and that displayed several PHO84-like proteins, only one protein was able to transport both Pi and Mn (L. Diss, unpubl. data).

SMF1 homologues from the Metal Ion (Mn²⁺-Fe²⁺) Transporter Family (NRAMP; TC# 2.A.55). The NRAMP family constitutes a class of metal-ion transporters that

are widely conserved from bacteria to humans (Cellier *et al.*, 1995; Portnoy *et al.*, 2000). NRAMP transporters drive the translocation of a wide range of divalent metal substrates across membranes towards the cytosol by coupling the flow of protons and metals. In *S. cerevisiae*, The SMF1p and SMF2p transporters are largely responsible for the uptake of essential Mn²⁺ that is needed to activate Mn-containing enzymes and for protection against oxidative stress. SMF1 operates at the cell surface in the uptake of manganese and SMF2 resides on membranes of intracellular Golgi-like vesicles, being involved in the extrusion of Mn²⁺ out of the vesicles (Au *et al.*, 2009; Reddi *et al.*, 2009).

Homologues of the *S. cerevisiae* SMFs were found in the genomes of most of the analysed species, with the exception of the magnaporthale *Magnaporthe grisea* and the pleosporale *Alternaria brassicicola* (Table 1, Fig. S1). The lack of SMF-related proteins in the genome of fungi belonging to the magnaporthale order was confirmed by a search analysis (<http://www.broadinstitute.org/annotation/>

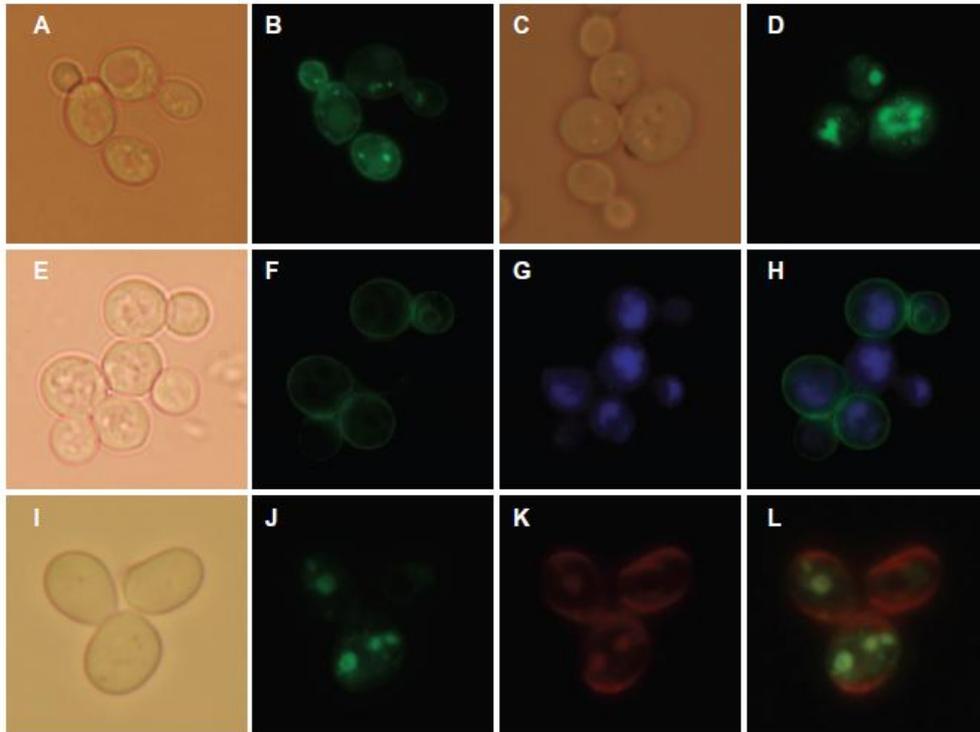


Fig. 3. Membrane localization of *P. chrysosporium* Mn transporter genes. Chimeric fusion proteins were expressed in yeast and viewed by epifluorescence microscopy. The *P. chrysosporium* genes were PcPHO84 in a low (100 μ M) Pi medium (A and B); PcATX2 (C and D); PcMnT (E, F, G and H) and PcCCC1 (I, J, K and L) fused to the GFP. Different images from the same cells are shown: bright field (A, C, E and I), GFP fluorescence (B, D, F and J), FM4-64 (K) and CMAC (G) stained cells, as well as GFP/CMAC-Arg (H) and GFP/FM4-64 (L) merged images.

genome/magnaporthe_comparative/MultiHome.html) in the *M. grisea* related species *M. poae* and *Gaeumannomyces graminis*. The genome of the other pleosporale species *Stagonospora nodorum* (<http://genome.jgi-psf.org/Stano1/Stano1.home.html>) does not possess SMF-related genes whereas the pleosporale species *Cochliobolus heterostrophus* (<http://genome.jgi-psf.org/CocheC5-1/CocheC5-1.home.html>) and *Pyrenophora tritici-repentis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/pyrenophora_tritici_repentis.3/Info.html) genomes possess a single SMF copy. These data indicate that gene loss may affect a whole lineage (magnaporthale) or single species within lineage (pleosporale).

When present, the copy number of SMF-related genes in different fungi varies between one and five per genome, so it cannot be excluded that the paralogous proteins fulfil alternative functions. Four SMF genes are clustered on two supercontigs (# 102 and 31) in *P.*

graminis, suggesting that tandem duplication could be one of the important mechanisms for the asymmetric expansion of the NRAMP family during fungal species formation.

The presence of a single SMF representative in a given species raised the question of its specificity towards the substrate, because *S. cerevisiae* SMF1 and SMF2 transport Fe^{2+} and Mn^{2+} , whereas *S. cerevisiae* SMF3 transports exclusively Fe^{2+} (Portnoy *et al.*, 2000). The single SMF member of *S. pombe* is involved in Mn^{2+} homeostasis (Maeda *et al.*, 2004), and we may therefore hypothesize that other SMF homologues present as single copy in other fungal genomes may also be related to Mn^{2+} homeostasis, as a primary function. We were not able to clone the full-length SMF homologues from *P. chrysosporium* but PcSMFs represent potential candidates for loading of Mn^{2+} ions into the cytosolic compartment in *P. chrysosporium*.

