HAL
open science

Etude de la diversité génétique et fonctionnelle de champignons du sol présentant une activité laccasique : mise au point d'outils moléculaires et application à l'étude comparative de sols agricoles et forestiers

Patricia Luis

To cite this version:

Patricia Luis. Etude de la diversité génétique et fonctionnelle de champignons du sol présentant une activité laccasique : mise au point d'outils moléculaires et application à l'étude comparative de sols agricoles et forestiers. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2004. Français. NNT : 2004NAN10030 . tel-01754339

HAL Id: tel-01754339

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754339

Submitted on 30 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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 Environnement
Département de Formation Doctorale Biologie-Agronomie-Environnement
Secteur Biologie Végétale et Forestière

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

Thèse
présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I
en Biologie Végétale et Forestière
par **Patricia LUIS**

Etude de la diversité génétique et fonctionnelle de champignons du sol présentant une activité laccasique : mise au point d'outils moléculaires et application à l'étude comparative de sols agricoles et forestiers

Soutenue publiquement le 25 juin 2004

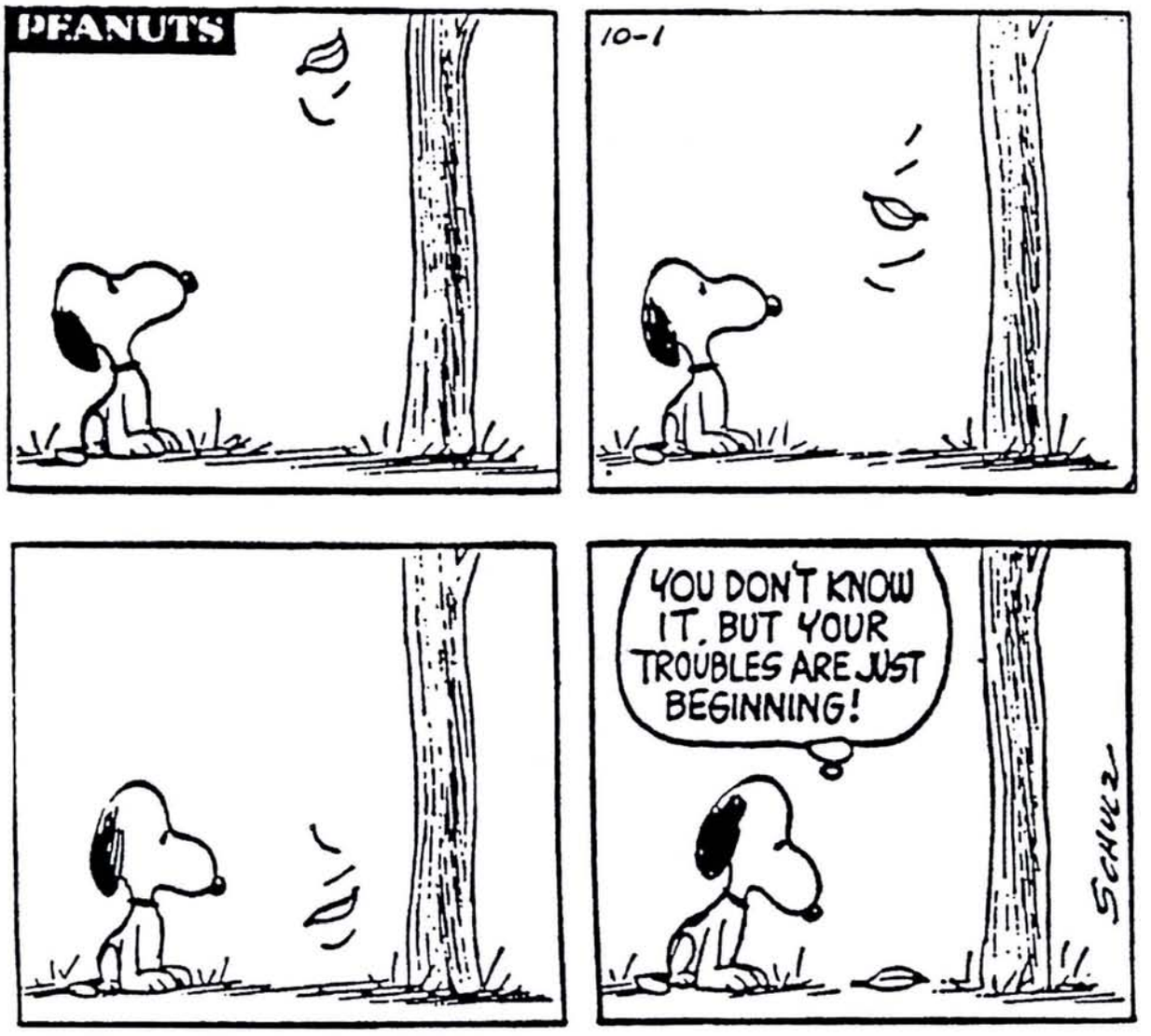
Membres du Jury :

Président :	**M. Michel CHALOT**	**Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy**
Rapporteurs :	**M. Jean-Charles MUNCH**	**Professeur, Université de Munich, Allemagne**
	Mme Gabrielle VOGT	**Professeur, Université Saint-Jérôme, Marseille**
Examinateurs :	**M. François BUSCOT**	**Professeur, Université de Leipzig, Allemagne (Directeur de thèse)**
	M. Francis MARTIN	**Directeur de Recherche, INRA, Nancy (Directeur de thèse)**

UMR INRA/UHP 1136 Interaction Arbres/Micro-organismes, Centre INRA de Nancy (France)

Département d'Ecologie Terrestre, Institut de Botanique, Université de Leipzig (Allemagne)

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



Copyright 1962 : reprinted by permission of United Feature Syndicate, Inc.

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

Table des matières

REMERCIEMENTS 06

AVANT-PROPOS 07

INTRODUCTION GENERALE 08

I. LE SOL 09

1.1. La fraction minérale 09

1.2. La matière organique 10

1.3. Les différentes formes de carbone organique dans les sols 12

1.4. La fraction biotique, activités biologiques et fonctionnement des sols 15

1.4.1. Les racines et la rhizosphère 15

1.4.2. Faune, microflore et qualité des sols 17

1.4.3. Les organismes fongiques, structure et fonction 18

II. LA DEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS LES SOLS 20

2.1. Décomposition des différentes formes de carbone organique dans les sols 20

2.1.1. Décomposition des composants facilement dégradables 21

2.1.2. Décomposition des composants difficilement dégradables 22

La cellulose et les hémicelluloses 22

La lignine et les autres composés phénoliques 23

2.2. Le rôle primordial des champignons dans la décomposition 24

2.2.1 Forte capacité dégradatrice des débris insolubles 24

2.2.2 Les successions fongiques dans les phénomènes de dégradation 26

III. ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE ET FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES FONGIQUES 29

3.1. Outils permettant l'étude de la structuration génétique des communautés fongiques 29

3.1.1. Les carpophores donnent une image biaisée des communautés 29

3.1.2. Le mycélium donne une image plus exacte des communautés 30

3.1.3. Les approches moléculaires permettant la caractérisation de la diversité génétique au sein des communautés à partir de l'ADN extrait des sols 33

3.2. Structuration génétique des communautés fongiques 34

3.2.1. Diversité et distribution des espèces *34*

3.2.2. Dynamique temporelle des espèces *36*

3.3. Etablir les liens entre diversité d'espèces, physiologie et fonctionnement des écosystèmes 38

3.3.1. Analyse de la diversité des gènes fonctionnels *39*

3.3.2. Analyse de l'expression des gènes fonctionnels *40*

3.3.3. Analyse d'acides nucléiques marqués (Stable Isotope Probing ou SIP) et microarrays *40*

IV. LES LACCASES FONGIQUES **42**

4.1. Les laccases, une famille d'enzymes largement distribuée 42

4.2. Structure et fonction des laccases fongiques 43

4.2.1. Structure *43*

4.2.2. Fonction *44*

Enzyme impliquée dans des phénomènes de dégradation *44*

Enzyme impliquée dans des phénomènes de biosynthèse *45*

VI. OBJECTIFS **46**

CHAPITRE I **48**

Développement et évaluation d'une méthode moléculaire permettant d'analyser spécifiquement par PCR la diversité des gènes laccasiques de Basidiomycètes dans les sols

CHAPITRE II **70**

Caractérisation de la diversité et de la distribution des gènes laccasiques de Basidiomycètes au sein de différents types de sols

CHAPITRE III **96**

Optimisation d'une méthode moléculaire permettant d'analyser par RT-PCR et PCR semi-quantitative les profils d'expression des gènes laccasiques préalablement détectés au niveau ADN

DISCUSSION GENERALE **114**

Comprendre le fonctionnement de la communauté fongique dans les sols : une tâche difficile **116**

Approches développées afin d'étudier la diversité génétique et fonctionnelle des champignons **117**

Basidiomycètes présentant une activité laccasiques dans les sols, avantages et contraintes

Evaluation de la diversité génétique des gènes laccasiques dans différents types de sols **119**

Etude approfondie de la diversité génétique des gènes laccasiques dans un sol brun forestier (Steigerwald en Bavière) **121**

Diversité globale en gènes laccasiques *121*

Distribution verticale des gènes laccasiques *121*

Distribution spatiale des gènes laccasiques *122*

Distribution spatiale des espèces dominantes *123*

Etude de l'expression des gènes laccasiques dans le même sol brun forestier **125**

CONCLUSION ET PERPECTIVES **127**

BIBLIOGRAPHIE **130**

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux encadrants sans qui ce travail n'aurait pas été ce qu'il est. Un très grand merci à François Buscot qui m'a permis de réaliser ma thèse sur ce sujet complexe mais non moins passionnant, merci pour sa disponibilité et pour son encadrement tout au long de ces années. Un immense merci à Francis Martin qui me suit depuis mon DEA, merci pour ses critiques toujours très constructives et pour son soutien.

Je remercie également les membres du jury, rapporteurs et examinateurs, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je me dois de saluer les nombreuses personnes que j'ai eu la chance de rencontrer ces dernières années et qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre. Je m'excuse d'avance auprès des oubliés :

Virginie Acheré, Joanne Bertaux, Karen Bertaux, Staver Bezhani, Verena Blanke, Boris Börstler, Daniel Bouchard, Marc Buée, Carmen Calambos, Christophe Calvaruso, Jean-Louis Churin, David Cohen, Claude Coppin, Pierre-Emmanuel Courty, Christine Delaruelle, Aurélie Deveau, Jesus Diez, Franck Ditengou, Sébastien Duplessis, Claudia Eggert, Klemens Ekschmitt, Pascal Frey, Pascale Frey-Klett, Jean Garbaye, Ute Hamer, Anton Hartmann, Uwe Hell, Stefan Hempel, Sylvie Herrmann, Anne Jambois, Jean-Luc Jany, Micheal Kaldorf, Ellen Kandeler, Harald Kellner, Ingrid Kögel-Knabner, Annegret Kohler, Erika Kothe, Sofia Kotowski, Claudia Krüger, Uwe Langer, Frédéric Lapeyrie, Valérie Legué, François Le Tacon, Ryta Lomberh, Claude Murat, Angela Nüske, Béatrice Palin, Véronica Pedera, Christina Popescu, Anke Renker, Carsten Renker, Drasenka Selesi, Bernd Marschner, Martina Peter, Cécile Rinaldi, Blandine Rimbault, Christina Schindler, Sandra Schmidt, Irena Sherameti, Sonja Spindler, Denis Tagu, Nicole Thirion, Dominique Vairelles, Patrice Vion, Grit Walther, Yongjin Wang, Bettina Zimdars.

Je dédis cette thèse à mes tendres parents Firmino et Ausenda qui m'ont soutenu sans douter, à ma sœur Sandra la complice de tous les instants, à mon adorable belle-maman Annie et à Patrick l'amour de ma vie.

Avant-propos

Le présent travail a été réalisé dans le cadre d'une coopération entre le Département des Sciences de l'Environnement de l'université d'Iéna dirigé par M. le professeur François Buscot, puis à la suite de sa mutation à l'université de Leipzig, entre le laboratoire d'Ecologie Terrestre et l'UMR 1136 INRA/UHP « Interaction Arbres/Micro-organismes », dirigée par M. Francis Martin (Directeur de Recherche), grâce à un financement (Bu 941/1-1 & 1-2) obtenu par M. François Buscot auprès de la fondation de recherche allemande Deutsche Forschung Gemeinschaft (DFG). Le projet s'inscrit dans le cadre d'un programme concerté de la DFG (SPP 1090) intitulé « Les sols comme sources et puits de CO_2, mécanismes et régulation de la stabilisation de la matière organique dans les sols » et impliquant une vingtaine d'équipes de recherche allemandes. Les domaines d'investigation touchent toutes les fractions du sol pouvant jouer un rôle dans la minéralisation et la stabilisation de la matière organique. Certains laboratoires se focalisent sur l'étude des propriétés physico-chimiques des fractions minérales et organiques, d'autres s'intéressent à l'édaphon (faune ou microflore) et aux activités biologiques des sols. Les sols agricoles et forestiers analysés font partie de placettes faisant l'objet d'essais permanents depuis plusieurs décennies.

Le travail de ce mémoire porte sur l'étude de la diversité génétique et fonctionnelle des gènes laccasiques fongiques, et plus spécifiquement ceux des Basidiomycètes, dans des sols forestiers et agricoles choisis. Par le biais de l'étude de ces exo-enzymes impliquées dans les processus de dégradation (de la lignine et autres polyphénols) et d'humification de la matière organique, il contribue à élucider une partie du cycle du carbone dans les sols.

INTRODUCTION GENERALE

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

I. Le sol

Le sol est un substrat complexe composé de minéraux, de racines, de biomasse végétale, animale et microbienne, de matière organique (MO) à différents stades de décomposition, d'eau et d'atmosphère gazeuse (Killham, 1994). Le sol n'est pas un milieu inerte et stable, il se forme, se développe et évolue sous l'influence du climat et de la végétation à partir du matériau minéral initial (substratum géologique). A mesure que l'évolution d'un sol se poursuit, celui-ci s'approfondit et se différencie en couches successives (horizons) de plus en plus nombreuses, épaisses et distinctes, dont l'ensemble constitue le profil (Duchaufour, 2001).

1.1. La fraction minérale

Si tout sol contient une certaine quantité de minéraux primaires « hérités » de la roche mère (quartz, feldspath…), il est surtout caractérisé par la présence de nouveaux minéraux, dits secondaires (argiles, oxydes libres...), résultant de l'altération (transformation biochimique et géochimique) de certains minéraux primaires (Duchaufour, 2001).

Les particules minérales, principales composantes formant la phase solide ou matrice du sol, sont différentiables par leur taille. Ceci donne lieu à la distinction de quatre classes, (1) les cailloux et graviers d'un diamètre supérieur à 2 mm qui sont souvent des débris de la roche mère, (2) les sables de 2 mm à 50 µm (sables grossiers : 2 mm à 0.2 mm ; sables fins : 0.2 mm à 50 µm), (3) les limons (ou silts) de 50 µm à 2 µm (limons grossiers : 50 µm à 20 µm; limons fins : 20 µm à 2 µm) et (4) une fraction fine inférieure à 2 µm, communément appelée « argiles », formulation cependant impropre car elle ne contient pas uniquement des argiles au sens minéralogique mais aussi d'autres minéraux (Duchaufour, 2001).

Les dimensions de certaines particules du sol (pierres, sables, argiles…) pourraient suggérer l'exclusion par la taille de certains organismes. Cependant, il n'existe pas de corrélation simple entre la distribution des particules et celle des organismes (Killham, 1994). En effet, la quantité et la nature des pores du sol sont non

seulement déterminées par la proportion relative des différents types de particules (texture) mais aussi par la manière dont ces particules sont agrégées (structure) (Duchaufour, 2001). L'espace des pores formés dans et entre agrégats varie largement selon les quantités d'argiles présentes. Il apparaît que des sols riches en argiles possèdent un faible nombre de pores qualifiés de larges ($\geq$100 µm). Ces types de sols s'avèrent dès lors défavorables à la croissance optimale des systèmes racinaires (7-1000 µm) et plutôt favorables à la survie des micro-organismes (0.5-10 µm), tels les bactéries ou les champignons, « physiquement » protégés de l'attaque des protozoaires (10-80 µm) ou d'autres animaux du sol. Ces sols riches en argiles peuvent toutefois développer une macrostructure sous forme de larges fentes ou fissures permettant la croissance racinaire (Killham, 1994).

La structure du sol gouverne la présence et l'activité des animaux qui tendent à préférer les sols humides et bien aérés. L'activité de la fraction biotique peut, en contre partie, affecter la structure du sol. Les plantes peuvent, par exemple, séparer les particules du sol par le développement extensif de leurs systèmes racinaires et au contraire les lier entre elles grâce à la sécrétion de mucilages polysaccharidiques. Les microbes du sol, et plus particulièrement les champignons filamenteux, ont également tout comme les plantes un rôle potentiel dans la formation d'agrégats stables *via* la production de substances polysaccharidiques ou protéiques (Rillig *et al.*, 2002). Ceci pourrait être un des nombreux mécanismes intervenant dans la formation des agrégats du sol, à partir des particules minérales, établissant une protection physique d'une partie de la MO du sol (Killham, 1994).

1.2. La matière organique

La matière organique du sol (MOS) correspond à un vaste ensemble constitué d'éléments en évolution permanente. Elle regroupe la matière organique vivante (essentiellement microbienne), la MO fraîche (débris végétaux, cadavres et excréments animaux), les composés organiques intermédiaires ou MO transitoire (composés organiques en cours d'évolution entre la MO fraîche et l'humus), et les substances humiques regroupées sous le terme d'humus. Cette matière organique du sol peut être particulaire (MOP) ou dissoute (MOD). La MOD est un constituant important de la solution du sol et regroupe essentiellement des exsudats racinaires, des substances

organiques dérivées de la dégradation microbienne, des polyphénols, des substances humiques solubles, et des produits du métabolisme microbien (McDowell, 2003).

Selon le degré de résistance de la MOS aux processus de décomposition, deux principales fractions sont distinguables : la MO stable et la MO active. La MO stable correspond à la MOS protégée de la décomposition par trois mécanismes, (1) une stabilisation chimique, (2) une protection physique et (3) une stabilisation biochimique (Six *et al.*, 2002). La stabilisation chimique de la MO résulte de son adsorption aux particules minérales du sol que sont les limons et les argiles (Six *et al.*, 2002 ; Rennert & Mansfeldt, 2003). Dans le cas des fractions argileuses, les oxydes/hydroxydes d'aluminium et de fer présents sont souvent les agents adsorbants majeurs de la MOS (Kaiser & Zech, 2000 ; Kaiser *et al.*, 2002). Cette stabilisation est non seulement influencée par la composition minéralogique du sol mais aussi par la composition et l'origine de la MO (Rennert & Mansfeldt, 2003). Concernant la protection physique de la MOS, les micro-agrégats, qu'ils soient « libres » ou inclus dans des macro-agrégats, protègent fortement la MOS de la dégradation en formant des barrières physiques contre les micro-organismes et leur enzymes oxydatives (Six *et al.*, 2002). De plus, la diffusion réduite d'oxygène dans ces micro-agrégats limiterait l'activité microbienne. La MOS biochimiquement stabilisée, quant à elle, regroupe un ensemble de composés chimiques difficilement dégradables. Il s'agit soit de débris végétaux naturellement complexes (lignine, polyphénols… Cf. section 2.2.2.) soit de composés complexes regroupés sous le terme d'humus et formés au cours de processus de décomposition par des réactions de transformation, de condensation et de polymérisation (Six *et al.*, 2002).

L'humus est une fraction colloïdale qui contracte des liens étroits avec les argiles et les oxydes libres. Les molécules complexes de la MO fraîche subissant une décomposition microbienne (transformation) libèrent des composés simples le plus souvent solubles. Une partie de ces composés simples est rapidement minéralisée en composés minéraux solubles ou gazeux (minéralisation primaire). La partie échappant à la minéralisation sert de matériau à l'édification, par condensation et polymérisation, de nouvelles molécules de plus en plus complexes et de nature colloïdale, dont l'ensemble constitue l'humus (Duchaufour, 2001). Ces composés peuvent à leur tour être minéralisés mais beaucoup plus lentement (minéralisation secondaire). L'humification étant liée aux activités microbiennes, les différentes formes d'humus (mor, moder ou

mull) peuvent être dues à la nature et à la diversité des micro-organismes présents dans les sols (Ponge, 2003). La MO active est constituée de résidus frais, de composés organiques intermédiaires et d'organismes, susceptibles d'être à tout moment décomposés. Cette fraction libère, sous l'effet des processus de décomposition et de minéralisation, une partie importante des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes.

La MO du sol, tout comme les organismes végétaux, animaux et microbiens dont elle est issue, est composée de chaînes et de cycles de carbone auxquels sont fixés d'autres atomes (azote, phosphore, soufre...). La MO étant principalement constituée de carbone (50% de carbone, 40% d'oxygène, 5% d'hydrogène, 4% d'azote et 1% de soufre), les termes « matière organique du sol» et « carbone organique du sol» sont souvent utilisés comme synonymes. Les concentrations les plus élevées en MO se trouvent dans les sols des régions tempérées et boréales au niveau des horizons organiques (O) et minéraux supérieurs sous-jacents (A). Etant donné leur faible épaisseur dans la plupart des sols par rapport aux horizons minéraux de profondeur (B et C), ces horizons de surface ne représentent toutefois qu'une petite partie du profil total des sols. Par conséquent, même si les concentrations en MO des horizons supérieurs sont largement plus élevées que celles des horizons profonds, ces derniers contiennent souvent la majeure partie du carbone organique (C_{org}) stocké dans les sols (Batjes, 1996). Dans les horizons minéraux de surface, 2 à 65% du C_{org} est contenu dans des particules de matière organique relativement jeunes peu ou non liées aux minéraux du sol. Cette MO dite « libre » peut être très rapidement dégradée par des processus de nature chimique ou biologique. Dans les horizons de profondeur, le C_{org} est largement associé à de fines particules minérales du sol qui le protége des processus de dégradation et présente par conséquent un turnover plus lent. Les horizons minéraux de profondeur s'avèrent être avec 40 à 50% du C_{org} d'importants lieux de stockage du carbone en milieux terrestres (Kaiser *et al.*, 2002).

1.3. Les différentes formes de carbone organique dans les sols

La litière végétale constitue la source principale de matériaux entrant dans la formation de la MOS. Les végétaux contribuent à abonder la MOS non seulement par des apports de surface (litière de surface) mais aussi par des apports de profondeur

(litière racinaire). La litière forestière de surface est principalement composée de feuilles et d'épines de résineux, les branches et les fruits ne représentant que 21% en forêt mixte et 20 à 40% en forêt de conifères. Les végétaux herbacés ne contribuent quant à eux qu'à moins de 5% en forêt tempérée (Kögel-Knabner, 2002). Dans les forêts naturelles, les débris de bois non ôtés représentent une proportion importante de la MOS. La contribution de la litière racinaire à la formation de la MOS dans les sols forestiers représente 20 à 30% selon les espèces considérées (caduques, conifères).

Selon Vogt *et al.* (1986), la proportion majeure des apports racinaires dans le sol est localisée dans les horizons A. De hautes quantités de résidus racinaires partiellement décomposés ont été trouvées en forêt (Preston, 1992), mais peu d'informations sont disponibles sur la quantité de nécromasse, l'apport de litière racinaire et le turnover des racines selon les espèces et les différents écosystèmes. La valeur moyenne de turnover la plus faible est celle du système racinaire de l'arbre avec 10% par an, les racines herbacées et les racines fines des arbres ayant des turnover de 53 et 56% par an (Gill & Jackson, 2000). Le C_{org} libéré par les racines vivantes (rhizodépôts) représente une bonne partie de l'apport carboné dans les sols, mais il existe peu de données car la plupart des exsudats sont rapidement consommés par les micro-organismes. Des techniques de marquage ont permis de quantifier les quantités de MOS apportées par rhizodéposition, mais essentiellement dans des sols agricoles (par période de végétation, 2.4 t C ha^{-1} pour le blé et 3.2 t C ha^{-1} pour l'orge) (Kuzyakov & Domanski, 2000).

La litière est un mélange complexe de composés organiques, essentiellement des polysaccharides et de la lignine, mais aussi des bio-polymères aliphatiques et des tannins. La composition et l'abondance relative de ces composants varient selon l'espèce et le type de tissu (Kögel-Knabner, 2002). Les tissus parenchymateux, au niveau des feuilles, du cortex des jeunes brindilles et des racines fines renferment essentiellement des protéines, des formes de stockage (amidon) et de la cellulose. Les tissus ligneux (xylèmes) et les tissus de soutien (sclérenchymes), au niveau de l'écorce, des tiges, des nervures et des épidermes foliaires, renferment quant à eux de la cellulose, de la pectine et essentiellement de la lignine (Roland & Roland, 2003). Même si la composition de la litière de résineux diffère largement de celle des feuillus, les composants majeurs de la litière restent les polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) et la lignine. Les estimations moyennes des principales formes de C_{org},

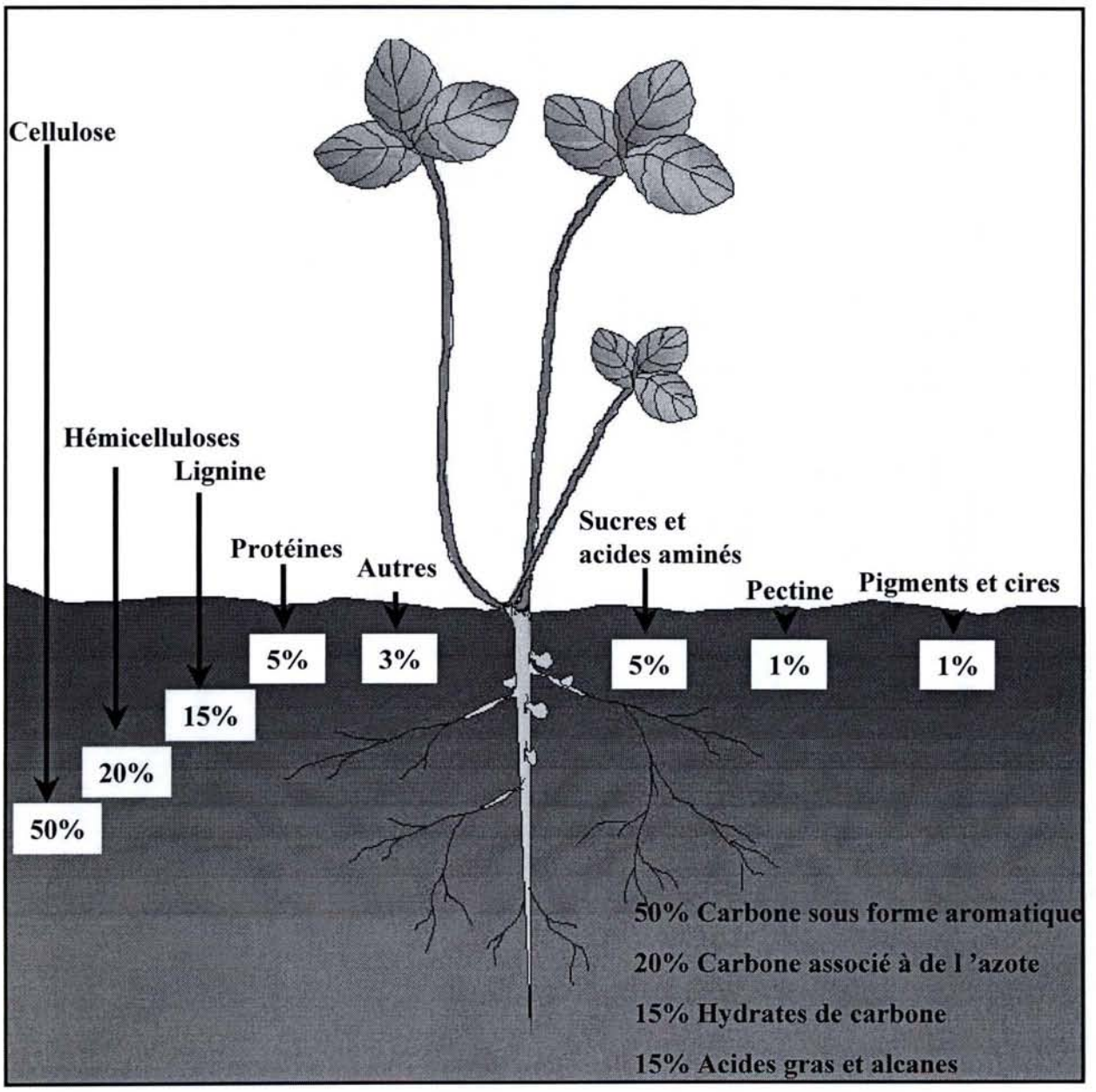


Figure 1. Les principales formes de carbone organique retrouvées dans le sol et celles entrant dans le sol en tant que résidus végétaux (d'après les données de Killham, 1994).