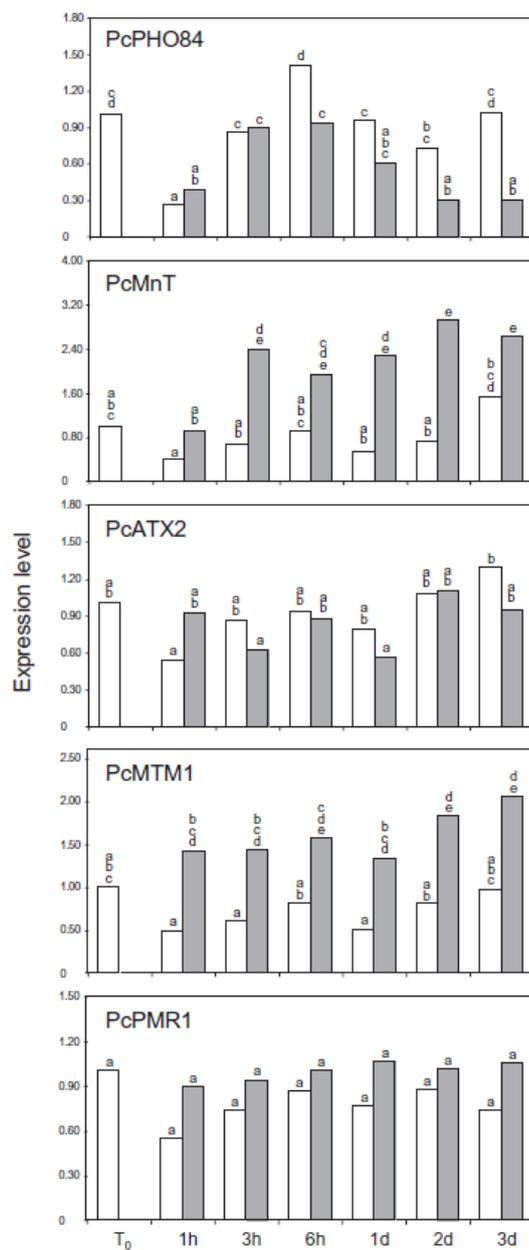


Fig. 4. Expression levels of *P. chrysosporium* genes after Mn²⁺ exposure. Fungal colonies were grown on Tien- and Kirk-based medium without Mn²⁺ for 4 days (T₀) and supplemented with MnCl₂ (grey bar) or KCl in control (white bar) medium, expression of Mn-transporters was analysed for various lengths of time. Transcript levels were estimated by RT-PCR and normalized using the expression levels of actin. Values are expressed as means of three replicate experiments. Values with the same letter are not significantly different, according to a one-way analysis of variance (ANOVA) at P < 0.05.

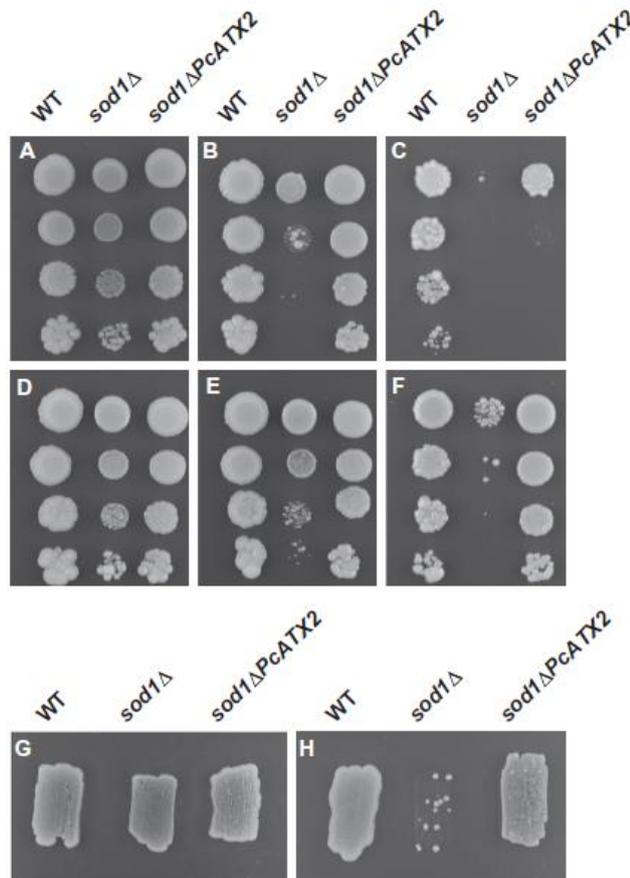


Fig. 5. Functional characterization of PcATX2. Plates were inoculated with the wild-type *S. cerevisiae* strain BY4741 (WT) or with the *sod1Δ* mutant strain transformed with pFL61 alone (*sod1Δ*) or with pFL61 containing PcATX2 (*sod1ΔPcATX2*). Selective media were as followed: (B and E) 100 µM paraquat; (C and F) 600 µM paraquat. A and D panels represent control media. When needed, Mn^{2+} was added at 1 mM (D, E and F). The lysine auxotrophy was tested on minimum medium supplemented with 20 mg l^{-1} lysine (G) or without lysine (H). Plates were incubated at 30°C for 3 days. A representative plate (from three to four) is shown and the experiments were carried out at least twice with similar results.

ATX2 homologues from the Zinc (Zn^{2+})–Iron (Fe^{2+}) Permease Family (ZIP; TC# 2.A.5). ZIP transporters are found in all kingdoms of life (Guerinot, 2000; Gaither and Eide, 2001). The *S. cerevisiae* ZIP member ATX2 localizes to the membrane of a vesicular compartment in yeast cells reminiscent of the Golgi apparatus. It was demonstrated that this vesicle protein normally functions in the homeostasis of Mn^{2+} (Lin and Culotta, 1996).

Our analysis revealed a remarkable even distribution of ATX2-like proteins among fungi (Table 1). Mn-ZIP transporters were found in the genomes of every analysed species as a single copy, including the iconic member ATX2 from *S. cerevisiae* (Fig. S2). A remarkable exception is *S. pombe*, which has no ATX2 member. We found out that other *Schizosaccharomyces* species such as *S. octopus*, *S. cryophilus* and *S. japonicus* also lack this

ATX2 member (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/MultiHome.html), indicating that this gene loss concerns the whole schizosaccharomycete class. The ATX2 homologue from *P. chrysosporium*, named PcATX2 (20% of identity with yeast ATX2), was isolated and cloned in a pFL61 vector and used to transform the *sod1Δ* mutant, which shows a restricted growth on a paraquat enriched medium. Overproduction of PcATX2 fully restored growth of the *sod1Δ* mutant at 100 µM paraquat, and partially at 600 µM (Fig. 5B and C), as found for ScATX2 overexpression (Lin and Culotta, 1996). It was shown that Mn^{2+} has an antioxidant effect in yeast *sod1Δ* cells, related to its rapid quenching capacity of peroxy radicals (Coassin *et al.*, 1992). A concentration of 1 mM Mn^{2+} partially restored growth of the *sod1Δ* mutant on 100 and 600 µM paraquat

(with empty vector) (Fig. 5E and F) as compared with growth on normal medium (Fig. 5B and C), confirming the protective effect of Mn^{2+} against reactive oxygen species (Coassin *et al.*, 1992). Overexpression of PcATX2 totally restored growth of the mutant strain on these Mn^{2+} -supplemented media (Fig. 5E and F). Additionally, yeast *sod1Δ* mutants are auxotrophic for lysine when grown aerobically and overexpression of ScATX2 fully suppressed this deficiency (Lin and Culotta, 1996). We demonstrated that PcATX2 overexpression under lysine deficiency also restored growth of the *sod1Δ* mutant (Fig. 5G and H). We expressed a PcATX2:GFP fusion protein to determine the membrane localization of PcATX2. PcATX2:GFP fluorescence was found in small vesicles (Fig. 3C and D), a punctuate pattern similar to that observed for ScATX2 (Lin and Culotta, 1996). Expression levels of PcATX2 were not correlated with the Mn^{2+} status of the medium (Fig. 4).

Our data underline the broad distribution of ATX2 homologues within the fungal species, and thereby indicate an important role of this protein in Mn^{2+} homeostasis. To our knowledge, ATX2 homologues have not yet been functionally characterized in fungi other than in *S. cerevisiae*. PcATX2 may serve as one of the intracellular thermostats that regulate the balance between cytosolic and extracytosolic pools of Mn^{2+} .

Mn²⁺ unloading from the cytosol

MTM1 homologues from the Mitochondrial Carrier Family (MC; TC# 2.A.29). Permeases of the MC family are found exclusively in eukaryotic organelles although they are nuclearly encoded. Most are found in mitochondria, but some are found in peroxisomes of animals, in hydrogenosomes of anaerobic fungi, and in amyloplasts of plants (Saier, 2000; 2009). MTM1 represents a yeast member of the MC family and localizes to the mitochondria. It was isolated as a potential Mn^{2+} trafficking protein that does not function simply as a general Mn^{2+} transporter for the mitochondria, but appears to be specific for SOD2 (Luk *et al.*, 2003b).

While there is no variation in the number of MTM1-like genes between members of different fungal groups, MTM1 proteins have undergone a remarkable duplication event in *Rhizopus oryzae* in accordance with a whole-genome duplication event (Ma *et al.*, 2009) (Table 1, Fig. S3). The two other mucorale species *Phycomyces blakesleanus* (<http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>) and *Mucor circinelloides* (<http://genome.jgi-psf.org/Mucor/>) also possess two MTM1 homologues. PcMTM1 was isolated and cloned into a pFL61 vector for *mtm1Δ* mutant strain transformation. However, we failed in getting a functional complementation of the *mtm1Δ* mutant strain with the *P. chrysosporium* homologue. We

constructed a PcMTM1:GFP fusion protein to determine the intracellular localization of PcMTM1. The labelling pattern obtained showed sparse labels similar to that obtained for the yeast protein (data not shown). PcMTM1 expression levels were statistically significantly higher on Mn^{2+} -supplemented growth medium (Fig. 4), although there were no differences during the course of the experiment. We also retrieved six ESTs confirming that this gene is indeed expressed in *P. chrysosporium*. Given its suggested location in mitochondria and expression pattern, the PcMTM1 transporter could be a key protein for Mn^{2+} loading into the mitochondria and subsequent activation of the Mn^{2+} -containing SOD located in this cellular compartment. Given the importance of SOD in the ligninolytic fungus *P. chrysosporium*, this transporter would be an essential component in controlling redox mechanisms.

Mn-CDF homologues from the Cation Diffusion Facilitator Family (CDF; TC# 2.A.4). The CDF transporters, first identified by Nies and Silver (Nies, 2003), are ubiquitous, spanning all kingdoms of life. CDFs are Me^{2+}/H^+ (K^+) antiporters that catalyse the efflux of a variety of transition metal cations from the cytoplasm to the outside of the cell or into subcellular compartments. Phylogenetic analyses classified CDF members into three groups, which have different selectivity towards the principally transported metal (Zn-, Fe/Zn- and Mn-CDF), plus one group with unknown metal specificity (Montanini *et al.*, 2007).