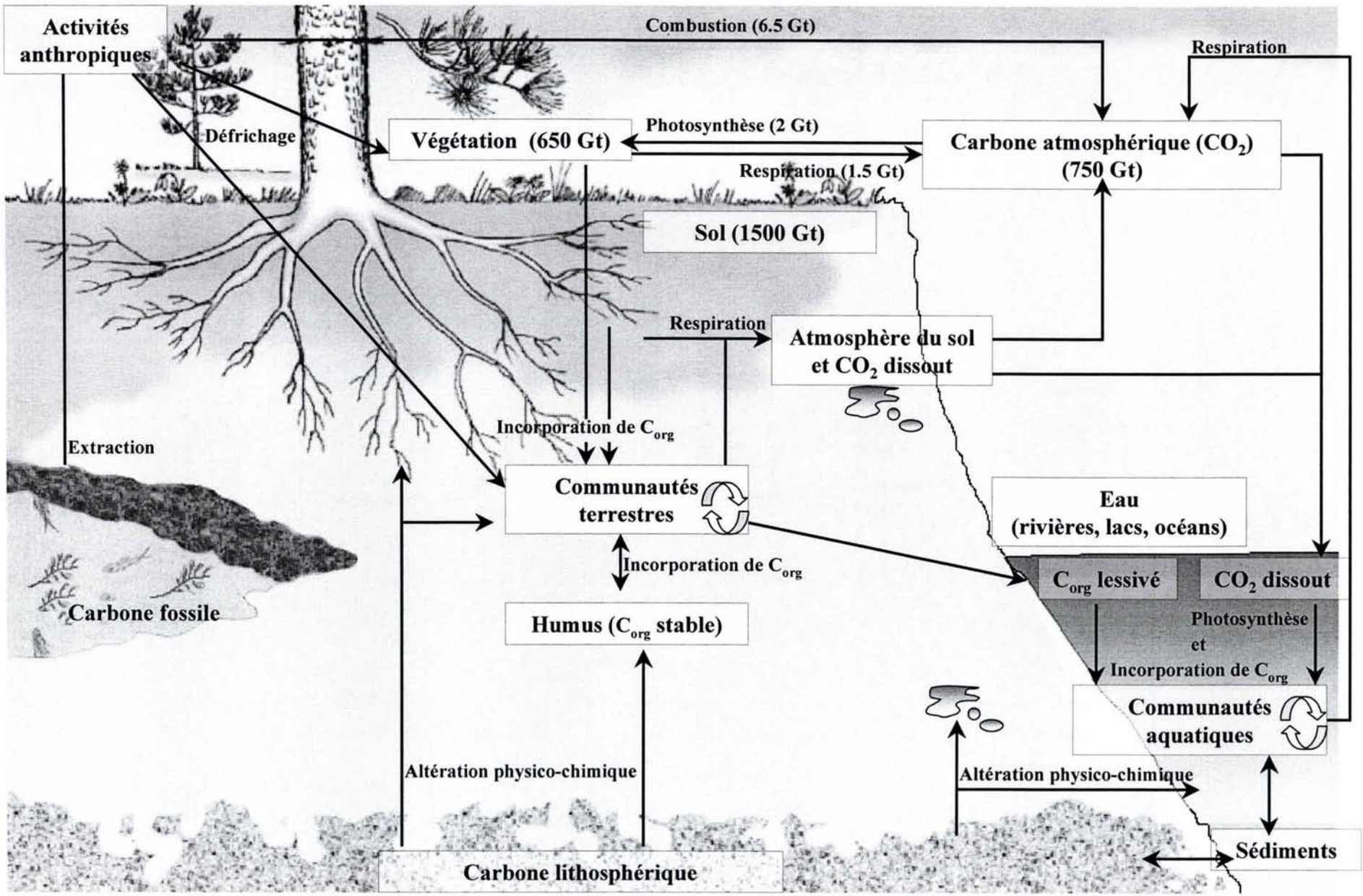


Figure 2. Le cycle du carbone (d'après Belong *et al.*, 1996).

entrant dans le sol en tant que résidus végétaux, sont indiquées dans la figure 1. Concernant les principales formes de carbone organique dans les sols, environ 50% se trouvent sous forme de composés aromatiques (polyphénols, lignine...), 20% sont associées à des molécules azotées (protéines...), alors que les 30% restantes se répartissent entre glucides, acides gras et alcanes (Fig. 1) (Killham, 1994).

Le carbone organique du sol existe sous plusieurs formes, mais trois principaux types peuvent être distingués : le carbone insoluble, le carbone soluble, et la biomasse. Le carbone insoluble représente plus de 90% du carbone organique total du sol, il inclue les principaux composants des parois végétales (cellulose et lignine), de l'exosquelette des animaux du sol et de la paroi fongique (chitine). Ce réservoir de carbone insoluble renferme également du matériel décomposé et polymérisé par les micro-organismes sous forme d'humus (Hättenschwiller & Vitousek, 2000). Le carbone soluble représente un substrat immédiatement utilisable par une large gamme de micro-organismes. Ce carbone est essentiellement produit par les racines végétales sous forme d'exsudats. Il s'agit également de composés organiques simples (monomères tel le glucose...) issus de la décomposition du carbone insoluble ou de la biomasse carbonée par les micro-organismes *via* la production d'enzymes oxydatives. Les concentrations de carbone soluble dans le sol sont très faibles car son assimilation est rapide, par conséquent cette fraction carbonée représente moins de 1% du carbone organique du sol. La biomasse carbonée du sol est essentiellement constituée par les végétaux et dans une moindre mesure par les micro-organismes et les animaux du sol. Cependant, l'activité de décomposition des micro-organismes saprotrophes ou saprophytes est le principal facteur responsable du turnover du carbone dans les sols. Toute la matière organique transite un moment ou à un autre par la biomasse microbienne. Cette biomasse du sol ne constitue alors que 1 à 2% du carbone organique total du sol, mais elle représente la force conductrice du cycle du carbone (Fig. 2) et également d'autres cycles de nutriments tel celui de l'azote ou du phosphore (Killham, 1994).

1.4. La fraction biotique, activités biologiques et fonctionnement des sols

1.4.1. Les racines et la rhizosphère

La biomasse racinaire, ainsi que l'espace occupé par les racines, varient selon le type de végétation présente et l'environnement exploité (Cadanell *et al.*, 1996 ; Jackson *et al.*, 1996). Environ 30, 50 et 75% de la biomasse racinaire totale se trouvent respectivement dans les 10, 20 et 40 premiers centimètres du sol (Jackson *et al.*, 1996). Cependant, la profondeur maximale pouvant être atteinte par les racines peut avoisiner 4.6 mètres (Jackson *et al.*, 1996). Le volume de sol colonisé par les systèmes racinaires, généralement de 1%, peut atteindre 5%. La morphologie, la longévité, l'activité et la composition du système racinaire sont également dépendantes des conditions environnementales et des espèces végétales (Roland & Roland, 2003). Cependant, la fonction principale de ces racines reste toujours la même, approvisionner la plante en eau et sels minéraux et l'ancrer au sol. Selon les besoins de la plante, la quantité des ressources mobilisées par les parties souterraines dépend de la longueur des racines impliquées dans l'absorption, de la distribution verticale des racines et des conditions imposées par le sol. Le caractère principal de tout système racinaire est son besoin considérable en oxygène, la respiration des racines peut ainsi représenter jusqu'à 30% de la respiration totale dans un sol (Kuzyakov & Domanski, 2000).

Le sol adjacent au système racinaire (ou rhizosphère) possède un cortège microbien bien plus dense que celui du sol dépourvu de racines. L'extension de la rhizosphère est très variable, cependant, elle est considérée être le cylindre de sol que les poils absorbants exploitent et dans lequel ils excrètent des exsudats affectant les populations microbiennes (Grayston *et al.*, 1996). Le sol rhizosphérique est différentiable du sol non rhizosphérique non seulement par sa flore microbienne mais aussi par ses propriétés physico-chimiques. En compressant le sol environnant, la croissance racinaire modifie largement les propriétés physiques de celui-ci. Les argiles et autres particules du sol se disposent alors parallèlement aux axes racinaires, dégageant un espace inoccupé autour de la racine. Des mouvements de circonvolution d'eau, de nutriments, de micro-organismes et même de la microfaune se créent dès lors en périphérie de la racine (Killham, 1994). Les résidus organiques végétaux libérés ont tendance à s'accumuler préférentiellement à proximité même des racines. Le

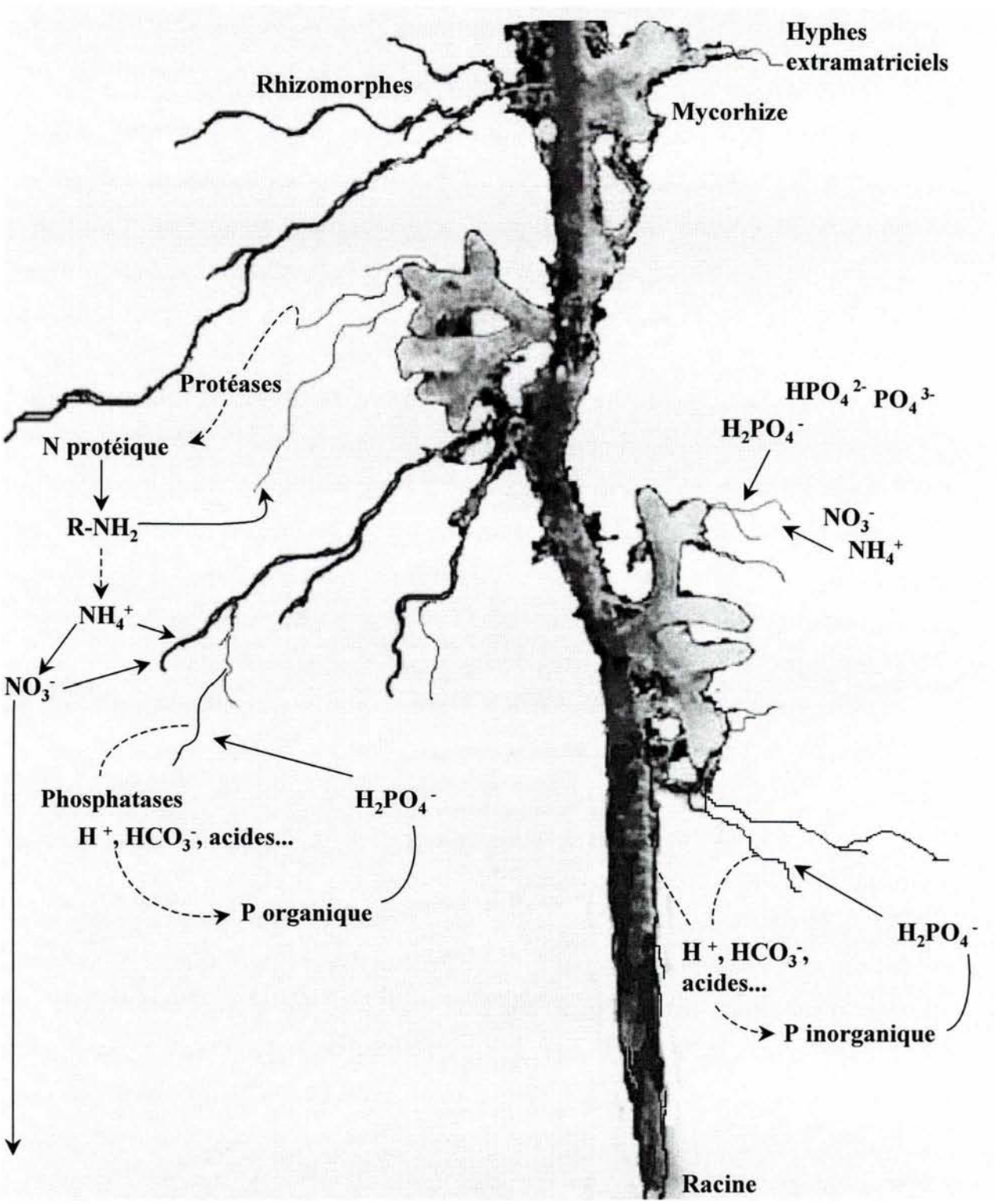


Figure 3. Représentation schématique du rôle joué par les champignons ectomycorhiziens dans la nutrition hydrominérale de la plante hôte (d'après les données de Marschner, 1995).

prélèvement d'eau par la plante engendre un potentiel hydrique plus faible au niveau de la rhizosphère, il en résulte un flux net de masse d'eau vers les racines ainsi qu'un gradient de nutriments.

La libération de substances carbonées (ou rhizodépots) et les prélèvements sélectifs d'ions de la solution du sol par le système racinaire modifient la nature chimique du sol adjacent (Marschner, 1995). Les plantes agissent comme de vraies pompes à carbone (C) en fixant et transformant le C atmosphérique (CO_2) en substances organiques dont une partie est excrétée par les racines. Les micro-organismes puisant largement dans cette source de carbone organique, les concentrations disponibles autour des racines sont donc limitées (Kuzyakov & Domanski, 2000). Le prélèvement sélectif d'ions de la solution aqueuse du sol par les racines provoque quant à lui l'accumulation de certains ions et une raréfaction d'autres. La rhizosphère est également le lieu de forts taux de dégradation minérale de par la sécrétion d'acides organiques (Drever, 1994 ; Marschner, 1995) (Fig. 3). Le prélèvement d'ions d'une part et la sécrétion d'acides organiques d'autre part ont pour effet de modifier considérablement le pH rhizosphérique (souvent acidification).

La rhizosphère est une zone d'interactions entre racines et organismes du sol, et plus particulièrement entre racines et micro-organismes. Les exsudats racinaires permettent en effet la prolifération des micro-organismes ce qui, par le jeu des interactions proies/prédateurs, favorise la prolifération de protozoaires (Holtze *et al.*, 2003). En marge des associations « indirectes » entre racines et certains micro-organismes, il existe des associations « directes », tels les mycorhizes ou les nodules, au sein desquelles les micro-organismes font partie intégrante de la racine (Smith & Read, 1997). Ces micro-organismes reçoivent un apport carboné en échange de nutriments. Les rhizobiums fixent de l'azote atmosphérique au bénéfice des végétaux associés (Mylona *et al.*, 1995 ; Long, 1996), alors que les champignons mycorhiziens (Fig. 3) augmentent plutôt l'apport en phosphore, azote et autres nutriments prélevés dans le sol (Gianinazzi-Pearson, 1996 ; Harrison, 1997 ; Smith & Read, 1997). Ces micro-organismes associés fournissent en outre promoteurs de croissance et protection phytosanitaire à la plante (Smith & Read, 1997). Au titre de la protection phytosanitaire, il peut être notamment citer celle contre les champignons pathogènes tels les *Fusarium*

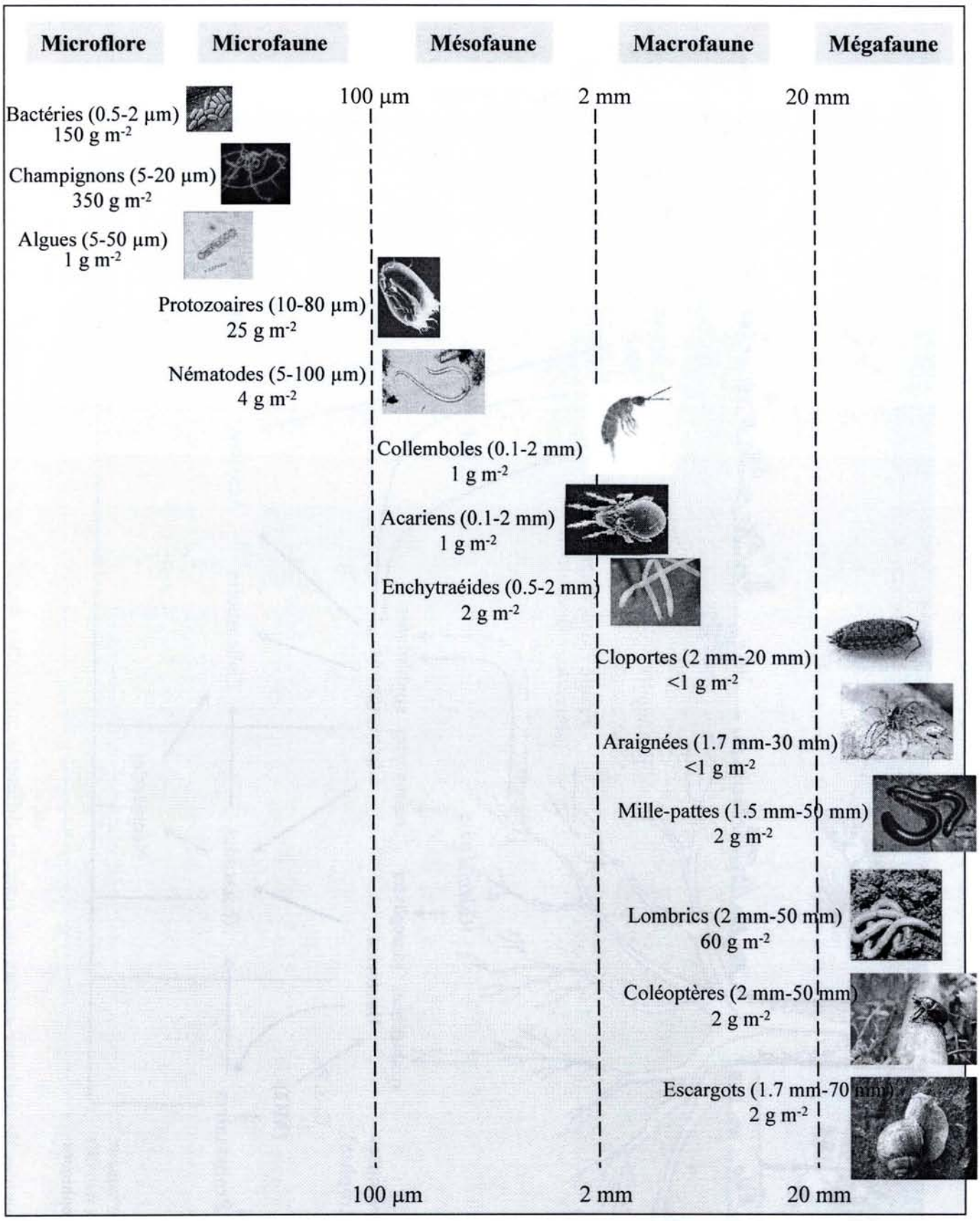


Figure 4. Classification des organismes du sol selon la taille moyenne de leur corps.

Sur cette figure sont également indiquées des valeurs de biomasse moyennes mesurées pour chaque organisme et exprimées en gramme de poids sec par mètre carré de sol (d'après Gisi *et al.*, 1997).

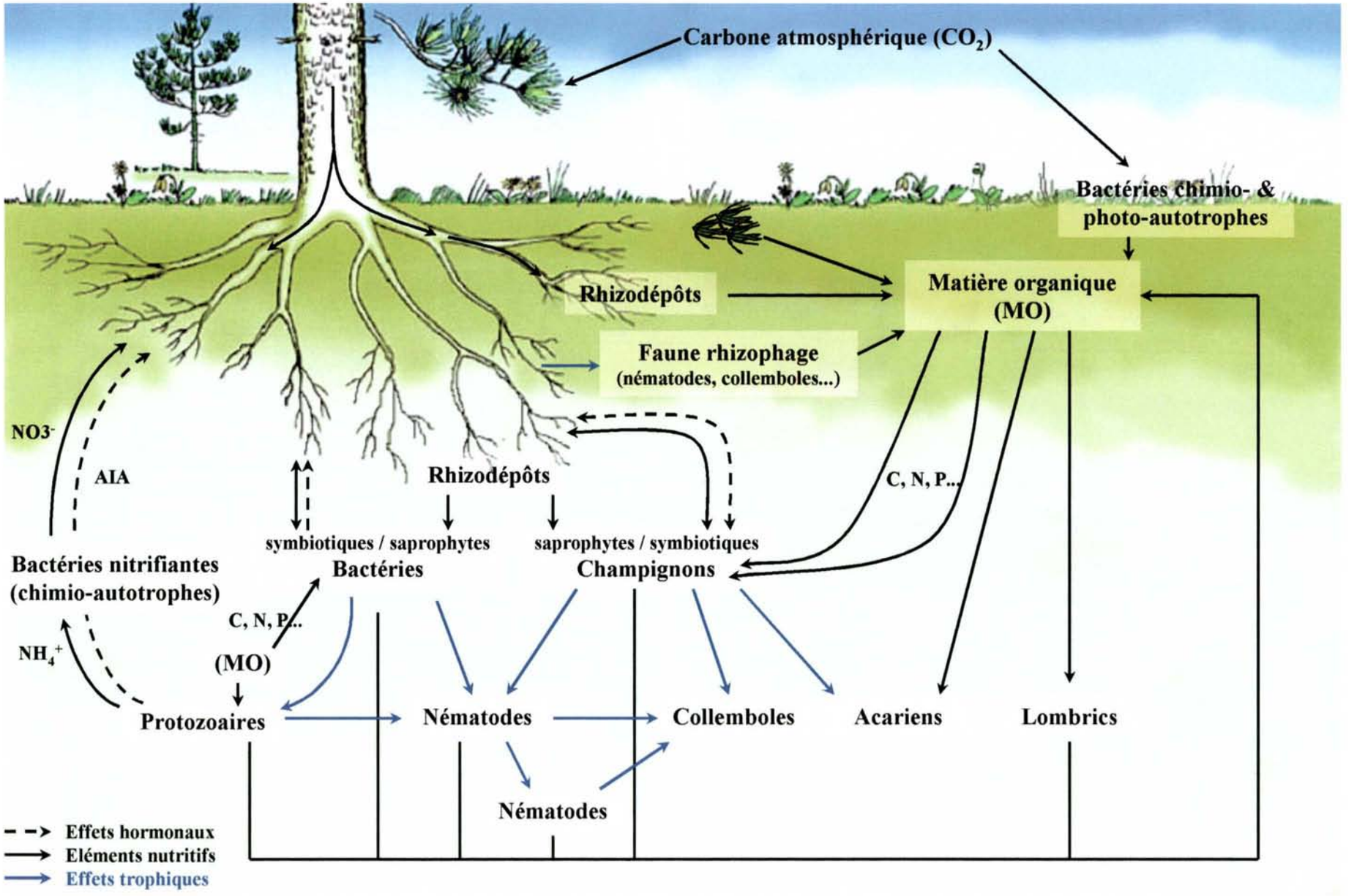


Figure 5. Exemples de quelques interactions entre les différents organismes du sol (d'après les données de Coûteaux & Darbyshire, 1998; Alphei, 1998; Edsberg, 2000; Bonkowski *et al.*, 2000 ; Bohlen *et al.*, 2002 et Prescott *et al.*, 2003).

qui provoquent la dégénérescence d'un bon nombre de plantes herbacées (Dugassa *et al.*, 1996) ou ligneuses (Sylvia & Sinclair, 1983).

1.4.2. Faune, microflore et qualité des sols

La qualité ou fertilité des sols répond de la facilité avec laquelle les racines peuvent, en quantités suffisantes, bénéficier dans ces sols des différents facteurs de croissance végétale (eau, nutriments, et substances organiques de croissances telles les hormones) (Chaussod, 1996). Une liste des différents processus biologiques et biochimiques se déroulant dans les sols et pouvant affecter la production végétale fut dressée par Waid en 1984. Celle-ci comprend de nombreux mécanismes directement liés à l'activité de la microflore des sols (bactéries et champignons) telles la décomposition des résidus (y compris xénobiotiques), la minéralisation de composés organiques (contenant de l'azote, du soufre, du phosphore et du carbone), la nitrification, la dénitrification et les associations symbiotiques (Waid, 1984).

La diversité et l'importance quantitative des organismes inféodés au sol sont considérables (Fig. 4). Ces organismes appartenant à la microflore ou à la faune du sol jouent un grand rôle dans la transformation de la MOS, dans l'édification des structures et donc dans le bon fonctionnement du sol par le biais d'interactions complexes (Fig. 5). La faune a principalement un rôle de régulation de la communauté des décomposeurs : bactéries et champignons. Ces derniers restent les agents principaux de la transformation de la MOS. En minéralisant la MOS, les décomposeurs libèrent dans les sols les éléments inorganiques nécessaires à la plante et possèdent donc un rôle prépondérant dans le cycle du carbone. Les champignons représentent en terme de biomasse et de nombre d'espèces la partie dominante de la microflore du sol des régions tempérées et boréales (Thorn, 1997). Leurs qualités physiques et surtout chimiques (Cf. section 2.2.) leur confèrent un rôle majeur dans les phénomènes dégradatoires des débris insolubles végétaux et dans le bon fonctionnement de l'écosystème. La compréhension du rôle des différents champignons est donc un élément clé dans l'étude du fonctionnement des sols.

1.4.3. Les organismes fongiques, structure et fonction

Bien qu'il existe des formes microscopiques unicellulaires (levures), ces organismes eucaryotes présentent généralement une morphologie mycélienne composée d'hyphes à cytoplasme souvent multi-nucléé. Les parois fongiques peuvent être de composition variée, mais elles contiennent en principe des polysaccharides tels la chitine, les glucanes, le chitosane, les mannoprotéines et les acides poly-glucuroniques ainsi qu'une proportion non négligeable de protéines et glycoprotéines (Carlile *et al.*, 2001). Un hyphe fongique avec 5 à 20 μm de diamètre présente des dimensions cellulaires bien plus importantes que celles des bactéries y compris les actinomycètes. Pour cette raison, les champignons pénètrent peu au sein des micropores du sol (Zvyagintsev, 1994).

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, vivant strictement en aérobie (à l'exception des levures qui peuvent survivre en conditions anaérobies), classés selon l'aspect de leur thalle et leurs structures de reproduction. Les Chytridiomycètes (*Allomyces*...) à hyphes pseudo-septés (cloisons occasionnelles) ont une reproduction asexuée par l'intermédiaire de zoospores mobiles et une reproduction sexuée par production de gamètes mobiles. Les Zygomycètes (*Mucor*...) et les Gloméromycètes (*Glomus*...) à hyphes aseptés (sans cloison) produisent des spores asexuées non mobiles contenues dans des sporanges et lors de leur reproduction sexuée les Zygomycètes forment des zygospores (Carlile *et al.*, 2001). Les Gloméromycètes sont des champignons endomycorhiziens ayant une grande importance dans la nutrition de la plupart des espèces herbacées terrestres et des arbres tropicaux (Smith & Read, 1997). Les Chytridiomycètes, les Zygomycètes et les Gloméromycètes tendent à exister sous forme de spores et à développer une structure mycélienne seulement en présence de substrat ou de racines hôtes dans le cas des Gloméromycètes. Les Ascomycètes, champignons à hyphes septés, forment des ascospores sexuées enfermées dans des structures appelées asques contenues dans des fructifications (ascocarpes) fermées (cleistothécies) ou ouvertes (apothécies). Certaines espèces apparaissent être uniquement asexuées comme *Cenococcum geophilum* (Jany *et al.*, 2002). Les Basidiomycètes, champignons à hyphes septés, forment des basidiospores sexuées par fragmentation ou bourgeonnement de structures appelées basides contenues ou non dans des fructifications (ou carpophores). Les espèces de champignons dits imparfaits ne

Tableau 1. Les différents types d'associations mycorhiziennes et leurs principales caractéristiques (d'après Selosse, 1998).