The number of Mn-CDF genes ranged between one and five with the highest number found in the sordariomycetes (Table 1). We could not find members of this group in the genomes of *S. cerevisiae* and *S. pombe*. A single Mn-CDF gene is present in the genome of the chytridiomycete *B. dendrobatidis*. It is generally accepted that chytridiomycetes belong to the most ancient fungi that are rooted close to the base of the fungal evolutionary tree. Thus, our observations indicate that Mn-CDF proteins must have been present in the genome of the common ancestor of modern fungi but lost in the lineage that led to the saccharomyces genus. Clustering of the 57 full-size Mn-CDF showed the identification of two clusters (Fig. 6). Cluster I contains sequences from all phyla chytridiomycotina, mucoromycotina, ascomycota and basidiomycota. Cluster II does not include agaricomycete members but contain the single *Candida albicans* member. Agaricomycetes Mn-CDF constitute a monophyletic clade in cluster I, whereas tremellomycete, ustilagamycete, pucciniomycete and microbotryomycete species have two or more Mn-CDF in the two distant clusters I and II. Grouping of multiple Mn-CDF members of the same species in the same cluster suggests that gene duplication events continued to happen throughout the evolution of fungal species.

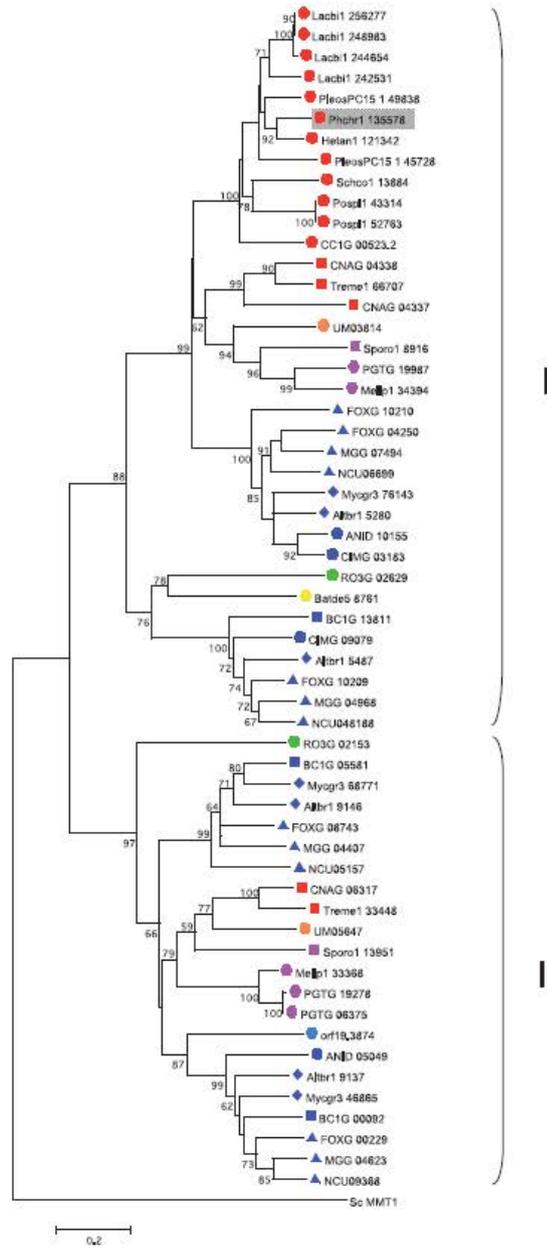


Fig. 6. Phylogenetic tree of fungal Mn-CDF proteins. Legend as in Fig. 1. The CDF MMT1 from *S. cerevisiae* was employed as an outgroup.

We isolated and cloned the Mn-CDF from *P. chrysosporium* and named it PcMnt (for Mn transporter), by homology with the CDF-ZnT (zinc transporter) of higher fungi (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2005). To characterize the *P. chrysosporium* CDF protein further, *PcMnt* cDNA was expressed in *S. cerevisiae pmr1Δ* strain. The Mn-sensitive phenotype of the *pmr1Δ* mutant (Lapinskas *et al.*, 1995) was fully complemented by *PcMnt* on 1 and 5 mM Mn²⁺ (Fig. 2D–F). We constructed a *PcMnt:GFP* fusion protein to determine the intracellular localization of PcMnt. Surprisingly, the GFP fluorescence was clearly found at the periphery of the cell (Fig. 3E and F), and not at the vacuolar membrane as shown by the lack of fluorescence around vacuolar structures stained with the vacuolar lumen specific dye CMAC (Fig. 3G and H). The expression of *PcMnt* was measured after transfer of *P. chrysosporium* fungal colonies on Mn-depleted or Mn-supplemented medium (Fig. 4). Mn-supplemented fungal colonies showed statistically significant higher *PcMnt* expression levels. A significant increase was also observed for the Mn-supplemented treatment during the course of the experiment, indicating a possible induction of *PcMnt* in response to Mn-supply. The *PcMnt* is the only gene in the present study, which expression is induced both during time and by Mn-treatment. We found a single EST in database corresponding to this transporter gene. These data indicate a key function of *PcMnt* in Mn²⁺ homeostasis, being probably responsible for the extrusion of this cation out of the fungal cell. These data represent the first example of a CDF member having this function. In addition, this is the first fungal Mn-CDF characterized so far (Fig. 6). Further biochemical experiments are needed to confirm this key function in *P. chrysosporium*.

CCC1 homologues from the Vacuolar Iron Transporter Family (VIT; TC# 2.A.89). CCC1 was first identified as a yeast transporter that mediated the accumulation of Mn²⁺ into a membranous compartment. CCC1 was demonstrated to be a vacuolar uptake protein that transports Fe²⁺ and Mn²⁺ into the vacuole (Li *et al.*, 2001).

One or two corresponding genes were identified in most of the analysed species (Table 1, Fig. S4), indicating that most fungi may store Fe²⁺/Mn²⁺ within vacuoles. As many as five CCC1 genes were found in *P. graminis*, we found only three copies of CCC1 members in the other *Puccinia* species *P. triticina*, suggesting that part of a chromosome may have been duplicated at the species level. The genome of the ancient chytrid species contains two CCC1 encoding genes while many of the more advanced fungi contain a single gene or are completely devoid of CCC1 genes. Remarkably, these genes are absent from *A. brassicicola* (Table 1), a feature that we confirmed in three other species of the Pleosporale order (*Cochliobolus heterostrophus*, *Pyrenophora tritici-repentis* and

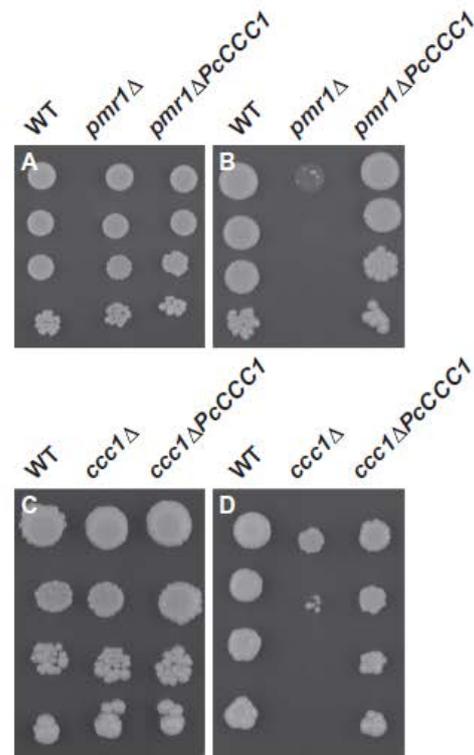


Fig. 7. Functional characterization of PcCCC1. Plates were inoculated with the wild-type *S. cerevisiae* strain BY4741 (WT), or with the *pmr1Δ* mutant strains transformed with pFL61 alone (*pmr1Δ*) or with pFL61 containing *PcCCC1* (*pmr1ΔPcCCC1*) to test the manganese phenotype (A and B), or with *ccc1Δ* mutant strains transformed with pFL61 alone (*ccc1Δ*) or with pFL61 containing *PcCCC1* (*ccc1ΔPcCCC1*) to test the iron phenotype (C and D). Selective media were as followed: (B) 2 mM Mn²⁺; (D) 5.25 mM Fe²⁺. Plates were incubated at 30°C for 3 days. A representative plate (from three to four) is shown and the experiments were carried out at least twice with similar results.

Stagonospora nodorum). The absence of CCC1-like transporters in a significant proportion of the analysed genomes suggests that fungal CCC1 proteins are not essential for viability. They might be required under specific physiological conditions.

The *P. chrysosporium* CCC1 homologue that we named PcCCC1 (35% identity with ScCCC1) was cloned and expressed in the *S. cerevisiae pmr1Δ* mutant (Li *et al.*, 2001). Growth was monitored on either control or Mn-supplemented medium. The Mn-sensitive phenotype of *pmr1Δ* mutant was fully complemented by *PcCCC1* on 2 mM Mn²⁺ (Fig. 7A and B). A functional complementation

test was also performed for Fe²⁺ with the *ccc1Δ* mutant, which shows increased sensitivity to external iron (Li *et al.*, 2001). The Fe-sensitive phenotype of the *ccc1Δ* mutant was fully complemented by *PcCCC1* on 5.25 mM Fe²⁺ (Fig. 7C and D). *PcCCC1* was fused to a GFP gene to determine the membrane localization of PcCCC1 more precisely. We found that *PcCCC1::GFP* fluorescence was found in small vesicles (Fig. 3I and J), a labelling that colocalizes with the fluorescent dye FM4-64 that stains the vacuolar membrane (Fig. 3K and L). Note that the plasmalemma was also stained by this dye, due to short incubation time that was used. PcCCC1 is therefore a potential candidate for vacuolar storage of Mn ions in *P. chrysosporium* (Table 2). We retrieved five ESTs from databases, all from the strain RP78. *PcCCC1* was not expressed in the growth conditions used in Fig. 4 but expression of *PcCCC1* was detected at early stages of growth (two days before transfer). Further studies are required to fully understand its role in *P. chrysosporium*.

PMR1 homologues from the P-type ATPase Superfamily (P-ATPase; TC# 3.A.3). The P-type ATPases transport ions or molecules across biological membranes using the energy of ATP hydrolysis. The *S. cerevisiae* PMR1 belong to the P2A-ATPase phylogenetic subgroup (Vangheluwe *et al.*, 2009) is localized in the Golgi membrane and transports calcium and manganese from the cytosol into the Golgi lumen (Lapinskas *et al.*, 1995). The Ca²⁺ and Mn²⁺ transported by PMR1 enable the processing and trafficking of proteins moving through the secretory pathway (Lapinskas *et al.*, 1995) and *pmr1Δ* cells are highly sensitive to Mn²⁺.

The number of PMR1 homologues is highly conserved, with one gene in each fungal genome (Table 1, Fig. S5), with the exception of *Postia placenta*, which possesses two PMR1 genes. The presence of two PMR1 copies in *P. placenta* is probably due to a duplication event that affects a whole genomic fragment, since the syntenicity is conserved for about 20 ORFs around the PMR1 loci. We were not able to clone the full-length cDNA for PcPMR1 but transcripts were detected (Fig. 4). Expression levels of *PcPMR1* measured by RT-PCR were not correlated with the Mn²⁺ status of the medium (Fig. 4). PMR1 homologues have been functionally characterized in the following species: *Y. lipolytica* (Park *et al.*, 1998), *S. pombe* (Maeda *et al.*, 2004), *A. niger* (Yang *et al.*, 2001), *C. albicans* (Bates *et al.*, 2005) and *P. pastoris* (Dux and Inan, 2006), and have been shown to transport at least Mn²⁺. Together, these results suggest that the PMR1 gene from *P. chrysosporium* encodes an *S. cerevisiae* PMR1-like Ca²⁺-Mn²⁺ ATPase. This evidence should be confirmed by heterologous expression of the PcPMR1 gene for functional complementation.

Table 2. Summary of the characteristics of the metal transporter genes isolated from the genome of *P. chrysosporium*, listed in the order they are mentioned in the text.