Type morphologique	**Endomycorhize « à arbuscules »**	**Ectomycorhize**	**Ectendomycorhize**	**Endomycorhize « à pelotons »**
Photobionte	Plus de 80% des Spermaphytes, la plupart des Ptéridophytes et des Bryophytes	Spermaphytes ligneux et de très rares Ptéridophytes	Spermaphytes (certains ligneux, certaines Ericales)	Spermaphytes (Ericacées, Orchidées) et certaines Ptéridophytes
Mycobionte	Non septés Gloméromycètes 200 à 500 espèces	Septés Ascomycètes et Basidiomycètes Minimum 5000 espèces	Septés Ascomycètes et Basidiomycètes Quelques espèces	Septés Ascomycètes (Ericoïdes) et moins de 100 espèces de Basidiomycètes (Orchidoïdes)
Structures fongiques	Arbuscules (suçoirs ramifiés intracellulaires) seulement ou vésicules et arbuscules	Manteau fongique autour de la racine et réseau de Hartig cortical strictement extracellulaire	Manteau fongique plus ou moins épais, réseau de Hartig et suçoirs (Monotropoïdes) ou pelotons (Arbutoïdes) intracellulaires	Hyphes et pelotons intracellulaires
Spécificité d'hôte	Aucune détectée	Nulle à forte selon le couple	?	?
Ancienneté	Dévonien	Crétacé (ou plus tardif ?)	Crétacé (ou plus tardif ?)	Crétacé (ou plus tardif ?)
Ressources exploitées par le mycobionte	Surtout phosphore inorganique soluble ou adsorbé et oligoéléments	Phosphore et azote organiques et/ou minéraux, solubles, insolubles ou adsorbés et oligoéléments	Peu connues et très variables Le mycobionte peut être parasite ou symbiotique d'un autre végétal (Monotropoïdes)	Phosphore et azote organiques parfois des glucides comme la cellulose
Localisation majeure	Tous les sols, sauf hydromorphes, sols tropicaux et tempérés essentiellement. Peu fréquent en sol boréal	Divers sols et horizons moyennement minéralisés, sols tempérés et boréaux parfois tropicaux	?	Sols à matière organique non minéralisée, sols boréaux et d'altitude surtout (Ericoïdes). Les Orchidoïdes sont ubiquistes

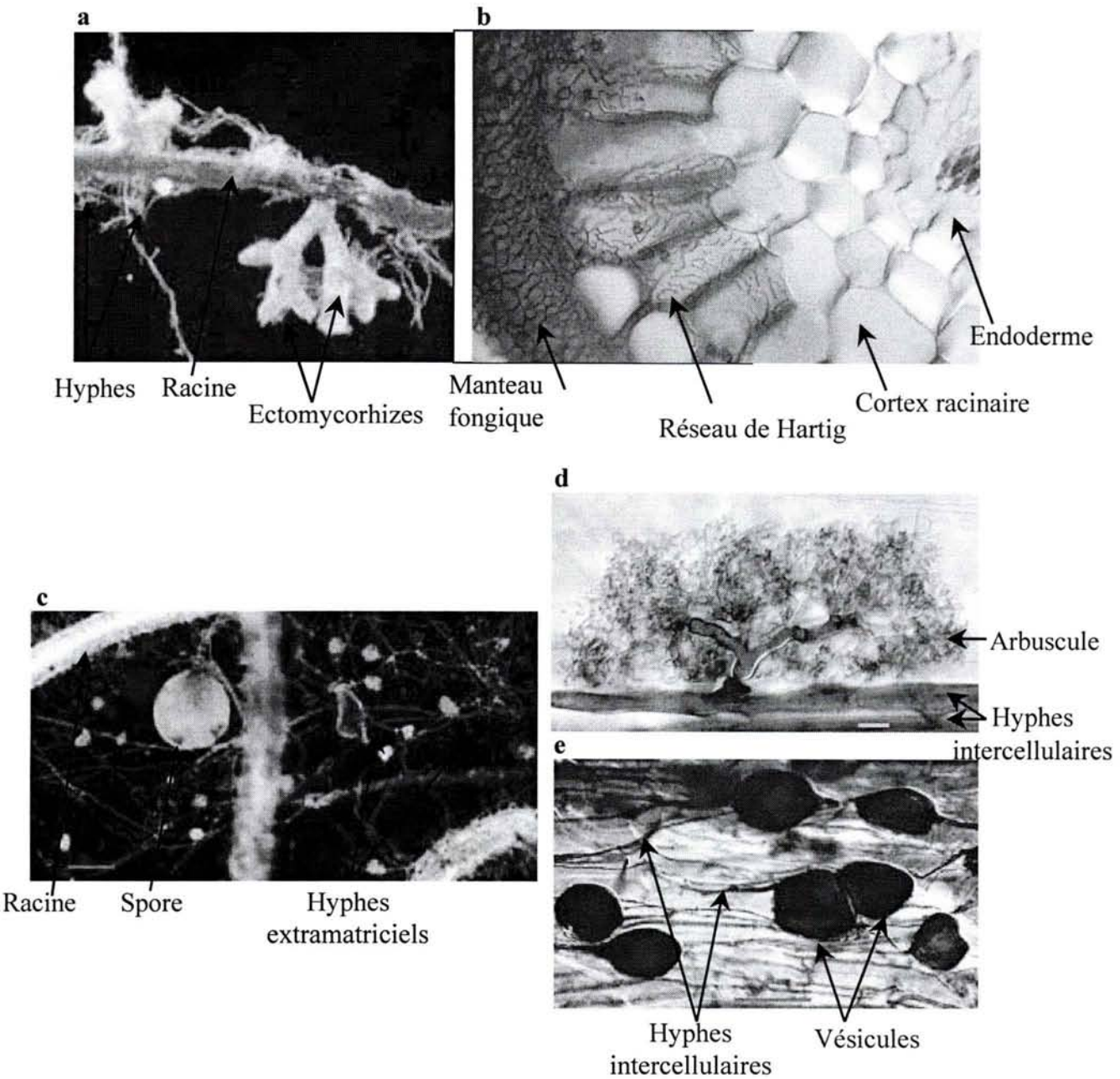


Figure 6. Structures endo- et ecto-mycorhiziennes (d'après Brundrett *et al.*, 1996).

a. Ectomycorhizes (x 12) nées de l'association entre *Pinus radiata* et *Suillus brevipes.*

b. Section transversale d'une ectomycorhize (x 540) de racine de peuplier (*Populus tremuloides*).

c. Hyphes extramatriciels produits par la germination d'une spore de *Gigaspora* utilisée lors de l'inoculation en pot d'un trèfle (échelle 100 µm).

d. Arbuscule mature de *Glomus mosseae* à l'intérieur d 'une cellule d'*Allium porrum* (échelle 10 µm).

e. Vésicules et hyphes intercellulaires de *Glomus* sp. dans une racine de poireau (échelle 100 µm).

présentent que des spores asexuées (conidies) portées par des hyphes particuliers, les conidiophores. Ils sont affiliés principalement aux Ascomycètes (*Aspergillus*, *Penicillium*) et plus rarement aux Basidiomycètes. Il est à noter que des formes unicellulaires (levures) existent à la fois chez les Basidiomycètes, les Ascomycètes et les Zygomycètes (Thorn, 1997).

Les champignons ont de nombreuses fonctions dans les sols. Ils peuvent être symbiontes ou pathogènes de végétaux ou d'animaux. Mais, l'un de leur plus grand rôle écologique reste celui de la décomposition de la MO effectuée notamment par les espèces dites saprophytes ou saprotrophes. Les champignons mycorhiziens du sol forment des associations mutualistes hautement différenciées avec les racines végétales. Les partenaires formant ces symbioses sont des espèces fongiques appartenant aux groupes des Basidiomycètes, Ascomycètes et Glomeromycètes et la plupart des végétaux vasculaires (Smith & Read, 1997). Il existe différents types d'interactions symbiotiques dites mycorhiziennes entre les champignons et les plantes vasculaires (Tableau 1), les plus répandues sont les endomycorhizes à arbuscules (AM) et les ectomycorhizes (ECM). Des endomycorhizes à arbuscules primitives ont permis aux plantes de sortir de l'eau et de s'adapter au milieu terrestre au cours du Dévonien (Brundrett, 2002). Par conséquent, les AM seraient non seulement le type mycorhizien le plus fréquent, mais aussi le plus ancien. Les endomycorhizes (AM) se rencontrent essentiellement chez les plantes herbacées, les bryophytes, les lycopodes, les arbres tropicaux et plus rarement chez les espèces ligneuses des régions tempérées (peuplier...) (Smith & Read, 1997). Les partenaires fongiques impliqués dans cette symbiose appartiennent aux Gloméromycètes (*Glomus*, *Gigaspora* et *Acaulospora*). Les hyphes de ces champignons franchissent les parois et repoussent la membrane plasmique des cellules hôtes sans la rompre pour former à l'intérieur des cellules corticales les arbuscules (les surfaces d'échange). Les vésicules considérées comme des structures de stockage se retrouvent, elles, entre et/ou dans les cellules (Fig. 6) (Peterson & Bonfante, 1994). Les bénéfices réciproques apportés aux deux partenaires sont proches de ceux existant dans la symbiose ectomycorhizienne.

La symbiose ectomycorhizienne qui existe depuis le tertiaire (Lepage *et al.*, 1997) est née de l'association « intime » entre certains Basidiomycètes ou Ascomycètes et des Spermaphytes ligneux phototrophes (Selosse & Le Tacon, 1999). Au sein de cet organe mixte qu'est l'ectomycorhize (Fig. 6), le champignon forme

autour de la racine un manchon ou manteau fongique d'où partent à la fois des hyphes extramatriciels qui explorent le sol et des hyphes « internes » qui s'insinuent entre les cellules, au niveau de la lamelle moyenne, pour former le « réseau de Hartig » (Kottke & Oberwinkler 1986, Massicotte *et al.*, 1990). Les champignons améliorent la nutrition hydrique et minérale de leur plante hôte en développant des hyphes extramatriciels relativement longs, de l'ordre de 500 à 1000 mètres de mycélium par mètre de racine (Rousseau *et al.*, 1994), en excrétant des protéases (Näsholm *et al.*, 1998 ; Gebauer & Taylor, 1999), phosphatases (Martins *et al.*, 1999) (Cf. Fig. 3) et autres exo-enzymes oxydatives telles les laccases (Chen *et al.*, 2003) qui accélèrent la minéralisation de la matière organique, très ralentie dans les régions tempérées et boréales du fait des fréquentes basses températures (Read & Moreno-Perez, 2003). De plus, il a été démontré que certains champignons peuvent, grâce à des protons et à des agents chélateurs comme l'oxalate, altérer les édifices cristallins (Jongmans *et al.*, 1997 ; Landeweert *et al.*, 2001) et jouer ainsi un rôle important dans la formation des podzols (van Breemen *et al.*, 2000). Des structures fongiques d'importance écologique dans les sols sont les rhizomorphes et cordons mycéliens. Ces agrégats filamenteux d'hyphes jouent un rôle dans le transport des nutriments, pour certains Basidiomycètes ectomycorhiziens, ils pourraient servir à l'approvisionnement en eau à la plante hôte. Les champignons ectomycorhiziens apportent également aux plantes hôtes une certaine protection contre les agressions biotiques. Ils constituent une barrière mécanique et physiologique contre les agressions des micro-organismes et des animaux pathogènes du sol (Stenström *et al.*, 1997 ; Brussaard, 1998).

La décomposition de la MOS est un important processus de recyclage des nutriments qui influence la production primaire des écosystèmes forestiers et agricoles. L'importance des organismes fongiques, et plus particulièrement des saprophytes, dans ces phénomènes de décomposition sera développée dans les paragraphes ci-dessous.

II. La dégradation de la matière organique dans les sols

2.1. Décomposition des différentes formes de carbone organique dans les sols

Les trois fractions de carbone organique (le carbone insoluble, le carbone soluble, et la biomasse), issues principalement des végétaux, sont soumises dans le sol à

des phénomènes de décomposition microbienne. Lorsque les résidus végétaux entrent dans le sol, ils subissent une phase de décomposition rapide (2/3 de la plupart des résidus végétaux sont généralement décomposés en un an) suivie par une phase de décomposition régulière plus lente. Ce phasage relève de deux facteurs. (1) Certains composants des résidus végétaux sont plus facilement décomposables que d'autres. (2) La formation de substances stables, après l'initialisation de la décomposition, empêche une attaque rapide par les micro-organismes. Le produit final de la décomposition complète de la MOS dans les sols est le CO_2. Pour cette raison la production de ce gaz fut souvent utilisée comme mesure des taux de décomposition (Verschoor, 2002 ; Tiunov & Scheu, 1999, 2000). Cependant pour cause de surestimations liées à la respiration racinaire, de nombreuses études portant sur les phénomènes de décomposition ont plutôt mesuré la libération d'azote ^{15}N à partir de litières marquées (Zeller *et al.*, 2001).

2.1.1. Décomposition des composants facilement dégradables

Les composants facilement dégradables correspondent essentiellement aux matériaux de stockage intracellulaires (protéines, acides aminés, amidon...) et aux exsudats racinaires. Les exsudats racinaires sont des mélanges complexes composés d'acides organiques anioniques, de phytosidérophores, de sucres, de vitamines, d'acides aminés, de purines, de nucléosides, d'ions minéraux (HCO_3^-, OH^-, H^+), de molécules gazeuses (CO_2, H_2), et d'enzymes (Dakora & Phillips, 2002). Ces exsudats, facilement dégradables par les micro-organismes, sont une importante source de carbone et d'énergie pour toute la communauté microbienne du sol (bactéries, champignons pathogènes, saprophytes ou symbiotiques) qui se développe rapidement et abondamment au niveau de la rhizosphère. Ceci conduit à une forte compétition dans cette zone pour les sols pauvres en nutriments (sols naturels des régions boréales et tempérées) (Dakora & Phillips, 2002). La persistance de ces exsudats dans le sol est faible étant donné la vitesse à laquelle ils sont utilisés par les micro-organismes. Le taux d'exsudation est fortement augmenté par la présence des micro-organismes dans la rhizosphère, cependant, l'exsudation de certaines molécules est largement dépendante du statut nutritif de la plante. Par exemple, l'excrétion d'acides organiques se produit essentiellement lors d'un déficit en phosphate et en fer de la plante (Jones & Darrah, 1994).

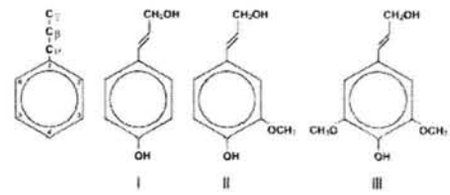
Les exsudats ne servent pas seulement de source de carbone pour la croissance microbienne, mais ils jouent un rôle de médiateurs dans la décomposition et dans l'acquisition de minéraux (Dakora & Phillips, 2002). En effet, ils renferment des enzymes extracellulaires (phosphatases, laccases...) capables d'hydrolyser certaines molécules organiques du sol et de mobiliser ainsi des nutriments minéraux tel le phosphate. Ces enzymes s'ajoutent à celles produites par les bactéries et les champignons rhizosphériques augmentant ainsi le potentiel hydrolytique globale et la minéralisation de la MOS. Ces exsudats renferment également des acides organiques (acide acétique, acide oxalique...), des composés phénoliques et des phytosidérophores qui en provoquant une certaine altération physico-chimique des minéraux du sol libèrent et solubilisent quelques nutriments. Les acides organiques solubilisent et rendent disponibles par chélation des éléments tels le fer et le manganèse contenus dans les oxydes respectifs. Les phénols solubilisent essentiellement le fer et le phosphore et d'autres nutriments tel l'aluminium. Les phytosidérophores solubilisent le fer (plus efficacement que les phénols), le manganèse, le cuivre et le zinc (Dakora & Phillips, 2002). Les plantes excrètent enfin des molécules signal (flavonoïdes...) attirant les micro-organismes symbiotiques tels les bactéries fixatrices d'azote ou les champignons endo- et ectomycorhiziens qui accélèrent et améliorent la dégradation physico-chimiques de la MO et des minéraux primaires contenus dans les sols par des processus similaires ou plus complexes mais effectifs (Landeweert *et al.*, 2001).

2.1.2. Décomposition des composants difficilement dégradables

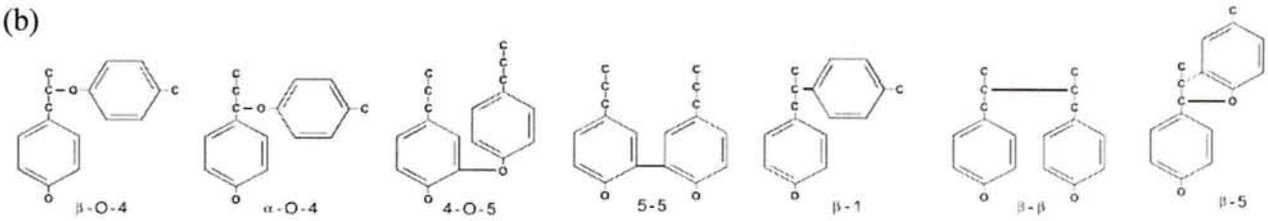
La cellulose et les hémicelluloses

La décomposition de la cellulose, comme beaucoup d'autres polymères organiques de nature complexe, débute par une première dépolymérisation (Kögel-Knabner, 2002). Celle-ci est effectuée par des organismes saprophytes cellulolytiques, possédant les cellulases nécessaires, comme des champignons tels *Fusarium*, *Trichoderma*, et *Penicillium* et des bactéries telles *Bacillus*, *Pseudomonas*, et *Clostridium* (Eubactéries). Les sous-unités simples formées servent alors de substrats pour une plus large gamme de micro-organismes. Finalement, le glucose issu de ces

(a)



(b)



(c)

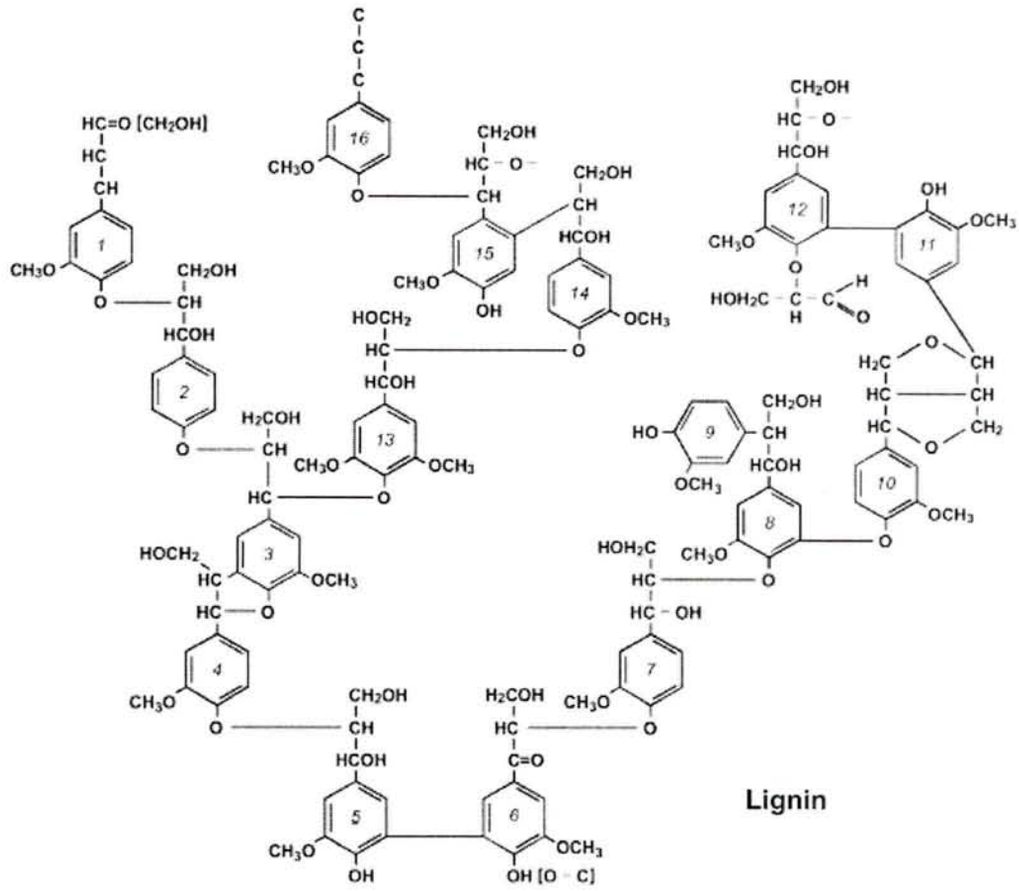


Figure 7. La lignine (d'après Kögel-Knabner, 2002).

a. Structure des trois précurseurs de la lignine (I) alcool coumarique, (II) alcool coniférique, (III) alcool sinapique.

b. Structure des principales liaisons formées entre les unités composant la lignine.

c. Structure de la lignine chez l'épicéa.

étapes de décomposition, alimentant le carbone soluble du sol, sert de substrat pour tous les micro-organismes hétérotrophes du sol.

La décomposition des litières forestières implique des activités cellulolytiques considérables. Cependant, la cellulose souvent emprisonnée dans une matrice d'hémicelluloses recouverte d'une gaine de lignine est protégée des attaques microbiennes (Kögel-Knabner, 2002). Elle n'est exposée aux enzymes cellulolytiques qu'après attaque de la lignine par des organismes fongiques présentant les activités ligninolytiques adéquates. Comme la cellulose, les hémicelluloses sont dépolymérisées par des bactéries et des champignons spécialisés. Cependant, ces activités cellulolytiques sont dues en grande partie aux champignons à pourriture brune, présents dans les sols, qui dégradent relativement rapidement les molécules de cellulose et d'hémicelluloses.

La lignine et autres composés phénoliques

La structure aléatoire de la lignine (Fig. 7) et les liaisons fortes formées (C-O-C et C-C entre 2 noyaux phénol ou entre 2 chaînes de propane) entre les sous unités fait de la lignine un composé très résistant aux processus microbiens de décomposition (Kögel-Knabner, 2002). Pour cette raison la proportion de carbone sous forme de lignine dans les sols tend à augmenter avec le temps. La décomposition de la lignine se fait en trois étapes, (1) l'estérification des groupes méthoxyles apparents, (2) un processus de dépolymérisation, et (3) la rupture des groupes phénoliques après suppression des chaînes extérieures. La dépolymérisation, impliquant le clivage des liaisons entre les sous unités, est catalysée par l'action d'enzymes extracellulaires. Beaucoup de micro-organismes du sol sont capables de dégrader certaines des molécules aromatiques contenues dans la lignine, mais seul un nombre restreint d'entre eux semble susceptible de décomposer complètement la lignine. Les organismes fortement dégradeurs de lignine sont essentiellement des champignons Basidiomycètes et plus particulièrement les champignons à pourriture blanche peu présents dans les sols (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Ceriporiopsis subvermispora, Phlebia radiata*...) qui produisent des enzymes spécialisées telles les estérases (Sethuraman *et al.*, 1998), les laccases (Youn *et al.*, 1995) et les peroxydases (Vares *et al.*, 1995). Les champignons à pourriture brune induisent quant à eux des changements dans la structure de la lignine sans jamais la dégrader (Ejechi *et al.*, 1996).

Tableau 2. Quelques enzymes fongiques hydrolysant des polymères (d'après Carlile *et al.*, 2001).

Substrat	Enzyme
Arabinose (Arabinanes)	Arabinofuranosidases
Callose	1→3 Glucanases
Cellulose	Endoglucanases, cellobiohydrolases
Chitine	Chitinases
Cutine	Cutinases
ADN	Désoxyribonucléases
Hémicelluloses	Hémicellulases
Lignine	Lignine peroxydases, laccases
Mannose (Mannanes)	Mannanases
Pectine	Pectine méthylestérases, polygalacturonases
Protéines	Protéinases
ARN	Ribonucléases
Amidon	Amylases
Xylanes	Xylanases

Les polyphénols tels les tannins, les quinones, et les acides humiques ou fluviques peuvent se lier et former des complexes difficilement dégradables avec des composés organiques riches en azote et en carbone (protéines, acides nucléiques, chitine...). Les polyphénols protégent ainsi ces composés facilement dégradables des attaques enzymatiques en diminuant leur accessibilité (Bending & Read, 1997). Le pourcentage de polyphénols complexés à des protéines varie selon les espèces, il est de 36 chez *Pinus*, de 41 chez *Betula* et de 74 chez *Fagus*. Les quantités de phénols libérés dans les sols varient également selon les espèces. Elles sont beaucoup plus importantes dans les litières d'arbres à feuilles caduques que dans les litières de résineux. Les polyphénols, tout comme la lignine, sont essentiellement minéralisés par les peroxydases, les laccases et autres phénol-oxydases fongiques telles les tyrosinases (Bending & Read, 1997).

2.2. Le rôle primordial des champignons dans la décomposition

2.2.1. Forte capacité dégradatrice des débris insolubles

Une grande variété d'enzymes extracellulaires est produite par les champignons autorisant la dégradation de presque toutes les macromolécules existantes (Tableau 2). Cependant, les champignons diffèrent par leur équipement enzymatique qui peut être caractéristique du groupe ou de l'espèce. Bien qu'étant tous hétérotrophes pour le carbone, ils varient de par leur capacité à utiliser telle ou telle substance. La dégradation résulte alors de l'intervention de plusieurs espèces fongiques (Carlile *et al.*, 2001). Il est important de rappeler ici que les Basidiomycètes présentant jusqu'à présent la plus forte capacité à dégrader le bois et donc la lignine sont les agents des pourritures blanches. Ces champignons dégradent la lignine grâce à la synthèse d'exo-enzymes oxydatives telles les lignine peroxydases (LiP, EC 1.11.1.14), les peroxydases à manganèse (MnP, EC 1.11.1.13) et les laccases (EC 1.10.3.2). Le Basidiomycète dégradeur du bois le plus étudié est *Phanerochaete chrysosporium*. Il fut longtemps considéré comme produisant uniquement des LiPs et des MnPs, cependant il a été démontré qu'il excrétait aussi des laccases mais uniquement lorsqu'il était cultivé sur des milieux contenant de la cellulose et du tartrate d'ammonium (Srinivasan *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré que les types d'enzymes produites en milieux naturels différaient souvent de celles

excrétées sur milieux synthétiques (Janse *et al.*, 1998). Par conséquent, il est possible que les profils d'enzymes connues chez d'autres champignons ligninolytiques reflètent les milieux où ils sont mis en culture plus qu'un réel potentiel enzymatique. Les champignons impliqués dans la dégradation ligninolytique ont fait l'objet d'études physiologiques en laboratoire (Eggert *et al.*, 1997 ; Vares *et al.* 1995). Il s'agit essentiellement de champignons comestibles cultivés tel *Agaricus bisporus* (Bonnen *et al.*, 1994), ou utilisés dans l'industrie du papier tel *Trametes versicolor* (Archibald *et al.*, 1997) ou encore de pathogènes d'arbres tel *Armillaria mellea* (Curir *et al.*, 1997). Dans ce contexte, peu de choses sont connues sur les champignons responsables de la dégradation de la lignine dans la litière des sols.

Or, les Basidiomycètes saprophytes colonisant les sols et dégradant la litière possèdent des capacités ligninolytiques importantes (Peláez *et al.*, 1995 ; Gramss *et al.*, 1998). Le manque d'informations sur l'importance de ces champignons et de leurs enzymes dans la dégradation de la litière est en partie lié à l'impossibilité de les isoler en culture pure. En effet, le nombre de Basidiomycètes saprophytes cultivables reste faible même si l'utilisation de milieux sélectifs a considérablement amélioré les taux d'isolation (Thorn *et al.*, 1996). Les capacités ligninolytiques des champignons leur permettent d'acquérir le carbone et l'énergie nécessaires retenus dans la fraction importante des sols que sont la lignine et les polyphénols. Mais surtout, la dégradation de la lignine leur permet d'accéder à d'autres sources de carbone comme la cellulose et aux sources limitées d'azote que sont les protéines et les acides nucléiques protégés par les composés phénoliques (lignine ou autre). Les saprophytes acquièrent, par conséquent, non seulement carbone mais aussi azote et autres nutriments nécessaires à leur développement à partir des débris organiques contenus dans les sols. Ces débris organiques sont leur seule source de carbone contrairement aux champignons ECM qui reçoivent principalement leur carbone de la plante hôte (Smith & Read, 1997).

Pendant longtemps, il y eut une très nette séparation entre les deux groupes fonctionnels que sont les champignons saprophytes et les champignons symbiotiques. Les espèces fongiques saprophytes étaient considérées comme les seules pouvant dégrader les substances organiques complexes du sol, alors que les champignons mutualistes étaient considérés comme absorbant les ions minéraux libérés par ces décomposeurs. Or, de récentes études ont montré que les champignons mycorhiziens,

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

notamment les ECM, présentaient la capacité de dégrader des résidus organiques tels la lignine et autres composés phénoliques afin de libérer et de mobiliser l'azote (N) et le phosphore (P) nécessaire au bon fonctionnement de la plante hôte (Bending & Read, 1997). Cette capacité est certes moins importante chez les mycobiontes des ECM et des mycorhizes Ericoïdes testés que chez les saprophytes, mais elle est suffisante pour dégrader significativement la lignine et pour permettre aux hyphes et aux enzymes d'accéder aux sources de N et P (Bending & Read, 1997). Les études phylogénétiques réalisées par Hibbett *et al.* (2000) indiquent que les symbiontes mycorhiziens ont évolué à partir d'ancêtres saprophytes et qu'il y eut également des retours à l'état saprophytique.

La capacité à dégrader les résidus organiques phénoliques est liée à la production d'enzymes oxydatives que sont les cellulases, les xylanases, les tyrosinases, les peroxydases et les laccases (Read & Perez-Moreno, 2003 ; Gramss *et al.*, 1998). Même si les capacités à dégrader les résidus organiques semblent plus faibles pour les espèces ectomycorhiziennes testées, leur prédominance dans les sols forestiers devrait en faire des acteurs non négligeables dans la dégradation de la litière. Un groupe d'enzymes oxydatives qui devrait jouer un rôle prépondérant dans la dégradation des résidus organiques est celui des laccases. En effet, elles sont non seulement nécessaires à certains saprophytes pour dégrader complètement la lignine (Eggert *et al.*, 1997) mais elles ont aussi été détectées à la fois chez des champignons pathogènes, des saprophytes et des mycorhiziens au niveau protéique et génique (Wahleithner *et al.*, 1996 ; D'Souza *et al.*, 1996 ; Scherer & Fischer, 2001; Chen *et al.*, 2003).

2.2.2. Les successions fongiques dans les phénomènes de dégradation

Beaucoup d'études sur les successions de champignons au cours des phénomènes de dégradation ont été publiées (Frankland, 1998 ; Rosenbrock *et al.*, 1995). Cependant l'accent est habituellement mis sur l'identification taxonomique plutôt que sur la diversité enzymatique. Les genres les plus fréquemment mentionnés en tant que colonisateurs précoces des débris organiques dans les zones tempérées sont *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* et *Epicoccum*. Des liens entre succession fongique et potentiel enzymatique des champignons ont été observés lors des processus de décomposition de litières forestières (Rosenbrock *et al.*, 1995 ; Kjøller &

Struwe, 2002). Kjøller & Struwe (2002) montrent que lors de la dégradation des feuilles de hêtre les espèces fongiques des genres *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* et *Alternaria* apparaissent en premier, bien que *Mucor*, *Phoma*, et *Acremonium* soient souvent des colonisateurs précoces. Le rôle principal d'*Acremonium* dans les phases initiales de décomposition est de dégrader la pectine et l'amidon. La seconde vague de décomposeurs fongiques est constituée par une plus large variété de genres (*Cylindrocarpon*, *Phialophora*, *Phoma*, *Phomopsis*...). Ces champignons modifient ponctuellement leur production d'enzymes et sécrètent selon le cas cellulases, polygalacturonases, xylanases, lipases ou protéases. Le troisième groupe de décomposeurs, qui intervient lorsque la litière est presque complètement dégradée, hydrolyse cellulose, lignine et chitine (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium*, et *Mortierella*). Lors de la phase finale de la décomposition, les souches de *Mortierella* représentent jusqu'à 28% des isolats. Toutes les souches sont susceptibles de dégrader la chitine alors que peu semblent capables d'attaquer la pectine ou la cellulose (Kjøller & Struwe, 2002). Lors de l'étude de la phase initiale de dégradation de la litière d'aulnes glutineux, Rosenbrock *et al.* (1995) démontrent que la litière est colonisée par une flore comprenant les genres *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria* et *Epiccoccum*. Flore qui est ensuite remplacée par des espèces appartenant essentiellement au genre *Fusarium*.

Même si toutes ces études portant sur les successions fongiques au cours de la dégradation ne peuvent être facilement comparées pour cause d'utilisation de différents types de litières et de différentes méthodes d'isolation, quelques aspects généraux peuvent en être dégagés. Peu de temps après la chute des feuilles, celles-ci sont très vite colonisées par un faible nombre d'espèces fongiques colonisatrices de stades précoces qui utilisent essentiellement le matériel soluble disponible comme les acides aminés ou les sucres. Leur manque d'enzymes nécessaires à la dégradation de la cellulose, de la lignine et de la chitine en font des « champignons à sucre » (*Mucor*, *Rhizopus*...). Ces champignons appartiennent le plus souvent aux embranchements des Zygomycètes et des Deutéromycètes (champignons dits imparfaits) (Carlile *et al.*, 2001). Les ressources facilement dégradables consommées, ces populations sporulent, régressent et disparaissent. Les substances qu'ils utilisent ayant une durée de vie très limitée dans les écosystèmes naturels, il est tout à fait compréhensible que ces champignons tendent à se développer très vite et à sporuler. Ces champignons pionniers à grand pouvoir

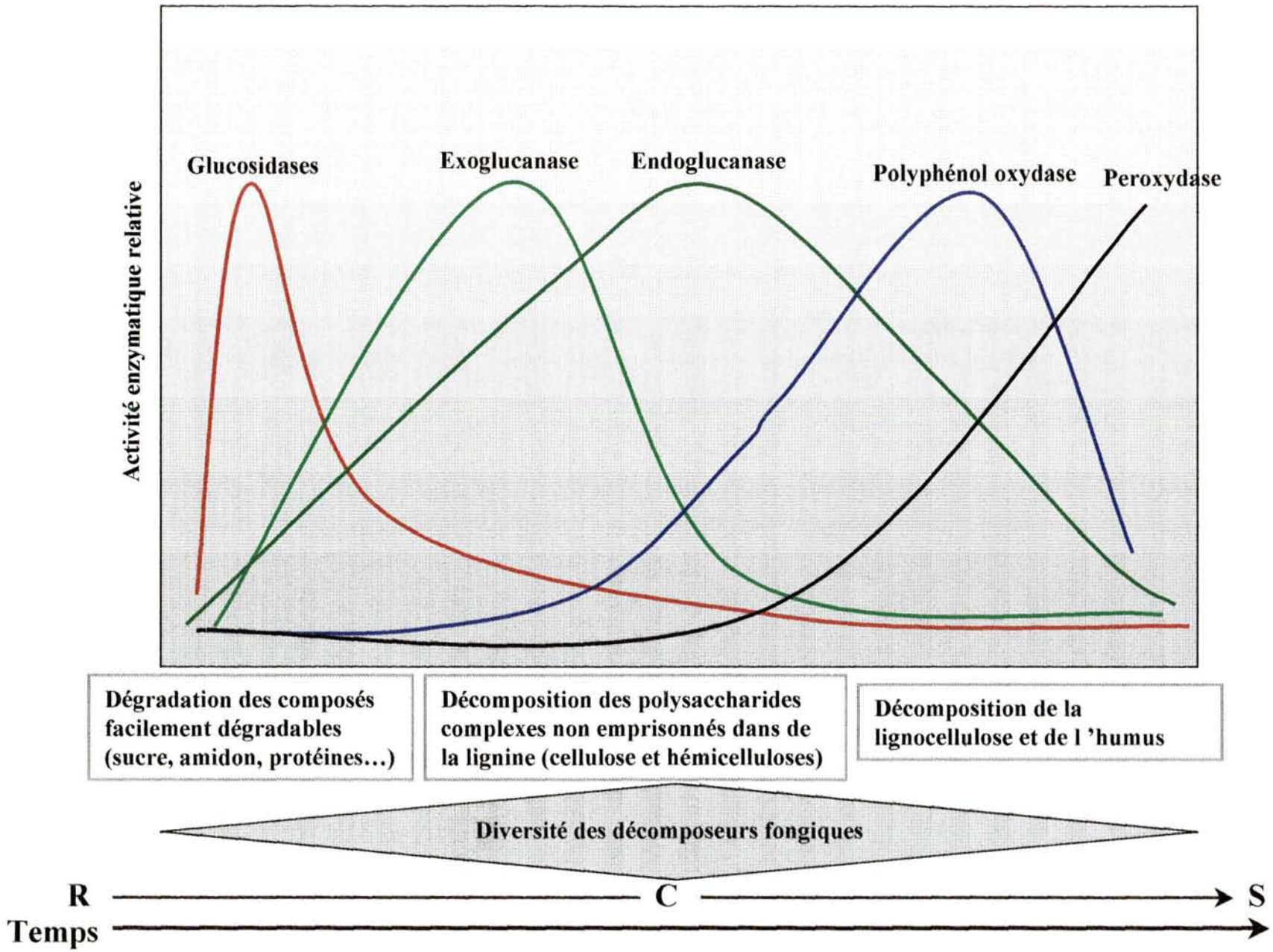


Figure 8. Successions fongiques et distribution hypothétique des activités enzymatiques relatives au cours du temps lors des phénomènes de dégradation de la litière (d'après les données de Frankland, 1998 et Sinsabaugh *et al.*, 2002).

reproducteur et à faible durée de vie ont une stratégie de type rudérale (R) leur permettant de coloniser rapidement des substrats encore vierges et d'éviter ainsi toute compétition.

Cette consommation rapide des sucres et d'autres composés facilement dégradables est suivie par des phénomènes de dégradation moins rapides. Ces derniers impliquent tout d'abord l'intervention d'une foule d'espèces fongiques spécialisées capables de vivre en condition de forte compétition sur une litière encore riche en nutriments. Ces espèces possédant une stratégie écologique de type compétitive (C) sont progressivement remplacées par un nombre plus restreint de champignons de plus en plus spécialisés qui possèdent des tolérances aux stress de plus en plus importantes (S) (Grime, 1977 ; Frankland, 1998). Ces derniers champignons possèdent la batterie enzymatique nécessaire pour dégrader la cellulose, la lignine et/ou la chitine. Il s'agit pour la plupart d'Ascomycètes ou de Basidiomycètes (*Fusarium*, *Mycena*...). Les utilisateurs de lignocellulose à croissance plus faible restent actifs dans les écosystèmes ayant atteints les limites de leur capacité à supporter de nouvelles populations. Ces champignons ont donc une stratégie de type (S). Ces phénomènes de succession sont liés à des modifications de milieux qui entraînent la disparition et l'apparition d'espèces. Les modifications apportées par une espèce donnée provoquent sa disparition (inhibition) et favorisent l'apparition d'une nouvelle (facilitation).

En résumé, sur des sources vierges riches en nutriments (litière ou autre source de MO) les espèces pionnières de type (R) sont rapidement remplacées par une foule d'espèces en compétition forte (C) puis par des espèces de stade tardif (S) adaptées dans l'utilisation de substrats pauvres. La succession de champignons décomposeurs semble refléter leurs potentiels enzymatiques, soit apparition furtive de champignons à sucre dépourvus de systèmes enzymatiques complexes suivie de l'intervention de champignons cellulolytiques, nombreux dans la nature, finalement remplacés par les champignons ligno-cellulolytiques plus rares (Fig. 8). Cependant, ce genre de succession peut être discuté car dans la nature toute nouvelle source de nutriment est rarement vierge de tout organisme fongique (Carlile *et al.*, 2001).

Afin de comprendre le rôle joué par les champignons ou plus particulièrement par un groupe de champignons dans les processus de dégradation et de séquestration de la MOS, il apparaît nécessaire d'étudier la diversité génétique et fonctionnelle de ces micro-organismes du sol.

III. Etude de la diversité génétique et fonctionnelle des communautés fongiques

3.1. Outils permettant l'étude de la structure génétique des communautés fongiques

L'étude de la structuration génétique d'une communauté fongique vise à déterminer non seulement la structure spatiale mais aussi la dynamique des espèces ou des populations la composant (Horton & Bruns, 2001). L'unité de base étant les individus (clones ou génets), autrement dit des organismes caractérisés sur la base de leurs génotypes, les groupes d'individus d'une même espèce proches dans le temps et l'espace définissent les populations. Un ensemble de populations de plusieurs espèces coexistant dans un même environnement ou un même écosystème définit quant à lui la communauté (Belong *et al.*, 1996).

Concernant les communautés fongiques du sol, les informations écologiques les plus détaillées concernent les populations de champignons ectomycorhiziens (Dahlberg, 2001), de champignons pathogènes (Prospero *et al.*, 2003), de champignons saprophytes colonisant le bois et plus particulièrement les Basidiomycètes responsables de sa décomposition (Vainio & Hantula, 2000).

3.1.1. Les carpophores donnent une image biaisée des communautés

Jusqu'au milieu des années 90, les connaissances sur la structure et la dynamique au cours du temps et de l'espace des communautés fongiques du sol, et/ou des populations qui les composent, furent exclusivement basées sur l'étude des carpophores (Hintikka, 1993 ; Renvall, 1995). De nombreux auteurs y ont encore recours aujourd'hui (Bergemann & Miller, 2002 ; Abesha *et al.*, 2003), car non seulement il s'agit là de la seule méthode permettant d'établir des comparaisons entre nouveaux et anciens relevés, mais elle possède aussi de nombreux autres avantages. Il s'agit d'un relevé facile a effectué et peu destructif. De plus, l'identification est assez simple compte tenu du fait que la plupart, voir la totalité, des espèces sont décrites selon les aspects morphologiques de leurs carpophores.

Cependant, des études comparatives récentes réalisées sur les champignons ECM montrent que les carpophores ne reflètent pas parfaitement les populations fongiques souterraines (Gardes & Bruns, 1996a ; Dahlberg *et al.*, 1997 ; Jonsson *et al.*, 2000). Bien que quelques espèces telles *Amanita francheti* (Redecker *et al.*, 2001) ou *Hebeloma cylindrosporum* (Guidot *et al.*, 2001, 2002) semblent montrer une bonne corrélation entre structures souterraines et carpophores, la majeure partie des espèces abondamment représentées sous forme végétative dans les sols ne fructifie pas ou peu. Et inversement, les espèces fructifiant intensément ne forment que peu de mycorhizes (Horton & Burns, 2001). Dahlberg *et al.* (1997) suggèrent que les espèces comptant pour 70% de la biomasse issue des carpophores représentent moins de 30% de la biomasse souterraine. Si ces différences peuvent être en partie liées à des méthodes d'échantillonnage différentes, la principale raison reste que la fructification est un phénomène complexe qui varie d'une espèce à l'autre, certaines espèces fructifient abondamment (*Suillus*, *Cortinarius*) alors que d'autres ne fructifient pas (*Cenococcum*, *Piloderma*) ou peu (Dahlberg, 2001). A noter également, l'existence de fructifications hypogées souvent ignorées ou sous-estimées lors des inventaires. D'autre part, les carpophores sembleraient beaucoup plus affectés par les facteurs environnementaux que la communauté souterraine (Peter *et al.*, 2001). Ces auteurs ont démontré par exemple qu'un apport d'azote inorganique ne modifie que très peu, à court terme, la diversité des champignons au niveau souterrain alors que la diversité des carpophores est très affectée. Cela pourrait résulter d'une diminution des apports de photosynthétats destinés à la fructification due au coût élevé de l'assimilation de l'azote supplémentaire (Lilleskov & Bruns, 2001).

Quoi qu'il en soit, le budget de carbone et les ressources allouées à la formation de carpophores et à la production de biomasse souterraine (mycorhizes et mycélium) semblent varier selon les espèces. Cette variabilité suggère l'existence de stratégies diverses au sein de la communauté. Certaines espèces optimisant la reproduction sporale et d'autres la croissance végétative.

3.1.2. Le mycélium donne une image plus exacte des communautés

Au cours de la dernière décennie, les progrès en biologie moléculaire ont rendu possible l'identification des espèces fongiques à partir des hyphes colonisant les racines

ou le sol et donc l'analyse spatio-temporelle des communautés souterraines de champignons (Horton & Bruns, 2001). Bien que plus destructif, le prélèvement de mycorhizes (Tedersoo *et al.*, 2003) ou de mycélium (Prospero *et al.*, 2003) dans des échantillons de sol donne un meilleur aperçu des communautés fongiques souterraines (ectomycorhiziennes ou autres). Le prélèvement de mycélium n'étant essentiellement possible que pour les espèces formant des cordons ou des rhizomorphes, l'utilisation de milieux de culture artificiels a permis l'isolation et l'identification de nombreuses espèces en l'absence de toute fructification (Thorn *et al.*, 1996).

Une approche bien développée pour identifier les champignons colonisant les racines implique la description morphologique des mycorhizes (Agerer, 1987-1996). En effet, contrairement aux réseaux mycéliens, la morphologie des mycorhizes souvent spécifique de l'espèce permet l'identification de certains champignons dans leurs environnements naturels (Smith *et al.*, 2000). Deux facteurs peuvent toutefois compliquer cette analyse morphologique : (1) l'aspect de la mycorhize peut changer au cours de son stade de développement au sein de la même espèce (Mehmann *et al.*, 1995) et (2) des mycorhizes atypiques peuvent exister (Nylund *et al.*, 1995). Par conséquent, cette méthode d'identification morphologique n'est pas toujours évidente et requière un long temps d'apprentissage pour être maîtrisée.

L'identification moléculaire apparaît dès lors comme le plus simple moyen de reconnaissance des espèces à partir du mycélium colonisant les racines ou le sol. De plus, ces méthodes offrent trois principaux avantages: (1) ils permettent la détection à différents niveaux taxonomiques (genre, espèce, génotype), (2) ils demandent peu de temps d'apprentissage pour être maîtrisés, et (3) sont reproductibles dans le temps et l'espace (Dahlberg, 2001).

Les méthodes moléculaires privilégiées sont celles issues de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dirigée car non seulement elles visent des loci comportant simultanément des séquences conservées (permettant l'utilisation d'amorces) et polymorphes (donc discriminantes) entre espèces. Mais aussi, selon la spécificité des amorces utilisées, elles n'amplifient pas ou très peu l'ADN contaminant, condition indispensable lors de l'étude des mycorhizes. Bien que les gènes 18S (*small subunit SSU*) et 28S (*large subunit* ou *LSU*) de l'ADNr aient été utilisés comme gènes cibles, la plupart des études d'écologie moléculaire sur les champignons ont impliqué des

analyses de la région d'ITS (*Internal Transcribed Spacer*), habituellement peu variable au sein de l'espèce, et amplifiée par des amorces universelles (ITS1 et ITS4 ; White *et al.*, 1990) ou spécifiques de champignons ou de groupes tels les Basidiomycètes (ITS1f et ITS4 ou ITS1f et ITS4b ; Gardes & Bruns, 1996).

Les analyses RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de cette région ont été très utilisées, et le sont encore aujourd'hui, car elles séparent la plupart des espèces rapidement pour une demande d'équipement minimal et pour un coût réduit puisque typiquement deux à trois enzymes de restriction sont suffisantes pour distinguer la plupart des espèces (Gardes & Bruns, 1996b ; Pritsch *et al.*, 1997). Cependant, l'identification des espèces par l'approche ITS/RFLP n'est possible que pour les champignons dont les profils RFLP ou les séquences ITS sont connus. De plus, la comparaison de profils existants n'est pas une tâche aisée pour plusieurs raisons : (1) le manque de résolution des gels d'agarose utilisés, (2) l'absence de toute standardisation de la méthode ITS/RFLP concernant les amorces ou les enzymes de restriction utilisées, et (3) l'absence de toute base de données internationale. Si l'impossibilité de séparer deux profils proches, synonymes d'espèces différentes, a été en partie résolue par l'utilisation de moyens d'analyse plus performants (gel de polyacrylamide sur séquenceur automatisé et logiciel d'analyse GENESCAN ; Peter *et al.*, 2001) ou par modification de la technique (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* ou T-RFLP ; Dickie *et al.*, 2002), l'incapacité d'attribuer une « identité » à des espèces inconnues persiste. Le séquençage des produits amplifiés reste la méthode la plus puissante d'identification des espèces. Même si certaines séquences ITS peuvent rester inconnues, pour cause de leur proximité avec des groupes sous représentés. L'alignement des séquences d'ADN « inconnues » avec les séquences de références disponibles, suivies d'une analyse « phylogénétique », permet en général l'attribution d'un nom d'espèce à une séquence ITS ou à défaut de la relier au moins à un genre ou à une famille, sans parler des rangs taxonomiques supérieurs.

Si l'étude des mycorhizes et du mycélium mis en culture donne un aperçu de la structure génétique des communautés fongiques souterraines, elle ne reflète pas cette structure dans toute sa complexité. En effet, bien qu'un certain nombre de champignons soient cultivables *in vitro*, la plupart des espèces fongiques ne peuvent être isolées du sol. Le faible taux de croissance de leur mycélium et l'absence de milieux véritablement sélectifs favorisent l'isolation des champignons à croissance rapide lors des tentatives

de mises en culture (Thorn, 1997). Sont essentiellement concernés les espèces dépourvues de spores asexuées tels de nombreux Basidiomycètes saprophytes, les champignons ectomycorhiziens et certains pathogènes. L'identification et l'estimation de la diversité en espèces de la communauté sont par conséquent sous-estimées par ce genre d'analyse.

Quant à l'inventaire des mycorhizes, s'il permet une estimation plus que correcte de la diversité, de l'abondance et de la distribution des espèces fongiques ectomycorhiziennes dans la rhizosphère, il n'apporte aucune information sur la structure génétique des communautés de ces champignons dans le sol adjacent non rhizosphérique. Le mycélium extramatriciel, en explorant le sol et en excrétant les enzymes, représente la structure fonctionnelle impliquée activement dans l'acquisition et dans le transport des nutriments jusqu'à l'arbre mycorhizé (Read & Perez-Moreno, 2003). Plusieurs études *in vitro* ont démontré que les champignons ectomycorhiziens présentaient des capacités variables dans l'utilisation de substrats (Hutchison, 1990 ; Gramss *et al.*, 1998). Ceci pourrait impliquer une différentiation en niches verticales et/ou horizontales des hyphes extramatriciels selon les gradients de ressources nutritives. Lors d'expérimentations en microcosmes, il a été démontré que les hyphes fongiques ont une croissance polarisée en direction des patchs riches en nutriments et ce indépendamment de la localisation des mycorhizes dont ils proviennent (Bending & Read, 1996). Par conséquent, la distribution des hyphes dans le sol n'est pas forcément la même que celle des mycorhizes, et son étude est à même d'apporter des informations écologiques précieuses sur le fonctionnement des champignons.

L'unique moyen de contourner le biais de la mise en culture ou les limites de l'étude des mycorhizes est l'analyse par PCR d'extraits d'ADN obtenus à partir d'échantillons de sol.

3.1.3. Les approches moléculaires permettant la caractérisation de la diversité génétique au sein des communautés à partir de l'ADN extrait des sols

L'extraction d'ADN total à partir d'échantillons de sol a été développée depuis plusieurs années en ce qui concerne les organismes bactériens (Holben *et al.*, 1988; Wintzingerode *et al.*, 1997). De ce fait, il existe à l'heure actuelle toute une gamme de protocoles disponibles, impliquant des étapes de lyse, d'extraction et de purification de

Tableau 3. Quelques méthodes moléculaires développées afin d'étudier la diversité génétique et fonctionnelle des communautés microbiennes.

Méthode	**Principe**	**Pouvoir de résolution**
PCR des régions de l'ADNr (ITS, SSU, LSU) suivie d'une électrophorèse en gradient de gel dénaturant (*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis* ou DGGE) ou en gradient de température (*Temperature Gel Gradient Electrophoresis* ou TGGE)	Permet la séparation sur gel des bandes de tailles identiques mais présentant des séquences différentes	Bonne estimation de la diversité de la communauté
PCR des régions de l'ADNr (ITS, SSU, LSU) suivie d'un clonage et d'une digestion par des enzymes de restriction RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). La technique de T-RFLP (Terminal-RFLP) ne nécessite pas de clonage, mais la PCR se fait avec des amorces marquées	Permet la détermination de la présence de micro-organismes connus	Détermination de la diversité avec spécificité
PCR des régions de l'ADNr (ITS, SSU, LSU) suivie d'un clonage et d'un séquençage	Permet la comparaison entre micro-organismes afin de déterminer les relations phylogénétiques	Détermination de la diversité avec spécificité
PCR de gènes fonctionnels (codant des enzymes) suivie d'une analyse par DGGE ou TGGE	Permet la séparation sur gel des bandes de tailles identiques mais présentant des séquences différentes	Large détermination de la diversité de la communauté présentant un potentiel enzymatique donné
PCR de gènes fonctionnels suivie d'un séquençage	Comparaison des séquences de gènes	Détermination avec spécificité de la diversité de la communauté présentant un potentiel enzymatique donné et aspects d'évolution
Hybridation *in situ* avec des sondes génétiques marquées en fluorescence (FISH)	Visualisation en microscopie	Détection et distribution spatial des micro-organismes cibles
Reverse transcriptase /PCR semi-quantitative sur des gènes fonctionnels	Détection spécifique des ARNm des enzymes cibles	Détermination des activités enzymatiques *in situ*

Tableau 4. Récapitulatif de la diversité en espèces obtenue lors d'études sur la structure des communautés ECM (d'après Horton & Bruns, 2001).

Type de végétation	Age (ans)	Surface étudiée (m^2)	Nombre d'échantillons de sol collectés (diamètre en cm)	Nombre d'espèces	Référence
Pinus sylvestris (*Betula* sp.)	1-124	8 parcelles sur 10 000 à 60 000	15 (2.8) par parcelle	18 à 24 par parcelles	Jonsson *et al.*, 1999b
Picea abies	30	2025	120 (5)	21	Kårén & Nylund, 1997
Pinus muricata	35	1000	31 (10)	>20	Gardes & Bruns, 1996a
Pinus muricata / Pseudostuga menziesii	35	125	25 (10)	16	Horton & Bruns, 1998
Arctostaphylos / Pseudostuga menziesii	>50	625	12 (10)	>40	Horton *et al.*, 1999
Picea abies	100	500	10 (1.5)	25	Dalhberg *et al.*, 1997
Pinus ponderosa	100	2500	24 (5)	>50	Stendell *et al.*, 1999
Pinus sylvestris	200-400	10 000	10 (2)	24	Jonsson *et al.*, 1999a
Pinus edulis	-	3000	50 (-)	51	Gehrind *et al.*, 1998
Pinus muricata	34-38	625	15 (2.8)	20	Taylor & Bruns, 1999
Pinus muricata	1	625	29 (-)	7	Baar *et al.*, 1999
Pseudostuga menziesii / Tsuga heterophylla	90	21 000	198 (5.5)	200*	Luoma *et al.*, 1997
Picea abies / Pinus sylvestris	70-90	-	80 (2.8)	51	Jonsson *et al.*, 2000
Abies magnifica	350-400	6400	40 (4.6)	80	Bidartondo *et al.*, 2000

*morphotypes

nature variable. L'application de ces méthodes aux organismes fongiques, indispensable à la bonne compréhension de la structure génétique de leurs communautés, commence a être utilisée (Smit *et al.*, 1999 ; Dickie *et al.*, 2002 ; Guidot *et al.*, 2002 ; Landeweert *et al.*, 2003). Elle confirme ou infirme, les conclusions des observations réalisées sur les carpophores, les mycorhizes ou le mycélium mis en culture.

Les principales méthodes moléculaires, utilisées dans les études de communautés et de populations à partir des ADN extraits, ainsi que leur pouvoir de résolution sont présentés dans le tableau 3. Alors que les approches alliant PCR et électrophorèses en gradient de gel dénaturant (*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis* ou DGGE) ou en gradient de température (*Temperature Gel Gradient Electrophoresis* ou TGGE) permettent d'estimer la diversité génétique sans réelle identification des organismes fongiques présents dans les sols (Smit *et al.*, 1999 ; Vainio & Hantula, 2000). Le séquençage systématique des produits amplifiés, préalablement clonés, autorise la détermination avec une haute spécificité de cette même diversité génétique (Landeweert *et al.*, 2003).

3.2. Structuration génétique des communautés fongiques

3.2.1. Diversité et distribution des espèces

Les communautés fongiques du sol sont généralement constituées par un large nombre d'espèces et ce même dans les parcelles dominées par une seule espèce végétale. En sol agricole, Smit *et al.* (1999) ont estimé à plus 24 le nombre d'espèces fongiques présentent dans la rhizosphère d'un plant de blé. En forêt, où les champignons ectomycorhiziens représentent une part importante de la communauté fongique, il n'est pas rare de détecter plus de 40 espèces sur des surfaces de moins d'un hectare (Tableau 4).

Les différentes études portant sur la composition et la distribution des espèces fongiques dans les sols montrent qu'un échantillon de sol contient une mosaïque d'espèces plus ou moins différente de celle contenue dans l'échantillon de sol adjacent (Gardes & Bruns, 1996a ; Dahlberg *et al.*, 1997 ; Smit *et al.*, 1999 ; Zhou & Hogetsu, 2002). Des travaux récents effectués par Tedersoo *et al.* (2003) montrent que la

composition en espèces ectomycorhiziennes est hautement variable entre deux échantillons distants de 5 cm et qu'un changement presque total a lieu à 50 cm de distance. De tels changements en espèces dans les sols ont lieu non seulement selon les gradients horizontaux mais aussi selon les gradients verticaux (Zhou & Hogetsu, 2002 ; Tedersoo *et al.*, 2003 ; Dickie *et al.*, 2002 ; Landeweert *et al.*, 2003). Ces échantillons, renfermant une multitude d'espèces, ne présentent en général qu'une à deux (Horton & Bruns, 2001) voir cinq (Tedersoo *et al.*, 2003) espèces dominantes. Contrairement aux espèces rares, ces dernières sont plus largement distribuées dans les sols.

Cependant, leur distribution n'est pas continue, elle est en effet limitée à un nombre réduit d'échantillons plus ou moins espacés, suggérant que le déplacement de l'échantillonnage de quelques centimètres peu avoir des conséquences dramatiques sur la perception de la présence et de l'abondance des espèces (Horton & Bruns, 2001). Bien que la plupart des espèces dominantes semblent se retrouver dans moins de 10% des échantillons collectés, quelques champignons apparaissent être plus largement distribués. Stendell *et al.* (1999) ont détecté la présence d'une espèce de Russulaceae dans 6 des 24 échantillons de sol prélevés. Dahlberg *et al.* (1997) ont montré que *Piloderma croceum* et *Cenococcum geophilum* colonisaient respectivement la moitié et la totalité des parcelles étudiées. Les champignons à ronds de sorcière tels *Marasmius oreades* ou des pathogènes tels *Armillaria* sont connus pour avoir un mycélium extensif dans les sols (Abesha *et al.*, 2003 ; Prospero *et al.*, 2003). Cependant, l'étude plus fine de certains « grands » clones mycéliens d'*Armillaria* a mis en évidence une fragmentation importante de ces derniers.