Gene	Expression evidence in <i>P. chrysosporium</i>		Functional characterization in <i>P. chrysosporium</i>		Localization – function	Functional characterization in other fungi
	# EST	RT-PCR	Mn ²⁺ and Pi transport	Fe ²⁺ transport		
PcPHO84	2	Yes	Mn ²⁺ and Pi transport		Plasma membrane – uptake	<i>S. cerevisiae</i> (Jensen <i>et al.</i> , 2003)
PcSMFs	0	No	ND		ND	<i>S. cerevisiae</i> (Portnoy <i>et al.</i> , 2000); <i>S. pombe</i> (Maeda <i>et al.</i> , 2004)
PcATX2	0	Yes	Mn ²⁺ transport		Golgi membrane – loading of the cytosol	<i>S. cerevisiae</i> (Lin and Cudde, 1996)
PcMTM1	0	Yes	No complementation		Mitochondrial membrane	<i>S. cerevisiae</i> (Luk <i>et al.</i> , 2003b)
PcMnT	1	Yes	Mn ²⁺ transport		Plasma membrane – extrusion out of the cell	None
PcCCC1	5	Yes	Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transport		Vacuolar membrane – sequestration	<i>S. cerevisiae</i> (Li <i>et al.</i> , 2001)
PcPMR1	0	Yes	ND		ND	<i>S. cerevisiae</i> (Lapinskas <i>et al.</i> , 1995); <i>Y. lipolytica</i> (Park <i>et al.</i> , 1998); <i>S. pombe</i> (Maeda <i>et al.</i> , 2004); <i>A. niger</i> (Yang <i>et al.</i> , 2001); <i>C. albicans</i> (Bates <i>et al.</i> , 2005); <i>P. pastoris</i> (Dux and Inan, 2006)

ND, not determined.

Conclusions

Our analysis of fungal potential Mn²⁺ transporter proteins provides an insight into the diversity of this group of proteins within the main fungal lineages. Two species, *B. dendrobatidis* and *R. oryzae*, were of special interest as they represent basal lineages that received only little attention as compared with asco- and basidiomycetes. The number of members of the particular transporter families in the genomes of basidiomycetes tends to be higher than in those of ascomycetes. However, the number of CDF members is higher in the subphylum pezizomycotina of ascomycetes, as compared with any other subphylum of the basidiomycetes.

Some distinct features of the present work are the lack of MnCDF and ATX2-like genes in the *S. pombe* transporter, the lack of CCC1-like genes in *A. brassicicola* and of SMF-like genes in *A. brassicicola* and *M. grisea*, indicating that these systems were most likely lost after the divergence of the lineage leading to this species from the rest of the group. Conversely, over-representation of some families of transporters in some fungal species (i.e. SMF and CCC1 in *P. graminis*, MTM1 in *R. oryzae*, PMR1 in *P. placenta*) is often due to large duplication events that affect a whole genomic fragment. The present work also shows that PHO84-like or Mn-CDF proteins are groups of proteins that have undergone a significant diversification after the divergence of fungal phyla. The process of gene duplication was apparently accompanied by gene loss events, and this resulted in a great variety of Mn-transporters that we can observe in the genomes of modern fungi.

A major drawback in studying Mn²⁺ transporters is the lack of functional data from these higher fungi, since most of the available information was obtained from studies on *S. cerevisiae* and *S. pombe*. Both species have significantly reduced set of Mn²⁺ transporters and cannot serve as a good model for other fungi. Of the 11 transporter genes discovered in the genome of *P. chrysosporium*, four (*PcPHO84*, *PcATX2*, *PcMnt* and *PcCCC1*) were indeed found to be involved in Mn²⁺ transport (Table 2) and expression was evidenced by RT-PCR or by EST for these four genes. Unfortunately, the expression profiles did not allow us to correlate LIP secretion and Mn uptake capacities, as we would expect since LIP are secreted in the absence of Mn in the culture medium. The PHO84-, ATX2- and CCC1-like proteins were functionally characterized for the first time from a fungus (*P. chrysosporium*) other than the model yeast *S. cerevisiae*. A remarkable novelty that has arisen from studies with *P. chrysosporium* transporters is the isolation of a fungal Mn-CDF member not present in the genome of *S. cerevisiae* and that locates on the plasma membrane. Previously characterized Mn²⁺ transporters of the CDF family in eukaryotes

were indeed found located on internal membrane, being responsible for sequestration of Mn²⁺ into internal compartments (Delhaize *et al.*, 2003; Peiter *et al.*, 2007). On the whole, our data demonstrated that *P. chrysosporium* is fully equipped for Mn²⁺ loading into the cytosol with the characterized *PcPHO84* (entry into cell) and *PcATX2* (extrusion from Golgi vesicles) and the potential SMF members. Mn²⁺ extrusion out of the cytosol may be carried out by *PcMTM1* and *PcCCC1* for internal sequestration or by *PcMnt* for extrusion out of the cell. Despite the fact that we did not succeed in cloning the full-length version of the *PcPMR1* cDNA, this transporter has been fully characterized in a number of other fungi (Table 2), and we may therefore hypothesize that Mn²⁺ loading into Golgi vesicles may also be carried out by *PcPMR1* in *P. chrysosporium*.

Using absolute RT-qPCR quantification, high levels of Mn peroxidase transcripts were observed in the absence of Mn²⁺, although almost no MnP was detected in the extracellular medium (Mancilla *et al.*, 2010). Nevertheless, under these conditions, the enzyme was identified in intracellular vesicles and compartments. Upon addition of Mn²⁺, the enzyme was secreted to the culture medium even in the presence of cycloheximide, indicating that in *C. subvernisporea* manganese is involved in the post-translational control of MnP production, by affecting secretion (Mancilla *et al.*, 2010). The tight control of intracellular Mn²⁺ ion concentration in ligninolytic fungi is therefore of crucial importance for the control of lignin degradation, and thereof for the C cycle in forest ecosystems. The findings presented here have set the stage for future studies elucidating manganese homeostasis and transport in fungi in general and in the saprophytic fungus *P. chrysosporium* in particular.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the ANR blanc programme (project 06-BLAN-0088), and the Région Lorraine.