La distribution en mosaïque des espèces n'est autre que le reflet leur « biologie ». Tout organisme fongique prolifère à partir d'un point isolé par croissance végétative. Cette propagation du mycélium végétatif peut être ensuite limitée par différents phénomènes : (1) La compétition entre espèces (Wu *et al.*, 1999), (2) les phénomènes d'incompatibilité somatique entre individus de la même espèce (Prospero *et al.*, 2003), (3) les changements de conditions physico-chimiques du milieu environnant (Buscot *et al.*, 2000), mais aussi et surtout en tant qu'hétérotrophe selon la présence ou absence de substrats adéquats (Dickie *et al.*, 2002 ; Landeweert *et al.*, 2003). En effet, les champignons sont confinés, lorsqu'ils sont actifs, dans des habitats susceptibles de leur fournir les composés organiques nécessaires à leur croissance. Bien

qu'ils puissent en tant que groupe exploiter pratiquement toutes les ressources en carbone organique disponibles, les différentes espèces fongiques varient fortement dans leur capacité à accéder et à utiliser les composés carbonés qui diffèrent selon leur nature et leur localisation.

De ce fait, les espèces fongiques occupent différentes niches écologiques. Selon le type de litière et les conditions environnementales où ont lieu les processus de décomposition, les mêmes niches écologiques sont occupés par des spectres d'espèces relativement différents. Dickie *et al.* (2002) en analysant la distribution du mycélium extramatriciel ectomycorhizien mettent en évidence une diminution de la diversité avec la profondeur et une stratification verticale des espèces. Six principaux profils de distribution furent détectés. Alors que certaines espèces (*Ramaria concolor*, *Lactarius* sp., *Tylopilus felleus*) présentaient une localisation presque exclusive (présence de l'espèce >75%) au niveau de la litière, d'autres étaient préférentiellement distribuées (entre 47 et 67%) au niveau de la litière (*Trichoderma* sp., *Scleroderma citrinum, Russula* sp.), de l'horizon de fermentation (*Suillus intermedius*), de l'horizon humifère (*Russula* sp., *Amanita rubescens*) ou de l'horizon minéral (*Amanita vaginata*). Les espèces *Clavinula cristata* et *Cenococcum geophilum* quant à elles arboraient une distribution à travers les horizons bien plus vaste.

3.2.2. Dynamique temporelle des espèces

Franckland (1998) a défini le phénomène de successions fongiques au cours du temps comme des changements dirigés dans la composition, l'abondance relative et la distribution spatiale des espèces constituant une communauté. Les successions se traduisent alors par des phénomènes de colonisation, de maintien et de disparition d'espèces qui devraient aboutir en l'absence de tout phénomène de perturbation à un stade d'équilibre stable ou climax. En règle générale, que ce soit lors des processus de dégradation (Cf. section 2.2.2.) ou lors du vieillissement du peuplement forestier (Dahlberg & Stenlid, 1995), la diversité fongique augmente *via* le recrutement de nouvelles espèces lors des stades précoces puis diminue à nouveau lors des stades tardifs.

Les processus prenant place au sein des populations érigent les profils des communautés. Par conséquent, les connaissances sur la capacité des individus des différentes espèces à se développer dans le temps et dans l'espace sont essentielles pour comprendre la structure des communautés. Cependant, pour les différentes espèces fongiques, encore peu de choses sont connues sur l'importance relative de la croissance végétative mycélienne synonyme de longévité par rapport à une nouvelle colonisation à partir de propagules qui peuvent être végétatives (conidies ou sclérotes) ou sexuées (meiospores). L'étendue spatiale et la persistance des individus ont été déterminées soit par des études d'incompatibilité somatique sur du mycélium mis en culture (Prospero *et al.*, 2003) soit par des études moléculaires (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou RAPD et microsatellites) sur de l'ADN issu de carpophores (Abesha *et al.*, 2003 ; Bergemann & Miller, 2002). Ces dernières techniques moléculaires ne peuvent être appliquées sur des extraits d'ADN total de sol, car elles amplifient indistinctement tout ADN contaminant. D'après les diverses études sur la structure des populations, il apparaît que les génets de certaines espèces sont nombreux, de vie courte (1 à 2 ans) et de petite taille (inférieur à 1 m). C'est le cas d'*Hebeloma cylindrosporum* (Guidot *et al.*, 2003), de *Laccaria amethystina* (Fiore-Donno & Martin, 2001), d'*Amanita francheti* et de *Russula cremoricolor* (Redecker *et al.*, 2001). D'autres espèces semblent par contre présenter un faible nombre de larges génets, ce qui est synonyme de persistance et de croissance mycélienne végétative importante. C'est le cas de *Suillus bovinus* (Dahlberg & Stenlid, 1994), de *Cortinarius rotundisporus* (Sawyer *et al.*, 1999) et d'*Armillaria* sp. (Prospero *et al.*, 2003). La présence de petits génets pourrait suggérer une colonisation par méiospores alors celle de plus larges génets pourrait indiquer plutôt des croissances végétatives à long terme (décennies). Ce dernier type de génets étant souvent retrouvé dans les forêts âgées, le phénomène de succession impliquerait le remplacement des espèces pionnières à forte dispersion sporale (Stratèges R adaptés aux milieux riches et perturbés) par des espèces tardives. Pour ces espèces tardives, la colonisation initiale par spore serait suivie d'une croissance végétative et de l'élimination des génets moins compétitifs (Stratèges C adaptés aux milieux riches et stables). A la fin, seules les espèces et les souches pouvant résister à des conditions de stress persisteraient (Stratèges S). Dans ces conditions, lorsque la population a terminé son recrutement, la production de spores n'aurait plus sur place un rôle de colonisation. En effet, la présence des mycéliums adaptés et bien développés aurait tendance à s'opposer à la l'installation de nouveaux clones.

Cependant, plusieurs travaux ont démontré que le développement par spores n'était pas limité aux stades précoces. Les populations de *Laccaria amethystina* (Fiore-Donno & Martin, 2001) et de plusieurs Russulacées (Redecker *et al.*, 2001 ; Bergemann *et al.*, 2002), localisées dans de vieux peuplements forestiers, sont caractérisées par de multiples petits génets de courte vie. D'autres études ont également mis en évidence la présence d'un certain nombre de petits clones, témoins d'une colonisation récente par des spores, parmi de grands génets (Dahlberg & Stenlid, 1994 ; Prospero *et al.*, 2003). Il est important de rappeler que la plupart de ces études ont été réalisées sur les carpophores et que la distribution du mycélium souterrain peut être toute autre. La fragmentation de certains « grands génets » d'Armillaire en ramets mise en évidence par Prospero *et al.* (2003), lors d'une étude à plus fine échelle de la distribution du mycélium souterrain, suggère que de telles discontinuités pourraient permettre l'établissement de nouveaux génotypes par l'intermédiaire de spores ou de fragments mycéliens pour les espèces ne fructifiant pas.

3.3. Etablir les liens entre diversité d'espèces, physiologie et fonctionnement des écosystèmes

Les techniques moléculaires évoquées jusqu'à présent permettent de caractériser la composition, la diversité en espèces et donc la structure des communautés fongiques dans leur environnement naturel. Si ces informations sont indispensables, les questions fondamentales concernent la signification de cette diversité pour le fonctionnement des écosystèmes. Les études moléculaires ont démontré des différences en composition d'espèces suivant l'environnement et les traitements (Smit *et al.*, 1999 ; Peter *et al.*, 2001 ; Lord *et al.*, 2002). Pour comprendre le rôle de ces différences, il faut déterminer les caractéristiques des différents composants de cette communauté et leur fonction dans l'écosystème. En d'autres termes, quelles fonctions sont attribuables à tel ou tel organisme ?

Jusqu'à présent, la meilleure manière d'évaluer la diversité fonctionnelle des organismes fongiques a impliqué l'étude de potentiels enzymatiques sur des souches isolées et cultivées en laboratoire (Rosenbrock *et al.*, 1995 ; Gramss *et al.*, 1998). Or, les activités enzymatiques mesurées en laboratoire sur des cultures mycéliennes ne

peuvent être considérées que comme des activités potentielles. En effet, toute mesure en laboratoire des activités enzymatiques favorise des interactions maximales entre l'enzyme et son substrat, alors que les propriétés du sol peuvent affecter l'efficacité de l'interaction catalytique (Tate III, 2002). En outre, les conditions de culture peuvent parfois masquer l'existence de certaines enzymes en inhibant son expression (Srinivasan *et al.*, 1995). Plus problématique encore, les fonctions des espèces fongiques non cultivables qui représentent la fraction fongique la plus importante des sols (Thorn, 1997) ne peuvent être déterminées.

Les techniques dérivées de la PCR permettant l'analyse de la diversité et de l'expression de gènes fonctionnels à partir d'acides nucléiques extraits de sols apparaissent dès lors comme le meilleur moyen d'éviter les problèmes liés à la mise en culture.

3.3.1. Analyse de la diversité des gènes fonctionnels

Bien que les gènes codant une protéine (gènes fonctionnels) soient spécifiques de chaque espèce, ils possèdent des régions plus ou moins conservées permettant la synthèse d'amorces universelles (plantes, champignons, bactéries) ou plus spécifiques de certains groupes (Ascomycètes, Basidiomycètes). Les travaux récemment réalisés sur les organismes bactériens ont démontré qu'un gène fonctionnel, lorsqu'il n'est pas soumis à des transferts horizontaux, peut permettre la caractérisation de la structure génétique (diversité et distribution des espèces) des communautés bactériennes porteuses d'une fonction bien précise dans leur habitat naturel (Poly *et al.*, 2001 ; Francis *et al.*, 2003). Comme pour les gènes 16S, l'attribution de la nouvelle séquence à un organisme donné se fait par alignement et analyse cladistique de celle-ci avec les séquences de références disponibles. L'unique étude de ce type réalisée à ce jour sur les organismes fongiques porte sur la caractérisation de la diversité des gènes laccasiques d'Ascomycètes dans un marais salé nord-américain. Les résultats suggèrent que l'espèce fongique dominante lors des processus de dégradation des feuilles de *Spartina alterniflora* soit *Phaesphaeria halima.* Elle domine lors des stades précoces et lors des stades tardifs moins riches en diversité (Lyons *et al.*, 2003). Il est important de rappeler que l'établissement de ce genre d'étude n'est possible que si le gène fonctionnel cible a déjà été séquencé chez de nombreux organismes afin de déterminer correctement les

séquences des amorces spécifiques.

Si ces analyses effectuées au niveau ADN apportent des informations indispensables sur la structure génétique de la communauté appartenant à une guilde fonctionnelle (organismes réalisant une même fonction), les études sur l'ARN et plus particulièrement sur l'expression de l'ARNm apportent des informations sur l'activité ou la non-activité de ces organismes préalablement détectés.

3.3.2. Analyse de l'expression des gènes fonctionnels

La détection d'ARNm d'un gène peut être donc utilisée pour évaluer l'expression d'un gène et déterminer la réponse de l'organisme porteur de la fonction aux changements environnementaux. Cette approche fut longtemps limitée par le temps de vie relativement court de l'ARNm et par voie de conséquence par les difficultés d'en extraire des quantités suffisantes avant sa dégradation. S'il existe un nombre d'études limité évoquant l'analyse réussie d'ARNm isolés de sols ou de sédiments (Mendum *et al.*, 1998 ; Hurt *et al.*, 2001), les rapports impliquant l'analyse d'expression par RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) de gènes fonctionnels sont plus que limités au niveau bactérien (Bürgmann *et al.*, 2003) et inexistants au niveau fongique.

3.3.3. Analyse d'acides nucléiques marqués (*Stable Isotope probing* ou SIP) et *microarrays*

Une analyse isotopique peut permettre de déterminer quelles espèces de la communauté microbienne ont incorporé un substrat particulier marqué avec un isotope lourd. Radajewski *et al.* (2000) ont utilisé cette technique pour déterminer quels utilisateurs du méthanol étaient actifs dans le sol. Après incubation du sol avec du méthanol marqué au ^{13}C, l'ADN fut extrait, et l'ADN marqué (^{13}C) plus lourd fut séparé de l'ADN non marqué (^{12}C) par centrifugation à gradient de densité. L'ADN marqué étant seulement dérivé des organismes assimilant le méthanol, l'identité de ces derniers fut déterminée par amplification/séquençage des gènes 16S et des gènes fonctionnels. La limite de cette approche est sa sensibilité. En effet, elle requière des niveaux de croissance élevés impliquant l'incorporation suffisante de ^{13}C ou ^{15}N dans l'ADN pour permettre la séparation et la détection de l'ADN marqué. La quantité d'ARN, dépendant

plus de l'activité que de la croissance de l'organisme, pourrait contourner ces problèmes de sensibilité (Radajewski *et al.*, 2003). Cette analyse isotopique n'étant qu'une approche dérivée des deux méthodes moléculaires précédemment évoquées, il convient tout d'abord de développer les outils nécessaires à l'analyse des gènes fonctionnels d'intérêt (Extraction d'acides nucléiques, PCR et RT-PCR) sur les ADN et les ARN totaux hors marquage. De plus, ce type d'étude implique la mise en place d'un dispositif expérimental avec apport de substrat marqué, il ne peut être exclu que cette ressource nouvelle biaise le résultat des observations par rapport à une étude *in situ*, sans modification anthropique.

L'application de ces techniques sur les gènes codant les enzymes fongiques impliquées dans les phénomènes de dégradation et de séquestration de la MOS permettrait d'approfondir nos connaissances sur le rôle des champignons dans les cycles bio-géochimiques et plus particulièrement celui du carbone.

Ces approches ne permettant que l'étude d'un nombre limité de fonctions ne suffisent pas à appréhender l'aspect fonctionnel global de la communauté fongique du sol dans les processus de transformation de la MOS. Cette analyse à grande échelle ne pourra être envisagée qu'avec l'aide d'outils puissants tels les réseaux d'oligonucléotides ou *microarrays* (Martin, 2001 ; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2003). Cependant, la mise en place de tels moyens implique la caractérisation préalable de la diversité des gènes fonctionnels d'intérêts (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2003). Pour l'instant, le meilleur moyen d'évaluer la diversité génétique et fonctionnelle d'une communauté fongique, et d'obtenir les informations nécessaires à établissement des *microarrays*, reste les approches moléculaires décrites paragraphes 3.3.1 et 3.3.2. Ces techniques sont encore peu ou pas utilisées au niveau fongique et requièrent par conséquent un développement substantiel avant d'être généralement appliquées.

Parmi le grand nombre d'enzymes impliquées dans les processus de dégradation pouvant être la cible de telles recherches, les enzymes laccasiques sont fortement exprimées et répandues chez les champignons. Elles présentent donc l'avantage de pouvoir rendre compte d'une diversité fongique plus vaste que dans le cas d'une enzyme peu représentée. Leur forte expression facilite l'élaboration des protocoles expérimentaux qui pourront ensuite être appliqués à des enzymes moins fréquentes.

Tableau 5. Différents niveaux de détection (activités, protéines, gènes) laccasiques chez quelques espèces d'ectomycorhiziens et de saprophytes décomposeurs de litière au cours des dernières années. Le signe (+) indique, selon le cas, qu'une activité enzymatique ou que la présence d'au moins un gène laccasique a été déterminée. L'absence d'annotation ou l'abréviation (n.d.) souligne une non détermination. Les espèces appartenant aux Ascomycètes sont désignées par (*).

Détection de laccase	Activité	Protéine (masse moléculaire et point isoélectrique)	Gène	Référence
Ectomycorhiziens				
Amanita strobiliformis	+			Gramss *et al.*, 1998
Coprinus varius	+			Gramss *et al.*, 1998
Hebeloma crustulifiniforme	+			Gramss *et al.*, 1998
Lactarius clarkeae	+		+	Chen *et al.*, 2003
Lactarius deliciosus	+			Gramss *et al.*, 1998
Lactarius rufus	+		+	Chen *et al.*, 2003
Lactarius scrobiculatus	+		+	Chen *et al.*, 2003
Lactarius sp.	+		+	Chen *et al.*, 2003
Lactarius torminosus	+			Gramss *et al.*, 1998
*Morchella conica**	+			Gramss *et al.*, 1998
Piloderma byssinum	+		+	Chen *et al.*, 2003
Piloderma croceum	+		+	Chen *et al.*, 2003
Russula adusta	+		+	Chen *et al.*, 2003
Russula aeruginea	+			Gramss *et al.*, 1998
Russula foetens	+			Gramss *et al.*, 1998
Russula puellaris	+		+	Chen *et al.*, 2003
Russula violeipes	+			Gramss *et al.*, 1998
Suillus aeruginascens	+			Gramss *et al.*, 1998
Thelephora terrestris	+	66 kDa PI n.d.		Kanunfre & Zancan, 1998
Tricholoma terreum	+			Gramss *et al.*, 1998
Saprophytes décomposeurs de la litière				
Agaricus aestivalis	+			Gramss *et al.*, 1998
Agaricus bisporus	+	65 kDa PI n.d.	+	Gramss *et al.*, 1998 Perry *et al.*, 1993ab
Agrocybe dura	+			Gramss *et al.*, 1998
Agrocybe praecox	+			Gramss *et al.*, 1998
*Aspergillus nidulans**	+	67 kDa PI n.d.	+	Scherer & Fischer, 2001 Aramayo & Timberlake, 1990
Collybia butyracea	+			Gramss *et al.*, 1998
Collybia dryophila	+			Gramss *et al.*, 1998
Coprinus cinereus	+	66 kDa PI n.d.	+	Yaver *et al.*, 1999
Lepiota naucina	+			Gramss *et al.*, 1998
Lepista nebularis	+			Gramss *et al.*, 1998
Macrolepiota procera	+			Gramss *et al.*, 1998
*Neurospora crassa**	+		+	Germann *et al.*, 1988
*Podospora anserina**	+		+	Fernández-Larrea & Stahl, 1996

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

Tableau 6. Différents niveaux de détection (activités, protéines, gènes) laccasiques chez quelques espèces de saprophytes décomposeurs du bois et de pathogènes au cours des dernières années. Le signe (+) indique, selon le cas, qu'une activité enzymatique ou que la présence d'au moins un gène laccasique a été déterminée. L'absence d'annotation ou l'abréviation (n.d.) souligne une non détermination. Les espèces appartenant aux Ascomycètes sont désignées par (*).

Détection de laccase	Activité	Protéine (masse moléculaire et point isoélectrique)	Gène	Référence
Saprophytes dégradeurs du bois				
Bjerkandera adusta	+			Gramss *et al.*, 1998
Basidiomycète PM1 (CECT 2971)	+	64 kDa PI 3.6	+	Coll *et al.*, 1993a Coll *et al.*, 1993b
Cerrena maxima	+	57 kDa PI 3.5		Koroleva *et al.*, 2001
Cerrena unicolor	+	66k Da PI 3.9	+	Peláez *et al.*, 1995 Bekker *et al.*, 1990 Zhao *et al.*, non publié
Ceriporiopsis subvermispora	+	68k Da PI 3.4	+	Fukushima & Kirk, 1995 Karahanian *et al.*, 1998
Coriolus hirsutus	+	73k Da PI 7.4	+	Shin & Lee, 2000 Kojima *et al.*, 1990
Coriolus zonatus	+	60k Da PI n.d.		Koroleva *et al.*, 1999
Coriolopsis rigida	+	66k Da PI 3.9		Peláez *et al.*, 1995 Sapparat *et al.*, 2002
Dichomitus squalens	+	66k Da PI n.d.		Perie *et al.*, 1998
Ganoderma lucidum	+	65k Da PI n.d.	+	Ko *et al.*, 2001 D'Souza *et al.*, 1996
Lentinus edodes	+	74 kDa PI 4.2	+	Annibale *et al.*, 1996 Zhao & Kwan, 1999
Marasmius quercophilus	+	63 kDa PI 3.6	+	Dedeyan *et al.*, 2000
Phanerochaete flavido-alba	+	94 kDa PI 3.5		Pérez *et al.*, 1996
Phellinus ribis	+	76 kDa PI 4.0		Peláez *et al.*, 1995 Min *et al.*, 2001
Phellinus torulosus	+			Peláez *et al.*, 1995
Pleurotus ostreatus	+	62kDa PI 6.9	+	Peláez *et al.*, 1995 Giardina *et al.*, 1995, 1999
Pleurotus eryngii	+	65 kDa 4.1		Peláez *et al.*, 1995 Muñoz *et al.*, 1997
Pleurotus florida	+	73 kDa PI 4.2		Das *et al.*, 2001
Pycnoporus cinnabarinus	+	81 kDa PI 3.7	+	Eggert *et al.*, 1996b Eggert *et al.*, 1998
Trametes hirsuta	+			Peláez *et al.*, 1995
Trametes trogii	+	70kDa PI n.d.	+	Garzillo *et al.*, 1998 Colao *et al.*, non publié
Trametes versicolor	+	64 kDa PI 3.0	+	Peláez *et al.*, 1995 Cassland & Jönsson, 1999 Collins & Dobson, 1997
Trametes villosa	+	63 kDa PI 3.5	+	Yaver *et al.*, 1996 Yaver & Golightly, 1996
*Trichophyton rubrum**	+	65kDa PI n.d.		Jung *et al.*, 2002
Pathogènes				
Armillaria mellea	+	80 kDa PI 3.1		Curir *et al.*, 1997
*Botrytis cinerea**	+	74 kDa PI 4.0	+	Slomczynski *et al.*, 1995 Schouten *et al.*, 2002
*Cryphonectria parasitica**	+	77 kDa PI n.d.	+	Rigling & Van Alfen, 1993 Choi *et al.*, 1992
Cryptococcus neoformans	+	75 kDa PI n.d.	+	Williamson, 1994 Salas *et al.*, 1996
Gaeumannomyces graminis var. *Tritici**	+	60 kDa PI 5.6	+	Edens *et al.*, 1999 Litvintseva & Henson, 2002
Heterobasidion annosum	+		+	Asiegbu *et al.*, 2004
*Ophiostoma novo-ulmi**	+	79 kDa PI 5.1		Binz & Canevascini, 1997
Rhizoctonia solani	+	66 kDa PI n.d.	+	Wahleithner *et al.*, 1996

IV. Les laccases fongiques

4.1. La laccase, une famille d'enzymes largement distribuée

Les laccases ou phénol-oxydases (benzenediol:oxygen oxido-reductase, EC 1.10.3.2) font partie, avec les céruloplasmines et les ascorbate oxydases, des oxydases à cuivre (Malmström, 1997). Elles furent tout d'abord découvertes dans les exsudats de *Rhus vernicifera* par Yoshida (1883) avant d'être reconnues comme enzymes fongiques par Bertrand (1896) et Laborde (1896).

Les laccases sont largement distribuées dans le monde vivant. Elles ont été détectées chez quelques bactéries terrestres ou aquatiques. La présence de laccases fut d'abord détectée chez la bactérie rhizosphérique *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993), puis chez la bactérie du sol *Bacillus sphaericus* (Claus & Filip, 1997) et plus récemment chez la bactérie marine *Marinomonas mediterranea* (Sanchez-Amat *et al.*, 2001). Un certain nombre de végétaux supérieurs présentent également des laccases dans leurs exsudats et au niveau du xylème où elles participeraient à la biosynthèse de la lignine (sycomore, pin, peuplier...) (Bligny & Douce, 1983 ; Lafayette *et al.*, 1999 ; Bao *et al.*, 1993 ; Richardson *et al.*, 2000). Mais les principaux porteurs et excréteurs de laccases sont les champignons. La liste d'espèces fongiques présentant cette enzyme ne cesse de s'allonger. Outre leur présence attendue chez de nombreux champignons dégradeurs du bois (pourriture blanche), les laccases grâce à la détection de leurs activités ou de leurs gènes ont été mises en évidence chez un certain nombre de champignons saprophytes dégradeurs de litière, d'ectomycorhiziens et de pathogènes (Tableaux 5 et 6). Gramss *et al.* (1998) ont démontré que les champignons saprophytes dégradeurs de litière testés présentaient une moyenne d'activité laccasique bien plus importante (100%) que celle des dégradeurs du bois (55%) qui ne présentaient qu'une activité à peine plus forte que celle des ectomycorhiziens (45%). Par conséquent, ces organismes, jusqu'ici peu étudiés, devraient faire l'objet d'études plus approfondies.

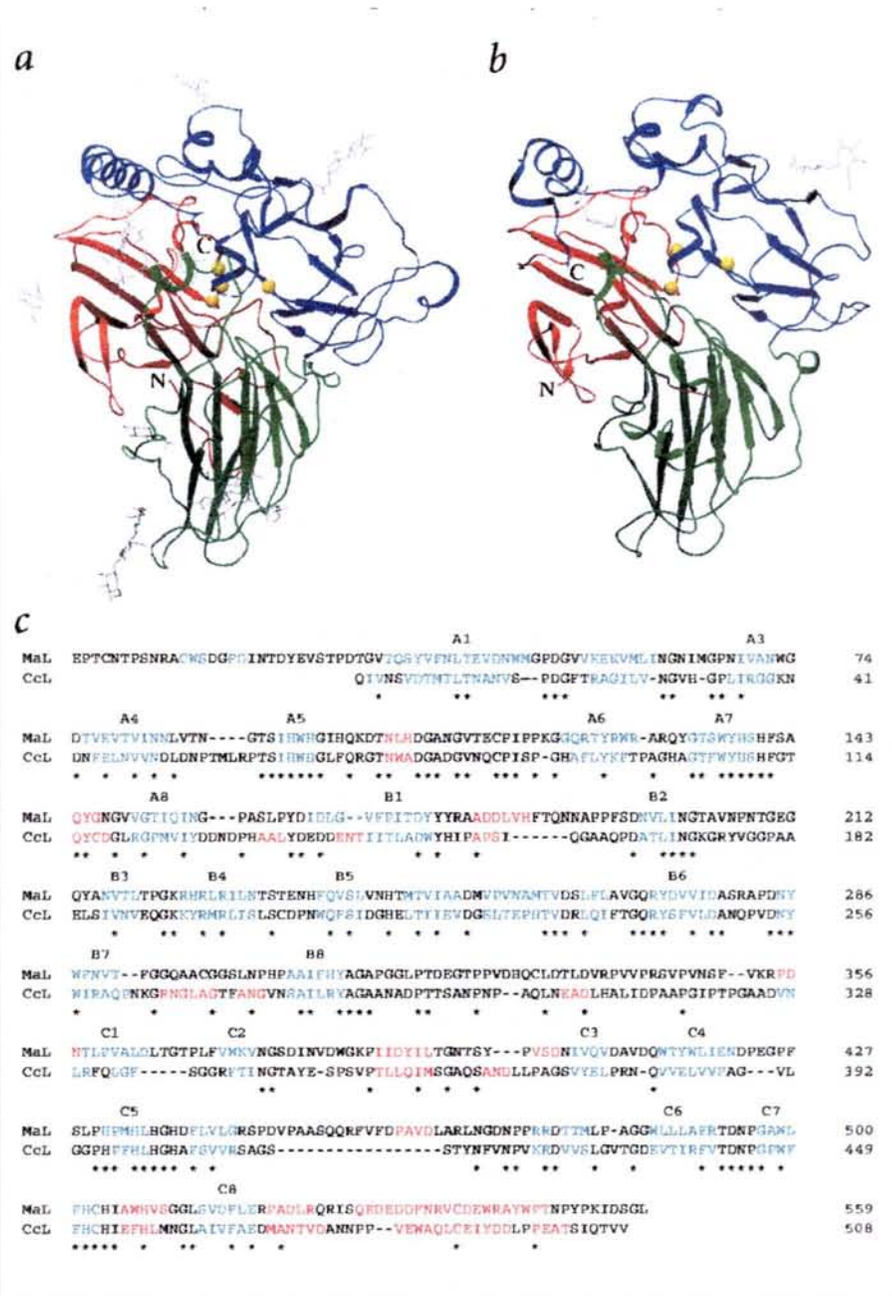


Figure 9. Représentation en trois dimensions d'une laccase d'Ascomycète (a) (*Melanocarpus albomyces*) et d 'une laccase de Basidiomycète (b) (*Coprinus cinereus*) d'après Hakulinen *et al.* (2002).

En (c) est présenté l'alignement des séquences protéiques appartenant aux deux espèces. Les astérisques indiquent les acides aminés conservés. Les unités de structure secondaire sont indiquées en couleur, les hélices en rouge et les brins β en vert.

4.2. Structure et fonction des laccases fongiques

4.2.1. Structure

En l'espace d'une vingtaine d'années, de nombreuses laccases fongiques ont été purifiées afin d'étudier leur structure et leur fonction. La majorité des informations obtenues concerne les laccases de pourritures blanches, dans une moindre mesure celles de pathogènes et de saprotrophes commercialisés (*Agaricus bisporus*), et peu ou pas d'ectomycorhiziens (Tableaux 5 et 6). Bien qu'il semble exister des activités laccasiques intracellulaires, les laccases sont avant tout des glycoprotéines extracellulaires (Schlosser *et al.*, 1997 ; Smith & Thurston, 1997). Le contenu en atomes de Cu varie entre deux et quatre (Thurston, 1994). Mais, étant donné le faible nombre de laccases présentant moins de quatre atomes de Cu, et le cas d'une enzyme de *Neurospora crassa* pour laquelle le contenu en Cu fut révisé pour cause de dénaturation lors de l'extraction protéique, Thurston (1994) suggère que toutes les laccases possèdent quatre atomes de Cu. Cependant, chez le Basidiomycète *Pleurotus ostreatus* (pourriture blanche), la laccase POXA1b possède quatre atomes de Cu alors que son homologue POXA1w présente un seul atome de cuivre, deux de zinc et un de fer (Giardina *et al.*, 1999). Comme le montre le tableau 6, le masse moléculaire des laccases est généralement de l'ordre de 65 kDa alors que le point isoélectrique est majoritairement compris entre 3 et 4. L'analyse de la molécule de glycane fixée à l'apoprotéine n'a été conduite que sur très peu de laccases. Cependant, il apparaît que ce glycane est généralement très riche en mannose (Smith & Thurston, 1997).

Des études portant sur la structure tertiaire des laccases fongiques ont mis en évidence des différences significatives entre les protéines de Basidiomycètes et celles d'Ascomycètes (Fig. 9). Ces différences de conformation se situent essentiellement au niveau des boucles entrant dans la formation du site d'accrochage du substrat (Hakulinen *et al.*, 2002). Ces différences sont telles que les séquences protéiques d'Ascomycètes sont estimées ne présenter que 20 à 30% d'homologie avec celles des Basidiomycètes. Cependant, les séquences protéiques codant les sites à cuivre apparaissent relativement conservées. Elles ont ainsi permis la création d'amorces plus ou moins spécifiques et l'amplification de gènes chez un certain nombre d'espèces fongiques (Tableaux 5 & 6). Ces analyses moléculaires ont entre autre permis la mise en évidence d'une famille de différents gènes laccasiques chez un bon nombre de

pourritures blanches (Wahleithner *et al.* 1996 ; Mansur *et al.*, 1997 ; Hoegger *et al.*, 2004) et l'analyse de la diversité de gènes laccasiques d'Ascomycètes dans un marais salé nord-américain (Lyons *et al.*, 2003).

4.2.2. Fonction

Enzyme impliquée dans des phénomènes de dégradation

Les laccases sont des phénol-oxydases qui catalysent l'oxydation de composés phénoliques et d'amines aromatiques, oxydation qui est couplée à une réduction de molécules d'oxygène en eau (Thurston, 1994). Le type et le nombre de molécules phénoliques oxydées varient fortement selon l'enzyme. De plus, les laccases sont connues pour être des exo-enzymes possédant une large gamme de substrats. Chaque espèce fongique possède plusieurs isoenzymes laccasiques qui présentent des activités et des processus de régulation différents (Muñoz *et al.*, 1997 ; Wahleithner *et al.*, 1996). Bien que la majorité d'entre elles soit sur-exprimée en présence de Cu et réprimée en présence de concentrations en azote élevées, chaque laccase présente une affinité propre envers tel ou tel composé chimique. Par conséquent, il est très difficile de définir la fonction réelle de cette enzyme oxydative au sein de la communauté fongique.

Diverses études en laboratoire ont démontré la capacité des laccases à dégrader une large gamme d'hydrocarbones aromatiques polycycliques (HAP) comme l'anthracène, le chrysène, le fluoranthène, et le pyrène (Majcherczyk *et al.*, 1998 ; Johannes & Majcherczyk, 2000). Cette dégradation implique souvent l'intervention de médiateurs naturels excrétés par le champignon lui même (Johannes & Majcherczyk, 2000). C'est la présence de ces mêmes médiateurs naturels qui explique que les laccases peuvent, malgré leur faible potentiel d'oxydoréduction par rapport aux LiPs et aux MnPs, minéraliser complètement les molécules de lignine. En effet, il a été démontré que les laccases pouvaient oxyder facilement les composés non phénoliques de la lignine en présence médiateurs artificiels, tels le 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) et le 1-hydrobenzotriazole (HBT) (Bourbonnais *et al.*, 1995, 1998), ou en présence de médiateurs naturels tel un métabolite fongique comme l'acide 3-hydroxyanthranilique (3HAA) (Eggert *et*

al., 1996a). La laccase présente également un fort pouvoir oxydant sur les tannins (Arora & Sandhu, 1984), qui sont, tout comme la lignine, des composés abondamment formés dans les tissus végétaux et qui se retrouvent accumulés fortement par la suite dans la litière. Par voie de conséquence, les laccases devraient avoir un rôle important dans la dégradation de la litière et donc dans le cycle du carbone. Ce rôle prépondérant des laccases fongiques dans les processus de dégradation de la litière a été par ailleurs suggéré par Criquet *et al.* (1999, 2000). Leurs travaux, portant sur les processus de dégradation de la litière du chêne vert en zone méditerranéenne, ont démontré que les laccases représentaient l'activité phénol-oxydasique annuelle dominante (Criquet *et al.*, 2000). En effet, parmi les trois autres activités phénol-oxydasiques mesurées (lignine peroxydase, peroxydase à manganèse et tyrosinase) entre l'automne 1997 et l'automne 1998, seule une activité peroxydase à manganèse fut détectée au cours de l'automne 1997. L'activité laccasique détectable toute l'année présentait cependant un cycle saisonnier avec des valeurs maximales en automne (Criquet *et al.*, 2000).

Enzyme impliquée dans des phénomènes de biosynthèse

Les laccases sont impliquées dans des phénomènes de biosynthèse liés au métabolisme secondaire du champignon. Plusieurs études ont démontré que les laccases interviennent dans la synthèse de pigments. La couleur rouge du carpophore et du mycélium du Basidiomycète *Pycnoporus cinnabarinus* est due à la formation d'un pigment, l'acide cinnabarinique, par oxydation de l'acide 3-hydroxyanthranilique (3HAA) sous l'effet des laccases (Eggert *et al.*, 1995). La couleur verte du conidium d'*Aspergillus nidulans* et la synthèse de mélanine chez le pathogène *Cryptococcus neoformans* seraient également sous l'influence d'activités laccasiques. La laccase d'*Aspergillus nidulans* convertirait un précurseur de couleur jaune en pigment vert (Scherer & Fischer, 2001) et celle de *Cryptococcus neoformans* oxyderait les catécholamines en mélanine (Liu *et al.*, 1999). Par la production de mélanine et par l'oxydation du fer III du phagosome, la laccase protégerait *Cryptococcus neoformans* des macrophages alvéolaires et jouerait un rôle important dans la pathogénéicité de celui-ci (Liu *et al.*, 1999). Les laccases sont fortement impliquées, par des mécanismes encore inconnus, dans les phénomènes de croissance végétative mycélienne (Das *et al.*, 1997), de formation des carpophores (Zhao & Kwan, 1999) et dans la sporulation (Chakraborty *et al.*, 2000).

L'un des processus de biosynthèse le plus important pour les sols est celui de la formation des substances humiques composant une partie de l'humus. Lors de la dégradation de la MO fraîche, une partie des composés simples libérés par les activités oxydatives microbiennes est réutilisée comme substrat pour la formation de nouvelles molécules complexes (les substances humiques). Cette humification peut être faite par l'organisme même qui a provoqué la fragmentation. La polymérisation et la formation de polymères solubles (substances humiques solubles) ont été obtenues lors de l'addition de la fraction hydrophobe acide de la MO, issue d'un compost municipal solide, à une solution contenant la laccase de *Chaetomium thermophilium* et du guaiacol (médiateur) (Chefetz *et al.*, 1998). Ce résultat suggère que les laccases fongiques puissent avoir un rôle important dans l'humification des sols. De plus, les forts taux d'adsorption de laccases sur les substances humiques (facteur favorisant l'activité oxydative des laccases) mesurés par Criquet *et al.* (2000) au cours des mois où les activités laccasiques totales sont élevées (et réciproquement) dans la litière de chêne vert confirment l'implication potentielle des laccases dans la biosynthèse et la dégradation des substances humiques.

V. Objectifs

Les micro-organismes du sol sont extrêmement diversifiés. Ils appartiennent à des groupes très différents (bactéries, champignons, protozoaires...) et assurent le bon fonctionnement des cycles bio-géochimiques. Les laccases fongiques en intervenant à la fois dans deux processus fondamentaux des sols, que sont la dégradation de la MOS et l'humification, jouent très vraisemblablement un rôle prépondérant dans le cycle du carbone. Pour apprécier ce rôle, et par conséquent, celui des organismes qui possèdent ces enzymes, il est nécessaire d'identifier la diversité génétique et fonctionnelle des champignons concernés. De telles études doivent être conduites directement sur des échantillons de sol, sans extraction préalable des organismes, afin de prendre en compte les espèces non cultivables. Une telle approche est désormais possible grâce aux progrès réalisés ces dernières années en biologie moléculaire qui permettent à la fois d'extraire de l'ADN et de l'ARN de substrats complexes tels les sols. Par conséquent, les objectifs spécifiques du présent projet étaient:

(1) De développer et d'évaluer une méthode permettant d'analyser spécifiquement par PCR la diversité de gènes laccasiques fongiques, et plus particulièrement ceux de champignons Basidiomycètes, dans les sols (Chapitre I).

(2) D'évaluer la robustesse et la pertinence de cette méthode moléculaire en réalisant une étude comparative visant à déterminer quel type de sol, entre sol agricole soumis à différents traitements et sols forestiers, possède la plus importante diversité en gènes laccasiques. Une étude approfondie de la distribution spatiale de ces gènes laccasiques, et donc des espèces fongiques porteuses, sur ce type de sol complétera cette analyse de la diversité génétique (Chapitre II).

(3) D'optimiser l'analyse par RT-PCR et PCR semi-quantitative des profils d'ARNm codant ces laccases fongiques telluriques. En effet, si la détection des gènes représente une information primordiale et considérable sur le potentiel fongique laccasique dans les sols, l'étude de l'expression de ceux-ci permet de mieux estimer leur réelle activité (Chapitre III)

Les méthodes mises en place afin d'atteindre ces objectifs, ainsi que les résultats obtenus, sont présentés sous forme de publications précédées d'un résumé rédigé en français.

CHAPITRE I

Développement et évaluation d'une méthode moléculaire permettant d'analyser spécifiquement par PCR la diversité des gènes laccasiques de Basidiomycètes dans les sols.

Diversité des gènes laccasiques de Basidiomycètes dans un sol forestier

Les exo-enzymes oxydatives fongiques, à large gamme de substrats telles les peroxydases, les tyrosinases et les laccases, jouent un rôle primordial dans la minéralisation et dans la stabilisation de la matière organique dans les sols. Grâce à leur large distribution parmi les espèces fongiques telluriques et à leurs structures protéiques et géniques bien connues, les laccases apparaissent comme des marqueurs appropriés pour étudier les champignons présentant ce potentiel oxydatif dans les sols. Un couple d'amorces PCR dégénérées Cu1F/Cu2R, spécifiques des Basidiomycètes, a été désigné pour rendre compte de la diversité *in situ* des gènes laccasiques dans les sols. L'amplification par PCR de ces gènes sur de l'ADN extrait de cultures mycéliennes et de carpophores appartenant à un large spectre de Basidiomycètes, regroupant tous les groupes fonctionnels (saprophytes, symbiontes, et pathogènes), a produit plusieurs fragments d'environ 200 pb. L'analyse cladistique (méthode de neighbor-joining) des séquences laccasiques amplifiées montre une nette spécificité d'espèce. Elle révèle aussi que la plupart des taxons fongiques possèdent plusieurs gènes laccasiques présentant une grande divergence de séquences. La présence de familles multi-géniques et le manque de séquences de référence dans les bases de données (GenBank du NCBI) empêchent l'attribution systématique des gènes laccasiques amplifiés d'origine inconnue à un taxon spécifique. L'amplification de séquences laccasiques à partir d'ADN extrait d'un sol brun forestier (Cambisol dystrique), montre une distribution spécifique des gènes laccasiques et donc des espèces fongiques porteuses dans les différents horizons de ce sol (O_h, A_h, B_v). L'horizon le plus organique (O_h) présente la plus haute diversité génétique. Contrairement, aux champignons ectomycorhiziens, les espèces saprophytes sont restreintes aux horizons de surface et présentent une grande diversité de gènes laccasiques.

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

Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil*

Patricia Luis[a,b] , Grit Walther[a], Harald Kellner[a] , Francis Martin[b] and François Buscot[a]

[a]Institute of Ecology, Department of Environmental Science, University of Jena, Dornburger Str. 159, D-07743 Jena, Germany

[b]UMR INRA/UHP 1136 "Interactions Arbres/Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France

Present address: Institute of Botany, Department of Terrestrial Ecology, University of Leipzig, Johannisallee 21, D-04103 Leipzig, Germany

*** A paraître dans Soil Biology & Biochemistry**

Abstract

Fungal oxidative exo-enzymes lacking substrate specificity play a central role in the cycling of soil organic matter. Due to their broad ecological impact and available knowledge of their gene structure, laccases appeared to be appropriate markers to monitor fungi with this kind of oxidative potential in soils. A degenerate PCR-primer pair Cu1F/Cu2R, specific for basidiomycetes, was designed to assess directly the diversity of laccase genes in soils. PCR amplification of mycelial cultures and fruit-bodies of a wide spectrum of basidiomycetes, covering all functional groups (saprophytes, symbionts, and pathogens), produced multiple DNA fragments around 200 bp. A neighbor-joining tree analysis of the PCR-amplified laccase sequences showed a clear species-specificity, but also revealed that most fungal taxa possess several laccase genes showing a large sequence divergence. This sequence diversity precluded the systematic attribution of amplified laccase of unknown origin to specific taxa. Amplification of laccase sequences from DNA, extracted from a brown (moder) forest soil, showed a specific distribution of laccase genes and of the corresponding fungal species in the various soil horizons (O_h, A_h, B_v). The most organic O_h-horizon displayed the highest gene diversity. Saprophytic fungi appeared to be less widespread through the soil horizons and displayed a higher diversity of laccase genes than the mycorrhizal ones.

Keywords: Laccases, gene diversity, soil DNA, basidiomycetes, degenerate PCR primers

1. Introduction

An important part of the potentially bio-available global carbon pool is bound as organic compounds in soils (Killham, 1994). Both, the formation and mineralization of such compounds result essentially from biological processes in which microorganisms are highly involved (Emmerling *et al.*, 2002). With 10^4 to 10^6 colony-forming units per gram dry weight of soil and 37 to 184 g dry weight of mycelium per square meter, fungi represent a major component of the soil biomass (Thorn, 1997). Concerning the turnover of the soil organic matter (SOM), they play an important role due to the production of oxidative exo-enzymes lacking substrate specificity such as manganese peroxidases, lignin peroxidases and laccases (Chefetz *et al.*, 1998; Daina *et al.*, 2002; Tuomela *et al.*, 2002). Although, measuring the presence, abundance and diversity of soil fungi with this kind of oxidative potential appears to be necessary, it is a challenging task since it has been estimated that only 10% of fungal species have been described due to culture limitations (Thorn, 1997).

Recently, the development of molecular methods has opened new perspectives for investigations of functions of fungal groups in soils without cultivation steps. After extraction of total soil DNA, fungal diversity assessment by specific PCR amplifications of ribosomal DNA regions followed by cloning/sequencing (Landeweert *et al.*, 2003), denaturing/temperature gradient gel electrophoresis (D/TGGE) (Emmerling *et al.*, 2002) or terminal restriction fragment length polymorphism (Lord *et al.*, 2002; Dickie *et al.*, 2002) have provided ecological information about the fungal community structure in soils. Application of molecular techniques to target genes could reveal specific corresponding functions of soil fungi. However to our knowledge, monitoring of fungal genes involved in specific functions in soils has not yet been reported.

Fungal laccases (benzenediol:oxygen oxido-reductase, EC 1.10.3.2), that usually contain four relatively conserved regions that bind the copper atoms directly involved in their active site (Thurston, 1994), are good candidates for a molecular approach in soil fungal ecology. Indeed, as laccases are the most widespread exo-enzymes in fungi and as they present conserved regions at the protein and gene level, it is possible to design primers compatible with a wide range of fungi. Laccases catalyze the oxidation of phenolic compounds and aromatic amines coupled to the reduction of molecular oxygen to water (Thurston, 1994). Despite their relatively low oxido-

reductive potential compared to manganese and lignin peroxidases, they can also oxidize non-phenolic components in the presence of appropriate radical mediators such as artificial substrates like 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) and 1-hydrobenzotriazole (HBT) (Bourbonnais *et al.*, 1995, 1998) or fungal metabolites naturally present in soils such as 3-hydroxyanthranilic acid (3HAA) (Eggert *et al.*, 1996). Laccases are therefore able to completely degrade lignins (Eggert *et al.*, 1997) and appear to be an important actor in SOM turnover. Recent studies showed the presence of laccase activity in forest litters (Criquet *et al.*, 1999) and several novel laccase genes have been obtained from fungi isolated from soils (Farnet *et al.*, 2002). The present study sought to assess the laccase gene diversity of ectomycorrhizal and saprophytic basidiomycetes in a forest soil using PCR.

2. Materials and Methods

2.1. Soil sampling and organisms

A brown forest soil from "Steigerwald" (49°52'26"N, 10°27'54"E), an experimental station of the Institute of Ecosystem Research (BITÖK) of the University of Bayreuth (Bavaria) localized in a mixed oak-beech forest, was investigated. This soil is characterized by a fine moder humus layer, a pH of 4.2 and a C/N ratio of 20 (Seiler, 1995). The turnover of organic matter in this soil type is rapid, with a low accumulation in the lower horizons. The organic horizon O_h (1 to 0 cm), corresponding to the fine humus layer, contains about 19.0% of organic carbon (C_{org}), while the organo-mineral A_h (0 to 6 cm) and the mineral B_v (6 to 34 cm) horizons present respectively 3.4% and 1.2% of C_{org}. Within a plot of 6 x 6 m^2, five soil cores (12 cm of diameter) were randomly collected in September 2002 and divided into O_h, A_h and B_v horizons. Soil samples were kept below 10°C during transportation. Fresh fruit-bodies from all fungal species present in the field site at this time were also collected. Pure cultures of some species were obtained from spores or fruit-bodies. For the non-cultivable species, small pieces of fruit-bodies were used for the molecular analyzes (Table 1a). Additionally, culture collection strains were used (Table 1b). All fungal strains were maintained at room temperature in Petri dishes containing 2% malt extract (ME) agar (20 g l^{-1} malt extract, 15 g l^{-1} agar, Merck, Darmstadt, Germany).

Table 1. Fungal strains used in the study.

Species	Material type	ABTS test	PCR products	Accession numbers
a-From the field site				
Agaricales-Agaricaceae				
Macrolepiota procera	M	+	+	AJ542610; AJ542611
Macrolepiota rachodes	F	ND	0	
Agaricales-Amamitaceae				
Amanita citrina	F	ND	+	AJ542646; AJ542647
Limacella illinata	F	ND	0	
Agaricales-Coprinaceae				
Psathyrella cf. *dicrani*	F	ND	+	AJ542620
Psathyrella corrugis	M	0	+	AJ542617 to AJ542619
Psathyrella murcida	M	0	+	AJ542612; AJ542613
Agaricales-Cortinariaceae				
Cortinarius cf. *alboviolaceus*	F	ND	0	
Cortinarius delibutus	F	ND	0	
Cortinarius cf. *flexipes*	F	ND	+	AJ542638
Cortinarius sp.	F	ND	0	
Hebeloma radicosum	M	+	+	AJ542631 to AJ542633
Hebeloma sp.	F	ND	0	
Agaricales-Hygrophoraceae				
Hygrophorus cossus	F	ND	0	
Agaricales-Tricholomataceae				
Clitocybe candidans	M	0	0	
Clitocybe clavipes	M	+	+	AJ542635
Clitocybe fuligineipes	M	+	+	AJ542634
Clitocybe nebularis	F	ND	+	AJ542626; AJ542627
Clitocybe odora	M	0	0	
Collybia butyracea	M	+	+	AJ542637
Collybia peronata	M	0	+	AJ542636
Laccaria amethystina	F	ND	0	
Laccaria laccata	F	ND	0	
Lepista flaccida	M	0	+	AJ542595; AJ542596
Lepista nuda	M	+	+	AJ420347; AJ542593; AJ542594
Marasmius alliaceus	M	0	+	AJ542603 to AJ542606
Megacollybia platyphylla	M	+	+	AJ542645
Mycena cinerella	M	+	+	AJ542607 to AJ542609
Mycena crocata	M	+	+	AJ542585 to AJ542592
Mycena galopus	M	+	+	AJ542639 to AJ542642
Mycena pura	F	ND	+	AJ542630
Mycena rosea	F	ND	+	AJ542628; AJ542629
Mycena zephirus	M	0	+	AJ542600 to AJ542602
Agaricales-Russulaceae				
Lactarius blennius	F	ND	+	AJ542649
Lactarius subdulcis	M	+	+	AJ542650
Russula atropurpurea	F	ND	+	AJ542624
Russula mairei	F	ND	+	AJ542625
Russula nigricans	F	ND	+	AJ420340; AJ542621; AJ542622
Russula ochroleuca	F	ND	+	AJ542623
Agaricales-Strophariaceae				
Stropharia squamosa	M	+	+	AJ542597 to AJ542599
Aphyllophorales-Clavariaceae				
Macrotyphula juncea	M	+	+	AJ542614 to AJ542616
Aphyllophorales-Clavulinaceae				
Clavinula cristata	F	ND	0	

Boletales-Boletaceae				
Strobilomyces floccopus	F	ND	0	
Xerocomus chrysenteron	M	0	+	AJ542643; AJ542644
Boletales-Paxillaceae				
Paxillus involutus	M	0	+	AJ542648
Lycoperdales- Lycoperdaceae				
Lycoperdon perlatum	F	ND	0	
Sclerodermatales-Sclerodermataceae				
Scleroderma areolatum	F	ND	0	
Pezizales-Helvellaceae*				
Helvella crispa	F	ND	0	
b- From collections				
Agaricales-Polyporaceae				
Lentinula edodes	M	+	+	AJ420171; AJ420172
Pleurotus ostreatus	M	+	+	AJ420179 to AJ420181
Pleurotus cornucopiae	M	+	+	AJ420173; AJ420174; AJ420336; AJ420337
Agaricales-Strophariaceae				
Hypholoma sp.	M	+	+	AJ420177; AJ420178
Agaricales-Tricholomataceae				
Collybia fusipes	M	+	+	AJ420169; AJ420170
Aphyllophorales-Ganodermataceae				
Ganoderma lucidum	M	+	+	AJ420176; AJ185275
Aphyllophorales-Polyporaceae				
Pycnoporus cinnabarinus	M	+	+	AJ420334; AJ420335; AJ420182
Trametes versicolor	M	+	+	L78077
Auriculariales-Sebacinaceae				
Piriformospora indica	M	+	+	AJ542651
Diaporthales-Cryphonectria-Endothia complex*				
Cryphonectria parasitica	M	+	0	
Eurotiales-Trichocomaceae*				
Aspergillus nidulans	M	+	0	
Mycosphaerellaceae-mitosporic Mycosphaerellaceae*				
Cladosporium sp.	M	+	0	
Pezizales-Morchellaceae*				
Morchella esculenta	M	+	0	
Verpa digitaliformis	M	+	0	
Pezizomycotina-Dothideomycetes*				
Cenococcum geophilum	M	+	0	
Sordariales-Lasiosphaeriaceae*				
Podospora anserina	M	+	0	
Sordariales-Sordariaceae*				
Neurospora crassa	M	+	0	

(M) indicates the mycelium cultures and (F) the fruit-bodies. The sign (+) represents a positive result, (0) a negative one, and (ND) a not done experiment. The arrows (*) indicate the ascomycete families tested.

2.2. DNA extractions

2.2.1. DNA extraction from fresh fruit-bodies and mycelial cultures

Freshly collected fruit-bodies were carefully washed and the inner part of the stipe was cut into small pieces, freeze-dried and conserved at - 20°C. Mycelium cultures were obtained from some of these collected fruit-bodies. The fungal cultures were grown on ME agar for one week at room temperature. The mycelium was collected by scraping and immediately frozen in liquid nitrogen. For *Collybia fusipes*, a longer cultivation time was required. The genomic DNA was directly isolated from frozen material after grinding using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer.

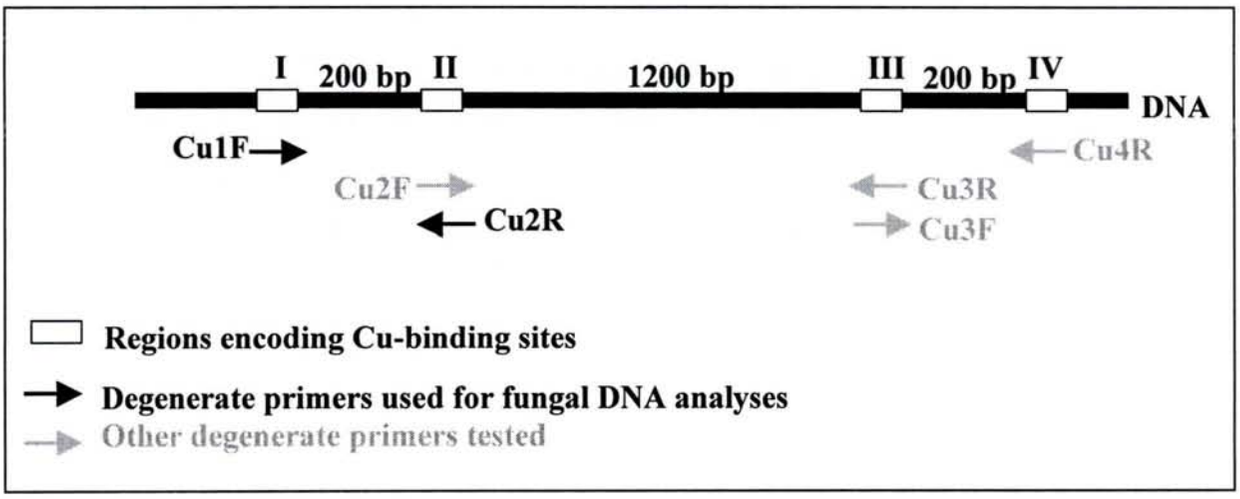
2.2.2. DNA extraction from soil samples

DNA extraction from soil cores was performed within a few hours of collecting the samples. Roots and leaves were discarded and samples corresponding to the different horizons were homogenized. Genomic DNA was isolated from 0.5 g of soil using the FastDNA™ Spin kit for soil (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany) with a modified protocol, where instead of letting the GLASSMILK settle (protocol, step 7), the Silica-DNA pellets obtained after brief centrifugation were washed 10 times with a solution of guanidine thiocyanate (5.5 M, pH 7). The final pellets were resuspended in 1 ml of guanidine thiocyanate, transferred to the SPIN filter, and after 1 min of centrifugation at 14 000g, the DNA extraction proceeded according to the manufacturer's protocol (step 8).