References

- Au, C., Benedetto, A., Anderson, J., Labrousse, A., Erikson, K., Ewbank, J.J., and Aschner, M. (2009) SMF-1, SMF-2 and SMF-3 DMT1 orthologues regulate and are regulated differentially by manganese levels in *C. elegans*. *PLoS ONE* **4**: e7792.
- Bates, S., MacCallum, D.M., Bertram, G., Munro, C.A., Hughes, H.B., Buurman, E.T., *et al.* (2005) *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem* **280**: 23408–23415.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., and 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.
- Brown, J.A., Glenn, J.K., and Gold, M.H. (1990) Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* **172**: 3125–3130.
- Cellier, M., Prive, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., and Gros, P. (1995) *Nramp* defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10069–10093.
- Coassin, M., Ursini, F., and Bindoli, A. (1992) Antioxidant effect of manganese. *Arch Biochem Biophys* **299**: 330–333.
- Cohen, R., Hadar, Y., and Yarden, O. (2001) Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn²⁺. *Environ Microbiol* **3**: 312–322.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., *et al.* (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**: 980–986.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G., and Ryan, P.R. (2003) Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* **15**: 1131–1142.
- Dux, M.P., and Inan, M. (2006) Identification and characterization of calcium and manganese transporting ATPase (PMRI) gene of *Pichia pastoris*. *Yeast* **23**: 613–621.
- Fristedt, U., Van Der Rest, M., Poolman, B., Konings, W.N., and Persson, B.L. (1999) Studies of cytochrome c oxidase-driven H⁺-coupled phosphate transport catalyzed by the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 permease in coreconstituted vesicles. *Biochemistry (Mosc)* **38**: 16010–16015.
- Gaither, L.A., and Eide, D.J. (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* **14**: 251–270.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.O., Jaffe, D., *et al.* (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859–868.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., *et al.* (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105–1115.
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., *et al.* (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546–567.
- Gonzalez-Guerrero, M., Azcon-Aguilar, C., Mooney, M., Valderas, A., MacDiarmid, C.W., Eide, D.J., and Ferrol, N. (2005) Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genet Biol* **42**: 130–140.
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes* **1465**: 190–198.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., *et al.* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818–822.
- Jensen, L.T., Ajua-Alemanji, M., and Culotta, V.C. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 42036–42040.
- Johansson, T., Nyman, P.O., and Cullen, D. (2002) Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase-encoding gene from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2077–2080.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., *et al.* (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7329–7334.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., *et al.* (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97–101.
- Kersten, P., and Cullen, D. (2007) Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet Biol* **44**: 77–87.
- Lapinskas, P.J., Cunningham, K.W., Xiu Fen, L., Fink, G.R., and Culotta, V.C. (1995) Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol* **15**: 1382–1388.
- Lapinskas, P.J., Lin, S.J., and Culotta, V.C. (1996) The role of the *Saccharomyces cerevisiae* CCC1 gene in the homeostasis of manganese ions. *Mol Microbiol* **21**: 519–528.
- Li, L., Chen, O.S., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* **276**: 29515–29519.
- Lin, S.J., and Culotta, V.C. (1996) Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Mol Cell Biol* **16**: 6303–6312.
- Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., *et al.* (2005) The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* **307**: 1321–1324.
- Luk, E., Jensen, L.T., and Culotta, V.C. (2003a) The many highways for intracellular trafficking of metals. *J Biol Inorg Chem* **8**: 803–809.
- Luk, E., Carroll, M., Baker, M., and Culotta, V.C. (2003b) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10353–10357.
- Ma, L.J., Ibrahim, A.S., Skory, C., Grabherr, M.G., Burger, G., Butler, M., *et al.* (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genetics* **5**: e1000549.
- Maeda, T., Sugiura, R., Kita, A., Saito, M., Deng, L., He, Y., *et al.* (2004) Pmr1, a P-type ATPase, and Pdt1, an Nramp homologue, cooperatively regulate cell morphogenesis in fission yeast: the importance of Mn²⁺ homeostasis. *Genes Cells* **9**: 71–82.
- Mancilla, R.A., Canessa, P., Manubens, A., and Vicuva, R. (2010) Effect of manganese on the secretion of manganese-peroxidase by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Fungal Genet Biol* **47**: 656–661.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E.G.J., Duchaussoy, F., *et al.* (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88–92.
- Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Sollewijn Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., *et al.* (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanero-*

- chaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol* **22**: 695–700.
- Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmöll, M., Kubicek, C.P., *et al.* (2009) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 1954–1959.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., and Chalot, M. (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* **8**: 107.
- Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313–339.
- Ohm, R.A., De Jong, J.F., Lugones, L.G., Aerts, A., Kothe, E., Stajich, J.E., *et al.* (2010) Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nat Biotechnol* **28**: 957–963.
- Park, C.S., Kim, J.Y., Crispino, C., Chang, C.C., and Ryu, D.D.Y. (1998) Molecular cloning of YIPMR1, a *Saccharomyces cerevisiae* PMR1 homologue encoding a novel P-type secretory pathway Ca^{2+} -ATPase, in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **206**: 107–116.
- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F.J.M., *et al.* (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 8532–8537.
- Perie, F.H., and Gold, M.H. (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2240–2245.
- Pittman, J.K. (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol* **167**: 733–742.
- Portnoy, M.E., Xiu Fen, L., and Culotta, V.C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* **20**: 7893–7902.
- Reddi, A.R., Jensen, L.T., and Culotta, V.C. (2009) Manganese homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Rev* **109**: 4722–4732.
- Saier, M.H., Jr (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 354–411.
- Saier, M.H., Jr, Yen, M.R., Noto, K., Tamang, D.G., and Elkan, C. (2009) The transporter classification database: recent advances. *Nucleic Acids Res* **37**: D274–D278.
- Scheel, T., Hofer, M., Ludwig, S., and Holker, U. (2000) Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 686–691.
- Schlosser, D., and Höfer, C. (2002) Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{2+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3514–3521.
- Sharpton, T.J., Stajich, J.E., Rounsley, S.D., Gardner, M.J., Wortman, J.R., Jordan, V.S., *et al.* (2009) Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* **19**: 1722–1731.
- Singh, D., and Chen, S. (2008) The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 399–417.
- Vangheluwe, P., Sepulveda, M.R., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vanoevelen, J. (2009) Intracellular Ca^{2+} - and Mn^{2+} -transport ATPases. *Chem Rev* **109**: 4733–4759.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., *et al.* (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871–880.
- Wykoff, D.D., and O'Shea, E.K. (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**: 1491–1499.
- Wymelenberg, A.V., Minges, P., Sabat, G., Martinez, D., Aerts, A., Salamov, A., *et al.* (2006) Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genet Biol* **43**: 343–356.
- Yang, J., Kang, H.A., Ko, S.M., Chae, S.K., Ryu, D.D.Y., and Kim, J.Y. (2001) Cloning of the *Aspergillus niger pmrA* gene, a homologue of yeast PMR1, and characterization of a *pmrA* null mutant. *FEMS Microbiol Lett* **199**: 97–102.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Phylogenetic tree of fungal SMF proteins. Predicted amino acid sequences of analysed proteins were aligned by clustalW and imported into the MEGA 4.1 software package to generate a phylogenetic tree using the neighbour-joining method. Numbers next to the branching points indicate the relative support from 1000 replicates. Corresponding gene loci are given in Table S1 together with the full names of the fungal species used in the study. The scale at the bottom indicates genetic distance proportional to the amino acid substitutions per site. Grey shading indicates that the gene has been functionally characterized.

Fig. S2. Phylogenetic tree of fungal ATX2-like proteins. Legend as in Fig. S1. The ZIP YKE4 from *S. cerevisiae* was employed as an outgroup.

Fig. S3. Phylogenetic tree of fungal MTM1-like proteins. Legend as in Fig. S1. The MC AGC1 from *S. cerevisiae* was employed as an outgroup.

Fig. S4. Phylogenetic tree of fungal CCC1-like proteins. Legend as in Fig. S1.

Fig. S5. Phylogenetic tree of fungal PMR1-like proteins. Legend as in Fig. S1. The P-ATPase PMC1 from *S. cerevisiae* was employed as an outgroup.

Table S1. Proteins used for phylogenetic analyses, with the related databases, accession numbers, protein IDs, protein lengths and coordinates.

Table S2. Primers used for reverse transcription polymerase chain reaction and cloning, with number of cycles and T_m (in

°C) for RT-PCR (F/R: Forward/Reverse primers). Cloning was usually done with PCR products obtained after 40 cycles of PCR cycles.

Appendix S1. Experimental procedures.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Résumé

P. chrysosporium est un champignon saprophyte capable de dégrader de nombreux xénobiotiques, ce qui le rend particulièrement intéressant pour des applications en bioremédiation. Plusieurs publications mettent en avant l'importance de la maîtrise de l'homéostasie métallique dans la production de certaines enzymes lignolytiques. La présence de manganèse est en effet nécessaire à la production des manganèses peroxydases, alors qu'à l'inverse une carence permettra la production de lignines peroxydases. Cependant, la caractérisation de transporteurs impliqués dans le contrôle de l'homéostasie métallique n'a fait l'objet de recherches poussées que chez le champignon modèle *S. cerevisiae*.

L'analyse des transporteurs putatifs de manganèse de 26 espèces fongiques représentant 20 ordres fongiques a permis de constituer un répertoire de 281 transporteurs de manganèse. L'analyse phylogénétique a permis de mettre en évidence que des processus de duplication, mais également de délétion, avaient eu lieu en particulier chez *S. cerevisiae*. Cependant ce dernier ne possède pas de transporteurs de manganèse appartenant à la famille des Cation Diffusion Facilitator. Dans le génome de *P. chrysosporium*, onze transporteurs de manganèse appartenant à différentes familles de gènes ont été identifiés. Le niveau d'expression de ces différents gènes a été étudié notamment en condition lignolytique. Ces transporteurs ont également été clonés afin de vérifier leurs fonctions par complémentation en système hétérologue. Cette étude a permis de mettre en évidence les transporteurs de manganèse putatifs de nombreux organismes fongiques, ainsi que l'absence d'une famille de transporteurs impliquée dans les mouvements de manganèse chez *S. cerevisiae*.

Abstract

P. chrysosporium is a saprophytic fungus able to degrade many xenobiotics which makes it particularly attractive for applications in bioremediation. Several publications highlight the importance of metal homeostasis in the production of lignolytics enzymes. Indeed the presence of manganese is required for the production of manganese peroxidase. Conversely, deficiency allows the production of lignins peroxidases. Characterization of transporters involved in the control of manganese homeostasis has been only researched in the model *S. cerevisiae*.

Analysis of putative manganese transporters of 26 fungal species representing 20 orders of fungus was used to form a repertory of 281 transporters of manganese. Phylogenetic analysis allowed to highlight that duplication process, but also deletion, had occurred particularly in *S. cerevisiae*. However this one is devoid of transporters belonging to the manganese Cation Diffusion Facilitator. Eleven transporters belonging to gene families in which manganese transporters have been found were identified in the *P. chrysosporium*'s genome. Expression level of these genes was examined particularly in ligninolytic condition. Transporters have also been cloned in order to verify their functions by complementation in heterologous system. This study allowed to identify putative manganese transporters of numerous fungal organisms and the lack of a transporters family involved in the manganese transport in *S. cerevisiae*.

Motes clés : manganèse, transporteurs, *Phanerochaete chrysosporium*, homéostasie, lignine peroxydase.

Keywords: manganese, transporters, *Phanerochaete chrysosporium*, homeostasis, lignin peroxidase.