2.3. Design of degenerate primers specific for basidiomycetes

Fungal laccase proteins typically contain four copper atoms per sub-unit. Several structural and functional studies have shown that one cysteine and 10 histidine residues are involved in binding the atoms, and that the protein sequences around these domains are highly conserved (Thurston, 1994). To perform single and nested PCRs from parts of the basidiomycete laccase genes, six degenerate primers were designed for these four regions according to the process described by D'Souza *et al.* (1996). All primers used in the study were synthesized by Invitrogen Life Technologies

a



b

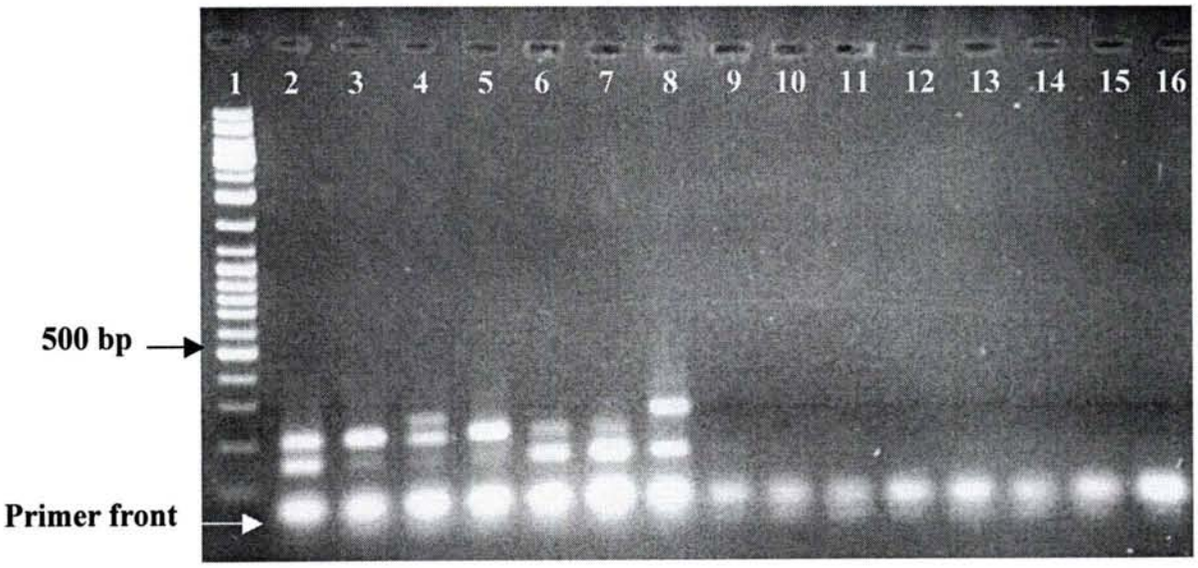


Fig. 1. Amplification of basidiomycete-laccase gene fragments from nucleic acids isolated from mycelial cultures or soil samples. (a) General structure of the fungal laccase gene and primer combinations tested. Only the pair Cu1F/Cu2R gave satisfying results and was used to amplify a 200 bp fragment between regions I and II in a single PCR. (b) Specificity of the primers Cu1F/Cu2R for basidiomycetes. Two % Agarose gel electrophoresis of fragments of laccase genes amplified by PCR on basidiomycetes (2 to 8) and ascomycetes (9 to 15) mycelial cultures. Lane 1, 100 bp DNA ladder mix (MBI fermentas); 2, *Pycnoporus cinnabarinus*; 3, *Ganoderma lucidum*; 4, *Pleurotus ostreatus*; 5, *Trametes versicolor*; 6, *Lentinula edodes*; 7, *Hypholoma* sp.; 8, *Collybia fusipes*; 9, *Neurospora crassa*; 10, *Aspergillus nidulans*; 11, *Cladosporium* sp.; 12, *Cryphonectria parasitica;* 13, *Podospora anserina*; 14, *Morchella esculenta*; 15, *Cenococcum geophilum*; and 16, negative control without DNA.

(Karlsruhe, Germany). In preliminary studies, various pairs of primers (Fig. 1a) were tested on DNA extracts from mycelial cultures of the strain collection listed in Table 1b. This collection comprised several basidiomycetes and ascomycetes known to have laccase genes and for which the presence of the corresponding exo-enzyme activity was verified by a simple ABTS test (Matsumura *et al.*, 1987). The single PCR performed with the primers Cu1F (5'-CAT(C) TGG CAT(C) GGN TTT(C) TTT(C) CA-3') and Cu2R (5'-G G(A)CT GTG GTA CCA GAA NGT NCC -3') gave the better results, in terms of positive amplification and specificity for basidiomycetes (Fig. 1b) and was thus used in the following investigations.

2.4. PCR amplification

Genomic DNA isolated from fungal material or from soil samples was used as a template in single PCR. For the amplifications, 3 µl of the DNA extracts were added to a 50 µl reaction mixture containing 5 µl of 10x *Taq* buffer with $MgCl_2$ (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany), 4 µl of dNTPs (10 mM each) (MBI fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 1 µl of each primer (60 µM), and 0.2 µl of *Taq* DNA polymerase (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany). The reaction mixtures were overlaid with two drops of sterile oil and PCRs were run on a Master cycler gradient system (Eppendorf, Hamburg, Germany) with an initial cycle of denaturation (3 min at 94°C) followed by 35 cycles with denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 50°C) and elongation (2 min at 72°C), and by a final elongation (10 min at 72°C). A control reaction without template was run to rule out the presence of contaminant DNA. Additionally, amplification of the internal transcribed spacer (ITS) in the nuclear ribosomal DNA region was performed with each DNA extract to estimate its quality and, especially in the case of amplifications from soil extracts, to detect the presence of possible inhibitory substances. Amplification of the laccase sequences from DNA of *Pycnoporus cinnabarinus* was also carried out in each series of samples as a positive control to detect PCR failures.

Seven microliters of each amplification product were loaded onto a 2% agarose gel (Applichem, Darmstadt, Germany) and electrophoresed in Tris-acetate-EDTA buffer for 45 min at 80 V cm^{-1}. The 100 bp DNA size ladder mix (MBI fermentas, St Leon-Rot, Germany) was run in a separate lane. The gels were stained with ethidium bromide and the DNA bands visualized and photographed under UV light.

2.5. DNA sequencing and sequence analysis

PCR products were directly cloned into the pCR 4-TOPO vector, using the TOPO TA Cloning kit for sequencing (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) as described by the manufacturer. The plasmid DNA, containing the PCR product, was extracted from 1.5 ml of *Escherichia coli* TOP10 chemically competent cells using the Perfectprep plasmid mini kit (Eppendorf, Hamburg, Germany). Cloned products were then sequenced in both directions with M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') and M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') fluorescent primers and the Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) on a DNA sequencer Long Reader 4200 (LI-COR, Nebraska, USA).

The nucleotide sequences obtained for the soil samples have been deposited at EMBL under the accession numbers AJ420334; AJ420350; AJ420351; AJ540285 to AJ540297; AJ540236 to AJ540278; AJ540280 to AJ540284. The accession numbers of the sequences generated with the culture collection and the fungi collected from the field are indexed in Table 1.

Reverse, complement, or inverse sequences were generated by the IUPAC program (http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html) and sequences matches done using the GenBank DNA database and the Gapped BlastN (NCBI) search algorithm (Altschul *et al.*, 1997). The coding regions and protein sequences were deduced after alignment of each DNA sequence with known laccase mRNA (e.g. *Trametes versicolor*; accession n°L78077). The deduced coding regions of the 154 sequences issued from the present survey and the 19 additional laccase sequences retrieved from GenBank were aligned using the program MultAlin (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html; IBCP, Lyon, France; Corpet, 1988). The resulting multiple alignments were optimized visually. Only unambiguous alignments were used in the phylogenetic and distance analyses. The aligned sequences were exported to a NEXUS file and analyzed using PAUP*4.0b10 (Swofford, 1998). The final alignments of the laccase regions have a total of 100 unambiguously aligned sites and 94 characters were parsimony-informative. The final alignments of the deduced laccase coding regions are available on request. The final trees were constructed using the neighbor-joining (NJ) method.

The approach selected for the analysis of the molecular data set was the Kimura two-parameter distance method (Kimura, 1980). All characters were treated with equal weight and the bootstrapping was performed with 1000 replications. Final results were compared to the 50% majority-rule consensus trees using maximum parsimony (MP) analysis. The MP trees were performed using the heuristic search option with 50 random sequence additions and tree bissection reconnection (TBR) branch-swapping (Swofford, 1998). Trees were drawn with CorelDraw 11. Laccase sequences of the ascomycetes *Colletotrichum lagenarium* (GenBank accession n°AB055709), *Gaeumannomyces graminis* (GenBank accession n°AJ437319) and *Botryotinia fuckeliana* (GenBank accession n°AF243855) were used as out-groups to root the trees.

3. Results

3.1. Amplification of laccase genes from basidiomycetes

From the primer combinations tested on culture material, only the primer pair Cu1F/Cu2R consistently gave PCR products. According to available nucleotide sequences of laccase genes from basidiomycetes, the PCR performed with this primer pair was expected to produce fragments of approximately 200 bp (Fig. 1a). For all strains of basidiomycetes tested (Table 1b), agarose gel electrophoresis of the single-PCR products obtained with the primer pair Cu1F/Cu2R showed DNA fragments with the expected-size ranging from 140 to 300 bp (Fig. 1b). *Pycnoporus cinnabarinus*, *Ganoderma lucidum, Trametes versicolor*, *Lentinula edodes* and *Hypholoma* sp. gave two fragments of 142 and 200 bp. *Pleurotus ostreatus* displayed an additional 240 bp band (Fig. 1b), whereas the phytopathogenic fungus *Collybia fusipes* showed two fragments of 142 and 250 bp. The absence of PCR product for all ascomycetes tested (Fig. 1b) confirmed the specificity of the primers for basidiomycetes.

After sequencing fragments of different size, the nucleotide sequences obtained were compared to the GenBank nucleotide database and showed that all of the PCR products correspond to regions of basidiomycete laccase genes. This result was supported by the high similarity levels revealed by the alignment of the predicted amino acid sequences (data not shown). The 200 bp gene fragments amplified from mycelial cultures of *Trametes versicolor* and *Ganoderma lucidum* respectively

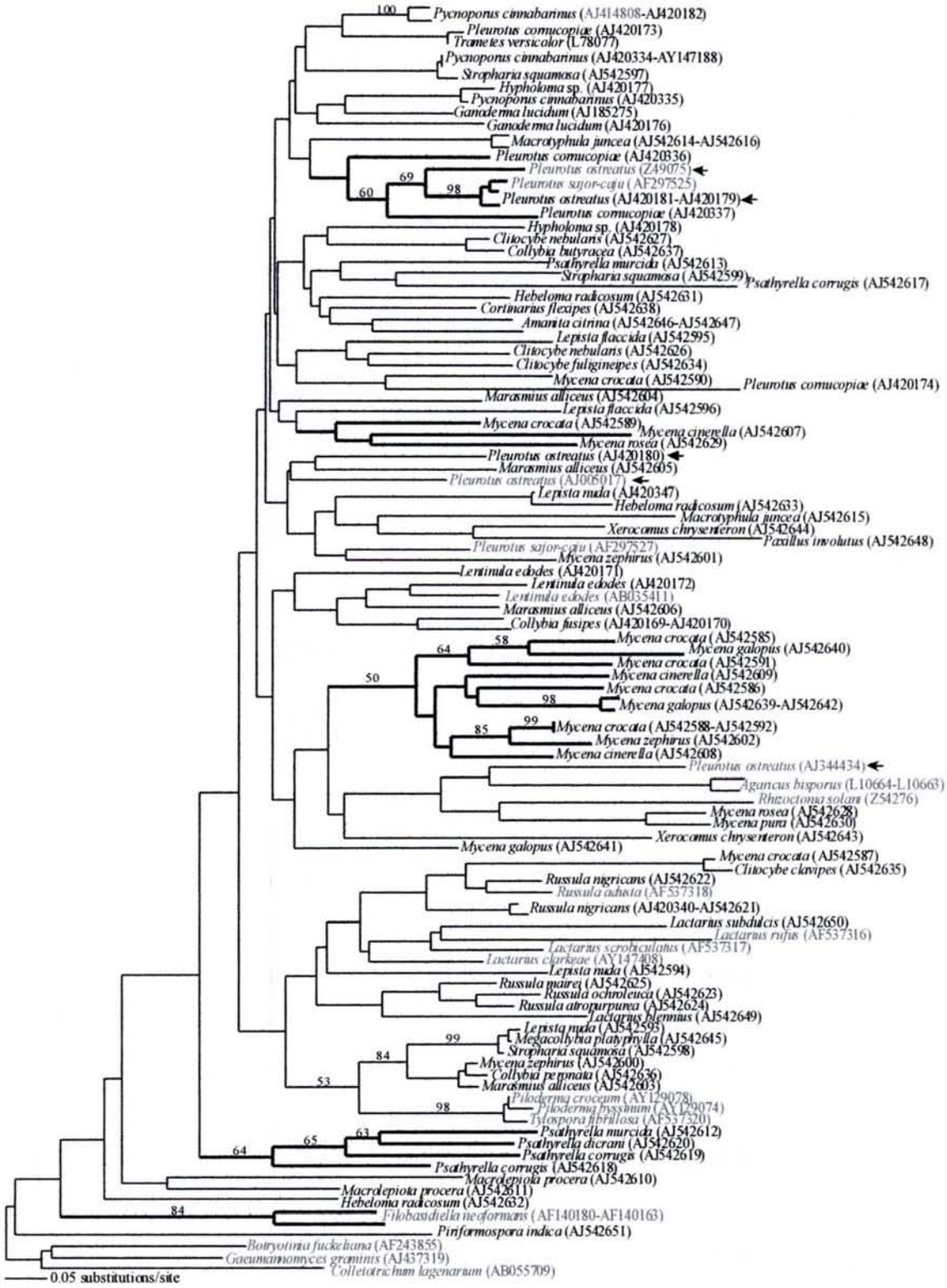


Fig. 2. Neighbor-joining tree representing the genetic distances between the 90 laccase gene fragments obtained by PCR from the fruit-bodies collected from the Steigerwald forest site and from the fungal collection strains (both in black fonts), and the 19 sequences retrieved from GenBank (in grey characters). The tree was rooted using the laccase sequences of the ascomycetes *Botryotinia fuckeliana* (AF243855), *Colletotrichum lagenarium* (AB055709) and *Gaeumannomyces graminis* (AJ437319). Bootstrapping was performed with 1000 replications in a Kimura 2-parameter analysis. The bold branches indicate the sequences that are genus specific. The arrows indicate the position of the diverse *Pleurotus ostreatus* laccase-gene sequences.

displayed 100% similarity with regions of the previously described laccase genes of *Trametes versicolor* (*lcc1*; X84683) and *Ganoderma lucidum* (AF185275). The 200 bp amplification fragment of the *Pleurotus cornucopiae* strain (AJ420173) presented 94% similarity with the *lcc4* laccase gene of *Trametes villosa* (L78077). Other amplified products (140 to 300 bp) corresponded to novel sequences and lacked high similarity to known laccase genes.

The alignment of the new nucleotide sequences obtained with known laccase genes and protein-coding regions (cDNA) retrieved from GenBank was used to identify the position of introns and exons. Introns appeared to be localized between positions: (1) 45 and 155 for *Collybia fusipes* (AJ420169; AJ420170), *Lentinula edodes* (AJ420171), *Pleurotus cornucopiae* (AJ420174) and *Pleurotus ostreatus* (AJ420180), and (2) 121 and 190 for *Hypholoma* sp. (AJ420177), *Pycnoporus cinnabarinus* (AJ420175), *Pleurotus cornucopiae* (AJ420173) and *Ganoderma lucidum* (AJ420176). In contrast, no intron was detected in the amplified laccase sequences from *Lentinula edodes* (AJ420172) and *Hypholoma* sp. (AJ420178).

The sequencing of several clones from each amplification product revealed that a single PCR band could comprise fragments of different laccase genes, which is reflected by differences in the deduced protein sequences. Sequences of at least two different laccase genes were obtained with the single PCR fragment of *Pleurotus cornucopiae* (Fig. 2).

3.2. Sequence analysis of PCR products obtained from soil DNA

The primer pair Cu1F/Cu2R was used to amplify laccase-gene sequences from basidiomycetes present in the brown (moder) forest soil from the experimental station of Steigerwald (Bavaria). The fragments amplified from the DNA extracted from the various soil horizons were cloned into plasmids and subsequently amplified from bacterial clones. Although, they showed a significant size heterogeneity it was possible to distinguish two main groups of fragment sizes, i.e. one around 140 bp and the other around 200 bp. Some longer fragments around 300, 350 and 380 bp were also amplified by single PCR from the most mineral horizons of this forest soil. As a sequence analysis of these longer fragments revealed no similarity with known laccase genes, they were discarded (see section 4). Five soil cores of the brown forest soil of Steigerwald were analyzed.

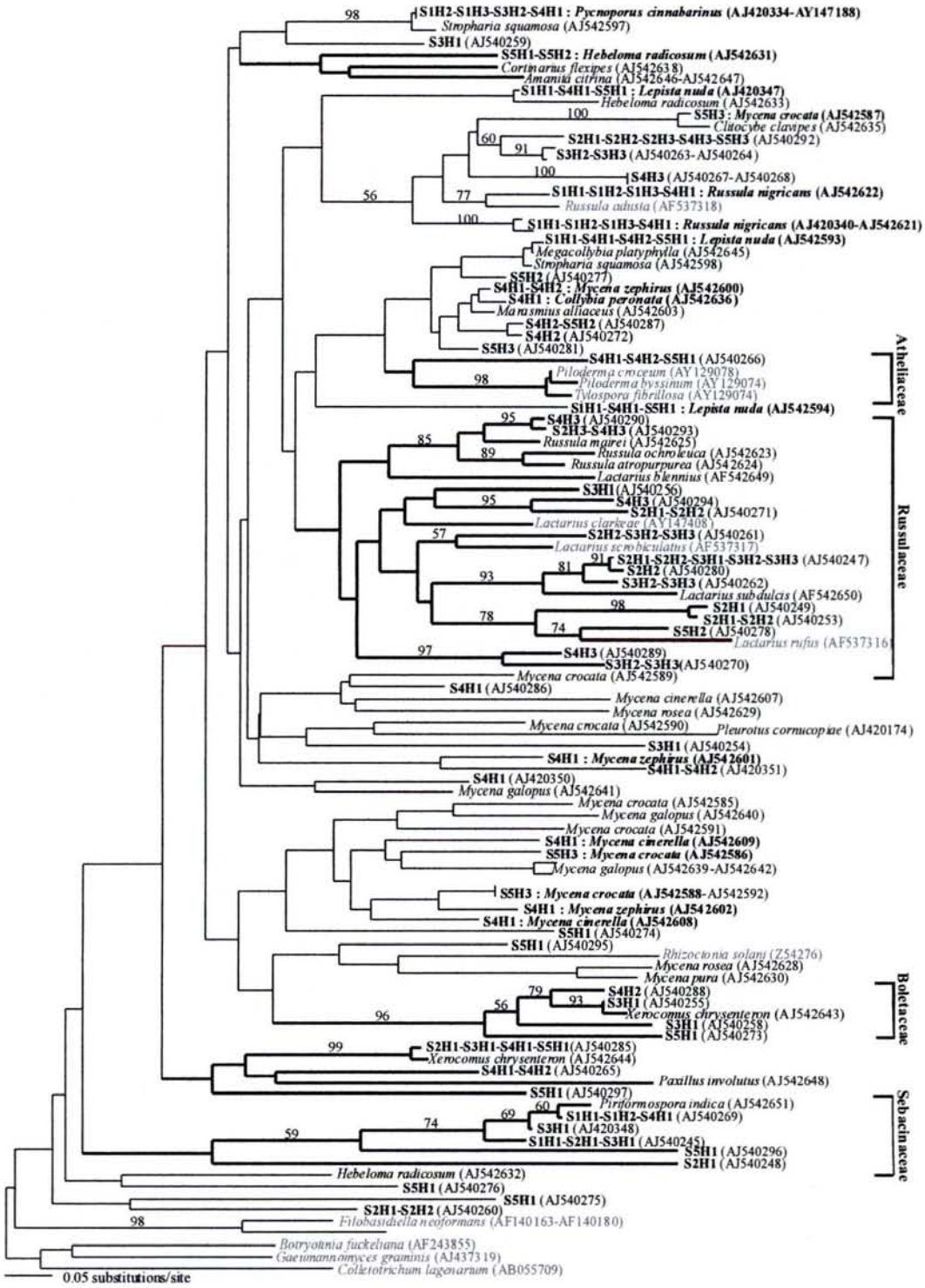


Fig. 3. Neighbor-joining tree representing the genetic distances between the 64 laccase gene fragments amplified by PCR from the soil samples (in bold type) and the closely related sequences obtained from identified fungi (in black fonts) or retrieved from GenBank (in grey characters). S1 to S5 correspond to the replicate numbers and H1 to H3 to the horizons (1 for O_h, 2 for A_h and 3 for B_v). The NJ tree was rooted using sequences of the ascomycetes *Botryotinia fuckeliana* (AF243855), *Colletotrichum lagenarium* (AB055709) and *Gaeumannomyces graminis* (AJ437319). Bootstrapping was performed with 1000 replications in Kimura 2-parameter analysis. The potential mycorrhizal specific clades are presented in bold.

For each core, the PCR products obtained were cloned into bacteria and 25 clones (i.e. potential basidiomycete laccase sequences) for the O_h horizon and 15 clones for both A_h and B_v-horizons respectively were sequenced. A preliminary test had revealed that the sequencing of this number of clones allowed the diversity of the laccase gene fragments in the respective horizons to be characterized (data not shown). Sixty-four different sequences showing a high similarity of their deduced protein sequences with known basidiomycete-laccase proteins were obtained.

3.3. Soil sequences versus fruit-body/fruit-body isolates sequences

Fruit-bodies of basidiomycetes growing at the experimental station of Steigerwald were harvested concomitantly with the soil samples to identify fungal species carrying the laccase genes detected in soil and to compare the above and the below ground diversity of laccase genes in basidiomycetes. When possible, cultured strains were isolated from the fruit-bodies and used for the molecular analyses. Based on the classifications of Singer (1986) and Jülich (1984), 15 fungal families, belonging to six orders, were considered. Of 48 species collected, 47 were basidiomycetes related to the Agaricales, Aphyllophorales, Boletales, Sclerodermatales and Lycoperdales and one was an ascomycete belonging to the Pezizales (Table 1a).

Two neighbor-joining trees were constructed from the deduced protein-coding regions of the amplified laccase-gene fragments. The first NJ tree shows principally the 90 sequences obtained from the culture strains and the fruit-bodies at the field site (Fig. 2). The second NJ tree shows the 64 laccase-gene fragments amplified from the soil DNA extracts and the reference laccase-gene sequences obtained from identified fungi (Fig. 3). The first tree (Fig. 2) shows the laccase-gene fragments to be species specific, as no sequence was shared by two different basidiomycete species. Additionally, 1 to 8 different laccase-gene sequences per species were detected with the highest gene diversity seen in the saprophytic fungus *Mycena crocata*. In contrast, the ectomycorrhizal (ECM) species appeared to have fewer (1 to 3) different laccase-genes (e.g. *Hebeloma radicosum*). For most fungal taxa, the different laccase genes belonging to a single species were not grouped in a common clade (e.g. *Pleurotus ostreatus* marked by arrows in Fig. 2). This indicates that these fungi possess genes, belonging to different families of laccases, derived from different ancestral laccase genes. However, some of the clades in Fig. 2 (clade lineage marked in bold) group

Table 2. Diversity of basidiomycete-laccase gene fragments in three horizons of a brown forest soil in Steigerwald (Germany).

Sample #	O_h horizon	A_h horizon	B_v horizon
Sample 1	1.88	1.66	1.32
Sample 2	2.22	1.83	0.63
Sample 3	2.34	1.94	1.72
Sample 4	2.89	1.92	1.69
Sample 5	2.46	1.94	1.54

The diversity of the laccase sequences was measured for each soil horizon of each analyzed sample by the calculation of Shannon-Wiener indexes (Shannon, 1948).

saprophytic fungi sequences within a genus, suggesting that they are derived from a common ancestral gene. The topology and the branching of the main clades found with the neighbor-joining analysis were confirmed in the maximun parsimony analysis run in parallel (data not shown). The second NJ tree showed that of the 64 sequences obtained from the soil DNA samples, only 17 sequences could be related to laccases of the collected fruit-bodies, 12 sequences originated from five different species of saprophytes and five sequences from two ectomycorrhizal fungi (Fig. 3). The majority of the mycorrhizal laccase sequences obtained appeared to be grouped in a few clades containing exclusively mycorrhizal species that for the most part belonged to the same fungal family (clade lineage indexed in bold in Fig. 3).

3.4. Vertical variation of the laccase-gene diversity

The diversity of the laccase sequences was measured for each soil horizon of each analyzed sample (Table 2) by calculating the Shannon-Wiener indexes (Shannon, 1948). The diversity of the laccase sequences was higher in the O_h horizon and decreased in the A_h and B_v horizons (Table 2). 65.7 % of the laccase sequences were exclusively located in one of the three horizons, i.e. respectively 40.7% in the O_h, 9.4% in the A_h and 15.6% in the B_v horizons. 15.6% of the detected genes were found simultaneously in the first two horizons (O_h, A_h) and 7.8% in the lower horizons (A_h, B_v). 10.9% of the laccase genes detected were present in all horizons and appeared to belong to ECM fungi of the family Russulaceae. These results show a high soil horizon specificity of the laccase genes. However, the ECM fungi of the family Russulaceae found in each of the three soil horizons appeared to be more widely distributed vertically than the other ECM species and to saprophytes that were mainly limited to the upper layers, A_h and especially O_h (Fig. 3).

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

4. Discussion

In the present study, we have designed six degenerate primers and used them to amplify specifically fragments of laccase genes from basidiomycetes. Laccase sequences described in the literature show that introns may occur in the annealing site of some of the primers we have designed (Giardina *et al.*, 1995). This could explain the negative results obtained with many of the primer combinations tested (data not shown). Only the newly designed primer pair Cu1F/Cu2R gave fragments of the expected length (Eggert *et al.*, 1998; D'Souza *et al.*, 1996) for all basidiomycetes. As expected, this primer pair failed to amplify ascomycetes. Comparison between the sequences generated with Cu1F/Cu2R and available mRNA sequences in database showed the presence of introns within most of the obtained laccase-gene fragments, confirming the findings of D'Souza *et al.* (1996). A relatively high diversity of laccase genes among the collection strains was found and most taxa presented at least two highly distinctive laccase gene sequences, with the differences not only evident as introns but also in the deduced coding regions (i.e. the exons). However, the predicted amino acid sequences of all PCR products showed that despite their polymorphism they all corresponded to laccase-gene sequences.

Fruit-bodies from the experimental station of Steigerwald were analyzed to complete the laccase sequences obtained from the collection strains used to test the primers. In total, 14 basidiomycete families from four orders, covering all functional groups (saprophytes, symbionts, and pathogens) and including *Piriformospora indica* a primitive basidiomycete were amplified. This confirmed that the Cu1F/Cu2R primer pair could be used to screen laccase genes across a spectrum of soil basidiomycetes. Noteworthy is that for some of the mycelium isolated from the fruit-bodies (Table 1), laccase genes were found by PCR although no expression was detected with the ABTS test. This colorimetric enzymatic test has more an indicative value, as some cultural conditions could induce repression of the laccase gene expression (Schlosser *et al.*, 1997). However, such enzymatic tests have suggested a laccase activity in some ECM fungi (Muenzenberger *et al.*, 1997; Gramss *et al.*, 1998). More recently, Burke & Cairney (2002) discussed the presence of polyphenol oxidases such as laccases in ECM fungi, and the presence of laccase genes in some ECM species has already been shown (Chen *et al.*, 2003). Our analyses of fruit-bodies confirm the presence of laccase genes in ECM fungi such as *Lactarius* and *Russula*, and also in additional taxa

(*Amanita*, *Cortinarius*, *Hebeloma*, *Paxillus* and *Xerocomus*). The discovery of laccase genes in additional ECM fungi is consistent with the fact that some of these fungi are directly involved in the attack of organic polymers in which nitrogen and phosphate resources are sequestered (Read & Perez- Moreno, 2003).

The NJ tree, constructed from the deduced DNA coding-regions (Fig. 2), showed a clear species-specificity for laccase genes, but also that most taxa possess multiple laccase sequences. This supports the report of different laccase gene families by Mansur *et al.* (1997) and Wahleithner *et al.* (1996). Even if there was a limited congruence between laccase gene diversity and fungal genus, some clades in which the sequences and the fungal taxon (genus or family) were congruent (Fig. 2, Fig. 3) were found. This allowed us to attribute several new sequences detected in soils to these fungal groups. For example, the unidentified sequences grouping with the Russulaceae sequences (Fig. 3) are likely to originate from species of this taxon. However, the available knowledge on laccase diversity in fungi is still too scarce to assign reliably sequences to taxa. One limitation is the lack of detailed knowledge on the numbers of laccase gene families found in fungi (see below).

The NJ analysis shown in Fig. 2 suggests that the saprophytic fungi are more diverse in their laccase genes (up to 8 per species) than the mycorrhizal fungi (1 to 3 per species). This difference in the enzymatic spectrum of these two functional groups of fungi might reflect their respective nutritional pathways. For soil saprophytes, the SOM is the unique carbon source and a high diversity of laccases might allow access to a wide range of soil substrates. For the ECM fungi, which receive most of their carbon as simple sugars from the host plant (Smith & Read, 1997), a wide diversity of laccases might be less essential. This interpretation is also supported by the fact that in the NJ trees, clusters of deduced laccase coding-regions were generally found at the genus level in saprophytes and at the family level in ECM.

After their evaluation on defined fungal material, the degenerate PCR-primers Cu1F/Cu2R were used to detect basidiomycete laccase genes in different horizons of a brown forest soil. To our knowledge, the present study represents the first attempt to characterize fungal laccase genes in soil DNA extracts. These primers allowed us to detect the presence of basidiomycetes with laccase genes and to explore their specific distribution in soil horizons. Except for some long fragments, all amplification products could be unequivocally attributed to basidiomycete laccases based on their deduced protein sequences. The unexpected long fragments (300-380 bp) displayed no

similarity with any laccase genes previously reported. Interestingly, they were essentially restricted to the A_h and B_v horizons that have a low content of organic matter. At this time, it is not possible to know whether they correspond to PCR artefacts produced in mineral substrates with reduced concentration of laccase genes, or whether they represent sequences from unknown copper proteins. Such enzymes could belong to a new family of laccase as suggested by our amplification of longer laccase fragments (289 bp) from *Mycena cincerella* (AJ42607). However, as this putative new laccase family with longer gene fragments would be characterized by a high number of introns, it will be difficult to deduce the coding-region making it difficult to confirm definitively the affiliation of these fragments obtained from soil DNA extracts. Nonetheless, atypical PCR fragments did not hamper the monitoring of basidiomycete laccase genes in soils, as they were easily differentiated by their size.

DNA amplification from the soil samples revealed a higher diversity of laccase genes in the O_h-horizon (C_{org} of 19%) where the degradation of organic matter is expected to be higher. The species distribution of soil fungi is known to vary vertically between successive horizons (Zvyagintsev, 1994; Dickie *et al.*, 2002). With 66% of the sequences exclusively located in one of the three horizons as opposed to 10% common to all three, the survey indicates a specific distribution of laccase genes and probably of the corresponding fungal species in soil forest horizons. Only ECM fungi in the Russulaceae had a wide vertical distribution, while the other ECM families (Atheliaceae, Sebacinaceae, Boletaceae) and the saprophytes were mainly limited to the A_h and especially the O_h layer (Fig. 3). This observation partially confirms the findings of Tedersoo *et al.* (2003) who found a domination of Atheliaceae (*Piloderma*, *Tylospora*) and Sebacinaceae in the organic horizon of a Podzol soil, whereas Euagarics (*Cortinarius*, *Hebeloma*, *Inocybe*) and ascomycetes (Pezizales and Helotiales) preferred the mineral horizons. In contrast to this distribution, we found *Hebeloma* species in the O_h and A_h but not in the B_v horizon of our brown forest soil. The domination of the ascomycete species found by Tedersoo *et al.* (2003) in the mineral part of the podzol might, however, explain the reduced laccase diversity we found in the B_v horizon, as the primers used are unable to amplify ascomycete laccases.

Of the 64 sequences found in the forest soil, only 17 corresponded to laccase sequences of fruit-bodies growing at the experimental station, and only 7 of the 48 fungal species collected as fruit-bodies were detected in soil using the laccase

sequence analyses. Thus, the fruit-body population does not reflect the below ground genetic diversity of the soil fungal community, as reported by Dahlberg *et al.* (1997) and Jonsson *et al.* (1999). Erratic fruit-body production and the existence of hypogeous fruit-bodies (Guinberteau & Courtecuisse, 1997) may explain the lack of correspondence between soil sequences and fruit-body sequences.

Direct amplification of gene fragments from soil DNA extracts, and analyses of the corresponding coding regions, provide useful information on fungal species having potential laccase activities. However, the laccase genes amplified are not necessarily expressed in soil. To investigate the function of fungal laccases in the carbon cycle in soils and especially in the formation, stabilization and degradation of the organic matter, laccase transcripts need to be monitored in parallel with gene detection. Future work will focus on the development of approaches for analyzing extracted soil mRNA.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP 1090, grant Bu941/1-1). We thank Dr. H. Dörfelt (University of Jena, Germany), Dr. B. Marçais (INRA of Nancy, France) and M. Lomberh (Institute of Botany of Kiev, Ukraine) for providing some of the fungal strains. Christine Delaruelle and Dr. Annegret Kolher (INRA of Nancy, France) for their help with the laccase gene sequencing. We are indebted to Prof. Dr. A. Hartmann and D. Selesi (GSF, Neuherberg, Germany) for their help in the first DNA extraction from soils, and to H. Boyle (Staatliches Museum für Naturkunde, Görlitz, Germany) who kindly revised the manuscript.

References

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25, 3389-3402.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Applied and Environmental Microbiology 61, 1876-1880.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G., 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. Biochimica Biophysica Acta 1379, 381-390.

Burke, R.M., Cairney, J.W.G., 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 12, 105-116.

Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. Applied and Environmental Microbiology 64, 3175-3179.

Chen, D.M., Bastias, B.A., Taylor, A.F.S., Cairney, J.W.G., 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. New Phythologist 157, 547-554.

Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Research 16, 10881-10890.

Criquet, S., Tagger, S., Vogt, G., Iacazio, G., Le Petit, J., 1999. Laccase activity of forest litter. Soil Biology & Biochemistry 31, 1239-1244.

Dahlberg, A., Jonsson, L., Nylund, J.E., 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in old-growth Norway spruce forest in south Sweden. Canadian Journal of Botany 73, 1323-1335.

Daina, S., Orlandi, M., Bestetti, G., Wiik, C., Elegir, G., 2002. Degradation of beta-5 lignin model dimers by *Ceriporiopsis subvermispora*. Enzyme and Microbial Technology 30, 499-505.

Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T., 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytologist 156, 527-535.

D'Souza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A., 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. Applied and Environmental Microbiology 62, 3739-3744.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.-E., 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Letters 391, 144-148.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.-E., 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. FEBS Letters 407, 89-92.

Eggert, C., LaFayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.-E., Dean, J.F.D., 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied and Environmental Microbiology 64, 1766-1772.

Emmerling, C., Schloter, M., Hartmann, A., Kandeler, E., 2002. Functional diversity of soil organisms – a review of recent research activities in Germany. Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences 165, 408-420.

Farnet, A.M. Criquet, S., Pocachard, E., Gil, G., Ferre, E., 2002. Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter (*Quercus suber* L). Mycologia 94, 735-740.

Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G., Sannia, G., 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 61, 2408-2413.

Gramss, G., Guenther, T., Fritsche, W., 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. Mycological Research 102, 67-72.

Guinberteau, J., Courtecuisse, R., 1997. Diversité des champignons (surtout mycorhiziens) dans les écosystèmes forestiers actuels. In: INRA (Ed.), Revue Forestière Francaise XLIX, 25-39.

Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Zackrisson, O., Karen, O., 1999. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. Molecular Ecology 8, 205-215.

Jülich, W., 1984. Die Nichtblätterpilze, Gallertpilze und Bauchpilze – Aphyllophorales, Heterobasidiomycetes, Gasteromycetes. In: Gams, H., (Ed.), Kleine Kryptogamenflora. Gutav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. IIb/2.

Killham, K., 1994. Soil ecology. Cambridge University Press, 260 pp.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 111-120.

Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T. W., Hoffland, E., Rosling, A., Wernars, K., Smit, E., 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Applied and Environmental Microbiology 69, 327-333.

Lord, N.S., Kaplan, C.W., Shank, P., Kitts, C.L., Elrod, S.L., 2002. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. FEMS Microbiology Ecology 42, 327-337.

Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J.B., Brizuela, M.A., González, A.E., 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology 63, 2637-2646.

Matsumura, E., Shin, T., Murao, S., Yamamoto, E., Kawano, T., 1987. New enzymatic colorimetric reactions of benzoic acid derivatives with ABTS 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt in the presence of laccase. Agricultural and Biological Chemistry 51, 2743-2750.

Muenzenberger, B., Otter, T., Wuestrich, D., Polle, A., 1997. Peroxidase and laccase activities in mycorrhizal and non-mycorrhizal fine roots of Norway spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*). Canadian Journal of Botany 75, 932-938.

Read, D.J., Perez-Moreno, J., 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytologist 157, 475-492.

Schlosser, D., Grey, R., Fritsche, W., 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. Applied Microbiology and Biotechnology 47, 412-418.

Seiler, J., 1995. Bodenkundliche Charakterisierung der Einzugsgebiete "Steinkreuz/ Erlensumpf" bei Ebrach und "Runderbusch" bei Schrappach im nördlichen Steigerwald. Interner Bericht. Bayreuther Institut für Terrestrische Ökosystemforschung (BITÖK), Bayreuth.

Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. Bell System Technical Journal 27, 379-423.

Singer, R., 1986. The Agaricales in modern taxonomy (4th Ed). Koeltz Scientific Books, Koenigstein, 981 pp.

Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis (2nd Ed). Academic Press, San Diego.

Swofford, D.L., 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.

Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N., Larsson, K.-H., 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. New Phytologist 159, 153-165.

Thorn, G., 1997. The fungi in soil. In: van Elsaß, J.D., Trevors, J. T., Wellington, E.M.H. (Eds.), Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York, pp. 63-128.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140, 19-26.

Tuomela, M., Oivanen, P., Hatakka, A., 2002. Degradation of synthetic C^{14}-lignin by various white-rot fungi in soil. Soil Biology & Biochemistry 34, 1613-1620.

Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., Schneider, P., 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Current Genetics 29, 395-403.

Zvyagintsev, D.G., 1994. Vertical distribution of microbial communities in soils (2nd Ed). In: Ritz, K., Dighton, J., Giller K.E. (Eds.), Beyond the biomass. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 29-37.

CHAPITRE II

Caractérisation de la diversité et de la distribution des gènes laccasiques de Basidiomycètes au sein de différents types de sols.

Forte diversité et distribution spatiale des gènes laccasiques de Basidiomycètes dans des sols tempérés

La technique d'amplification par PCR sur l'ADN extrait de sols, précédemment développée, a été utilisée ici pour comparer la diversité des gènes laccasiques de Basidiomycètes dans différents types de sols. Le sol brun forestier présente une diversité des gènes laccasiques nettement supérieure (indices de diversité Shannon de 2.41 à 2.94) à celle du podzol (0.67 à 1.56) et du sol agricole (2.09 à 2.94) soumis à différents traitements fertilisants. Une caractérisation détaillée de la distribution spatiale des gènes laccasiques de Basidiomycètes a été effectuée pour le sol brun forestier. Un total de 167 gènes laccasiques a été détecté au sein de la parcelle de 100 m² étudiée. Cependant, une analyse de raréfaction suggère que le nombre réel de gènes laccasiques dans cette parcelle est bien plus élevé. Les dissimilarités en gènes laccasiques entre deux points de prélèvements de sol sont importantes même lorsque ces derniers ne sont séparés que de quelques centimètres (30 cm). Ces taux de dissimilarité augmentent avec la distance topographique. Ces fortes dissimilarités peuvent être expliquées par la règle générale, confirmée ici, qui veut qu'un faible nombre d'espèces dominantes cohabitent avec des centaines d'espèces rares détectées bien souvent dans un seul échantillon. Les champignons ectomycorhiziens contribuent pour une large part à la communauté fongique présente dans les sols forestiers. Notre étude montre que 75% des espèces dominantes, portant les gènes laccasiques, appartiennent aux champignons ectomycorhiziens et plus particulièrement aux Russulacées. La distribution spatiale des huit espèces dominantes de Basidiomycètes détectées dans ce sol montre que les espèces fongiques sont regroupées sur de petites zones (max. 0.77 m²). Contrairement aux champignons ectomycorhiziens, les saprophytes sont restreints aux horizons supérieurs. Malgré leur large distribution verticale, les champignons ectomycorhiziens ne sont pas répartis de façon homogène, ils colonisent préférentiellement un horizon (organique ou minéral). Ces résultats montrent une grande diversité et une grande hétérogénéité spatiale (morcelée) des espèces fongiques dans les sols.

High diversity and spatial distribution of basidiomycete laccase genes in temperate soils*

Patricia Luis[a,b], Harald Kellner[a], Bettina Zimdars[a], Uwe Langer[c], Francis Martin[b] and François Buscot[a]

[a]Institute of Botany, Department of Terrestrial Ecology, University of Leipzig, Johannisallee 21, D-04103 Leipzig, Germany

[b]UMR INRA/UHP 1136 "Interactions Arbres/Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France

[c]UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Theodor-Lieser-Str. 4, D-06120 Halle, Germany

***Soumis à publication dans New Phytologist**

Abstract

Diversity of basidiomycete laccase genes was assessed by PCR on soil DNA extracts. Gene diversity was higher in a brown forest soil (Shannon indexes 2.41-2.94) than in a podzol (0.67-1.56) and a variably fertilized agricultural soil (2.09-2.77). It was also higher in organic horizons and organic manure treatment. In the brown forest soil, gene diversity paralleled to the vertical activity profile of total laccases. A 100 m^2 plot of the brown forest soil was intensively analysed. A total number of 167 different genes were found in 13 cores along 3 divergent transects. Gene content dissimilarity was 67% between adjacent cores (30 cm) and levelled (94%) over 6 m. Several sequences could be attributed to taxa or functional groups (ectomycorrhizas (ECM)/saprophytes). Genes of saprophytes were restricted to the upper horizons, those of some but not all ECM were wider distributed. Most dominating genes (75%) belonged to ECM (especially Russulaceae) and aggregated in small patches (< 0.77 m^2) as reported for other fungal molecular markers (rDNA).

Keywords: Laccases; basidiomycetes; soil DNA extraction; spatial heterogeneity; spatial distribution; soil comparison.

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

1. Introduction

Decomposition of litter, humification and mineralization of soil organic matter (SOM) are essential processes of the carbon cycle and for soil formation. Soil microorganisms are largely involved in these processes by producing numerous extracellular enzymes (Burns, 1982; Sinsabaugh *et al.*, 2002), and their high biodiversity contributes to the multiple soil functions in ecosystems (Emmerling *et al.*, 2002).

Lignin is the third most abundant organic polymer in soils (Kögel-Knabner, 2002). Its enzymatic degradation is not only important in view of the size of this C-pool, but also because in plants rests lignin often protects cellulose and hemicelluloses from microbial degradation. Lignin depolymerisation by oxidative exo-enzymes is therefore fundamental for the litter decomposition and the SOM turnover (Franklin, 1998; Hättenschwiler & Vitousek, 2000; Kögel-Knabner, 2002). The oxidative exo-enzymes involved in the decomposition of lignin and other polyphenols are phenoloxidases (tyrosinases, manganese peroxidases, lignin peroxidases and laccases) mainly produced by fungi (Vares *et al.*, 1995; Gramss *et al.*, 1998; Daina *et al.*, 2002). Several studies suggest that, among these phenoloxidases, fungal laccases play an important role in litter decomposition (Rosenbrock *et al.*, 1995; Criquet *et al.*, 2000) and in humus formation (Chefetz *et al.*, 1998; Zavarzina *et al.*, 2004). Criquet *et al.* (1999, 2000) have analysed laccase activities in forest litters and in a study on the seasonal variations of phenoloxidase activities during decomposition of oak litter, they showed laccases to be the unique oxidative exo-enzyme constantly detectable over the break down. In contrast, tyrosinase and lignin peroxidase were never detected while manganese peroxidase activity was only found during a short period.

Due to culture limitations, less than 10% of fungal species inhabiting soils have been described (Thorn, 1997). This hampered the analysis of the role of fungal laccases (e.g. fungal species) in the soil carbon cycle, including litter decomposition, stabilization and degradation of the SOM. Recently, direct DNA extraction from soils and its use for PCR amplifications with primers specific for laccase genes was developed to detect a large spectrum of basidiomycetes (Luis *et al.*, 2004) and ascomycetes (Lyons *et al.*, 2003) having this metabolic ability. The wide application of such molecular methods could provide a better assessment of the laccase potential of

fungal species and a better understanding of their role in the carbon cycle. Fungal diversity assessment done on soil DNA extracts by specific PCR amplifications of ribosomal DNA regions followed by cloning/sequencing (Landeweert *et al.*, 2003) or terminal restriction fragment length polymorphism (Dickie *et al.*, 2002; Tedersoo *et al.*, 2003) have supported the concept of niche differentiation within forest soils by fungi (Burns, 1995). Fungal communities differed markedly among the different layers. Several factors could influence fungal species distribution along a vertical soil profile. But as organic and mineral nutrient availability vary in each horizon, the authors suggest that the presence of a fungal species in a certain horizon could depend on its ability to take up nutrients from organic or inorganic sources (Dickie *et al.*, 2002; Landeweert *et al.*, 2003; Tedersoo *et al.*, 2003). Thus, these differences in substrate preference might derive from different enzymatic ability to break down various substances, spreading strategies or functionality (Read & Perez-Moreno, 2003).

The fungal distribution in soils should be analysed through their oxidative potentials with the utilisation of functional markers, like laccase genes, instead of neutral markers. The aim of the present study was to assess the heterogeneity and variability in the distribution of basidiomycete laccase genes in various soil profiles and to characterize their spatial distribution in a forest soil.

2. Materials and Methods

2.1. Study areas

Soil samples were collected at two forested sites in northern Bavaria and at three differently treated plots from a long-term agricultural field experiment in southern Saxony-Anhalt (Germany), respectively. The first forested site, "Steinkreuz", an experimental station of the Institute of Ecosystem Research (BITÖK) from the University of Bayreuth, is located at 460 m above the sea level (a.s.l.) in Steigerwald (49°52'26"N, 10°27'54"E). The site is covered by a 100-years-old mixed stand of European beech (*Fagus sylvatica* L.) and European oak (*Quercus robur* L.) with little ground vegetation. The soil, Dystric Cambisol (*FAO-UNESCO*, 1990), is characterized by a fine moder humus layer and a pH between 3.2 and 4.2 (Kaiser *et al.*, 2002). The turnover of organic matter in such soils is rapid, with a low accumulation in the lower horizons. The second forested site, "Waldstein", another experimental station of the

University of Bayreuth, is located at 780 m a.s.l. in the Fichtelgebirge (50°8'39"N, 11°52'0"E). The site is a 145-years-old Norway spruce (*Picea abies* (Karst.) L.) forest and the ground vegetation is composed of *Deschampsia flexuosa* L., *Vaccinium myrtillus* L. and *Calamagrostis villosa* L. The soil, a strongly acidic Haplic Podzol (*FAO-UNESCO*, 1990), is characterized by a thick moder to mor humus layer and a pH between 2.8 and 4.2 (Kaiser *et al.*, 2002). In contrast to the brown forest soil previously described, the turnover of organic matter in this soil type is relatively low.

The long-term agricultural field experiment, "Ewiger Roggen", from the University of Halle-Wittenberg is located at 113 m a.s.l. in Halle (Saale) (51°24'0"N, 11°53'0"E). A detailed description of the experimental site, the field management and yields was recently published by Merbarch *et al.* (2000). The soil is a Haplic Phaeozem (*FAO-UNESCO*, 1990) derived from sandy loess with a pH around 6.3. This field trial was established in Halle since 1878 with continuous rye (*Secale cereale* L.) and different fertilization treatments. Three of these treatments were analysed in the present study. (1) An unfertilised plot (U) without any fertilization since 1978; (2) a plot fertilized with farmyard manure (FYM) applied in the fall before ploughing (since 1990 the amount of FYM was 60 kg N ha^{-1} yr^{-1}); (3) a plot with mineral fertilization NPK (since 1991, 15 kg ha^{-1} of ammonium sulphate in the fall and 45 kg ha^{-1} of calcium ammonium nitrate in Spring were applied to reach 60 kg ha^{-1} of total N per year; since 1995, 24 kg ha^{-1} of phosphorus as triple-phosphate and potassium as granulated potassium chloride were applied (33.2% = 40% K_2O)).

2.2. Sampling design

Three soil cores (12 cm of diameter) were collected, about 6 m apart from each other, for each forest soil type and for each fertilization treatment. The brown forest soil samples were collected in September 2002 and divided into O_h (1 to 0 cm), A_h (0 to 6 cm) and B_v (6 to 34 cm) horizons. The soil cores from the podzol and the agricultural field treatments were respectively collected in October 2001 and in April 2003. The samples from the podzol were divided into $O_{f\text{-}h}$ (5 to 0 cm), A_{he} (0 to 9 cm), $B_{hs\text{-}sv}$ (9 to 37 cm), and C_v (37 to 54 cm) horizons. No separation was done within the agricultural soil cores due to the ploughing homogenisation. All soil samples were transported in ice chests and stored at - 80°C before use.

To characterize the spatial heterogeneity within the soil profile showing the highest laccase gene diversity (i.e. the brown forest soil of Steinkreuz, see results below), a complex and not random sampling design was used. From a central core taken within a square plot of 10 x 10 m, 12 samples were additionally collected in growing intervals (0.3, 1, 3 and 6 m) along three diverging axes (i.e. three transects) making 120°angles (for tree positions see Fig. 4). Each core of 12 cm of diameter was taken in September 2002 and immediately divided into O_h, A_h and B_v horizons. The 39 soil samples (13 cores x 3 horizons) were also transported in ice chests, and stored at -80°C before use.

2.3. Soil DNA extraction

DNA was separately extracted from all soil core horizons. Before DNA extraction, large debris, roots and leaves were discarded, and each soil sample was carefully homogenized by hand shaking for 1 min. Genomic DNA was isolated from 0.5 g of soil using the FastDNA™ Spin kit for soil (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany) with a modified protocol as described previously (Luis *et al.*, 2004). In this procedure, instead of letting the GLASSMILK settle (protocol, step 7), the Silica-DNA pellets obtained after brief centrifugation were washed 10 times with a solution of guanidine thiocyanate (5.5 M, pH 7) (Sigma, Taufkirchen, Germany). The final pellets were resuspended in 1 ml of guanidine thiocyanate, transferred to the SPIN filter, and after 1 min of centrifugation at 14 000g, the DNA extraction proceeded according to the manufacturer protocol (protocol, step 8).

2.4. PCR amplification

Genomic DNA isolated from all soil core horizons was used separately as template in PCR amplifications. The PCR were performed with the specific basidiomycete primer pair Cu1F (5'-CAT(C) TGG CAT(C) GGN TTT(C) TTT(C) CA-3') and Cu2R (5'-G G(A)CT GTG GTA CCA GAA NGT NCC -3') (Luis *et al.*, 2004). For the amplifications, 3 µl of the DNA extracts were added to a 50 µl reaction mixture containing 5 µl of 10x *Taq* buffer with $MgCl_2$ (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany), 4 µl of dNTPs (10 mM each) (MBI fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 1 µl of each primer (60 µM), and 0.2 µl of *Taq* DNA polymerase (Q-

BIOgene, Heidelberg, Germany). The reaction mixtures were overlaid with two drops of sterile oil and PCR were run on a Master cycler gradient system (Eppendorf, Hamburg, Germany) with an initial cycle of denaturation (3 min at 94°C) followed by 35 cycles with denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 50°C) and elongation (2 min at 72°C), and by a final elongation (10 min at 72°C). A control reaction without template was run to rule out the presence of contaminant DNA. Amplification of the laccase sequences from DNA of *Pycnoporus cinnabarinus* was systematically carried out as a positive control to detect PCR failures. Additionally, amplification of the internal transcribed spacer (ITS) in the nuclear ribosomal DNA region was performed with each DNA extract to estimate its quality and, especially in the case of amplifications from soil extracts, to detect the presence of possible inhibitory substances.

Seven µl of each amplification product were loaded onto a 2% agarose gel (Applichem, Darmstadt, Germany) and electrophoresed in Tris-acetate-EDTA buffer for 45 min at 80 V cm^{-1}. The 100 bp DNA size ladder mix (MBI fermentas, St Leon-Rot, Germany) was run in a separate lane. The gels were stained with ethidium bromide and the DNA bands visualized and photographed under UV light.

2.5. Cloning and identification of potential laccase PCR products

PCR products were ligated into a pCR 4-TOPO vector and ligation mixtures was transformed into *Escherichia coli* TOP10 chemically competent cells according to the manufacturer's instructions of the TOPO TA Cloning kit for sequencing (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany). The bacteria were plated out in three dilutions. From each sample around 40 colonies were picked and the respective bacterial clones were then amplified and analysed on 2% agarose gels. As it has been previously demonstrated that only the fragments at ~ 140 bp and at ~ 200 bp showed similarities with laccase genes (Luis *et al.*, 2004), the bacterial clones containing fragments of these sizes were selected for plasmid extraction and insert sequencing. For the organic horizons (O_h) and both mineral horizons (A_h and B_v) of the brown forest soil, respectively, 25 and 15 clones with bands of the right size were cultured overnight for plasmid extraction and sequencing in 1.5 ml of LB medium (10 g bacteriological peptone, 5 g NaCl and 5 g yeast extract per liter). A preliminary rarefaction analysis showed that sequencing of these numbers of clones allowed to

characterize most laccase gene fragments in these horizons (Luis *et al.*, 2004). For each horizon of the podzol and for each treatment of the agricultural field, 25 clones with bands of the right size were cultured overnight for plasmid extraction and sequencing.

2.6. DNA sequencing and sequence analysis

Plasmid DNA, containing PCR products, were extracted from 1.5 ml of *E. coli* suspensions by using the Perfectprep plasmid mini kit (Eppendorf, Hamburg, Germany). Cloned products were then sequenced in both directions with M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') and M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') primers. The sequencing reactions were run on automated multi-capillary DNA sequencers, a CEQ 2000XL sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) or a ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), using respectively the CEQ Dye-labelled Dideoxy-Terminator Cycle Sequencing kit (Beckman Coulter) or the BigDye Terminator v.3.1. Ready Reaction Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) as recommended by the manufacturer's instructions.

Reverse, complement, or inverse sequences were generated by the IUPAC program (http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html) and search for sequence similarity done using the GenBank DNA database and Gapped BlastN (NCBI) search algorithm (Altschul *et al.*, 1997). The position of the coding regions in the amplified laccase fragments were deduced after alignment of each DNA sequence with the *Trametes versicolor* laccase mRNA (accession n°L78077). All nucleotide sequences obtained from the soil samples and identified as part of fungal laccase genes have been deposited at EMBL under the accession numbers AJ420340, AJ420344, AJ420346 to AJ420348, AJ420350, AJ420351, AJ540236, AJ540242 to AJ540267, AJ540269 to AJ540297, AJ542586 to AJ542588, AJ542593, AJ542594, AJ542600 to AJ542602, AJ542605, AJ542606, AJ542608, AJ542609, AJ542611, AJ542621, AJ542622, AJ542631, AJ542632, AJ542636, AJ542650, AJ580829, AJ622909 to AJ622935, AJ626647 to AJ626709, AJ626728 to AJ626742, AY147188. All laccase fragments, sequenced in the present survey, were aligned using the program MultAlin (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html) (IBCP, Lyon, France;

Corpet, 1988). The final alignment, available on request, was optimised visually, exported to a NEXUS file and analysed using PAUP*4.0b10 (Swofford, 1998). The approach used to construct the neighbor-joining (NJ) tree was the Kimura two-parameter distance method (Kimura, 1980). The different types of laccase genes and their distribution were determined from the neighbor-joining (NJ) tree constructed.

2.7. Data analysis

2.7.1. Comparison of the laccase diversity within different soil types

Laccase sequence data obtained from the three soil cores collected in each soil type or soil treatment were pooled. A quantitative matrix giving the number of each laccase gene type in each soil horizon or treatment was built. From this matrix, the diversity of laccase genes was measured for each soil horizon or treatment by calculating the Shannon indexes using the formula:

$$H = -\sum_{i=1}^{S} Pi \ln Pi$$

Where Pi is the proportion of the ith laccase type and S the total number of laccase types in the sample (Shannon, 1948).

2.7.2. Spatial heterogeneity within the brown forest soil

Here, the laccase sequences identified in the 13 soil cores collected in the brown forest soil from Steinkreuz were maintained separated. A quantitative matrix pointing out the number of each laccase gene type in each soil core horizon was built. From this matrix, the diversity of laccase genes was measured for each soil horizon by calculating the Shannon indexes (Shannon, 1948).

For further statistical analysis, a simplified quantitative matrix was used. For each soil core, the data of the three horizons were pooled and used to build a new matrix giving the number of each laccase gene type in each soil core. From this data set a Jackknife analysis was performed using the program PC Ord for Microsoft Windows version 4.27 (McCune & Mefford, 1999). This program generated a saturation curve used to estimate the total number of different laccase genes present in

the soil plot. This simplified matrix was then transformed in an Sørensen-distance matrix by the program PC Ord. The Sørensen distance, measured as percent dissimilarity (PD), is a proportion coefficient given by the formula "1-2W/(A+B)", where W is the sum of shared abundances and A and B the sums of abundances in individual sample units (Beals, 1984). The Sørensen coefficient (or Bray-Curtis coefficient) was originally applied to presence-absence, but it works equally well with quantitative data and compared to Euclidean distance, it retains sensitivity in more heterogeneous data sets and gives less weight to outliers (McCune *et al.*, 2002).

This Sørensen-distance matrix was compared to a topographic distance matrix, and a curve giving the dissimilarities (Sørensen-distance) between the soil cores according to their topographic distances (values in centimeter) was generated. The effect of the spatial separation on the laccase gene contents was also tested by regular Mantel test (Mantel & Valand, 1970) on the Sørensen-distance matrix and the Euclidean matrix of spatial distance between the soil cores (Mantel test module in the program PC Ord). The Euclidean matrix was previously generated in PC Ord from the spatial distance matrix. The significance of the correlation between the two matrices was tested by Monte Carlo permutations (9999 runs) of the dissimilarity matrix to generate a null distribution of correlation coefficients (z-values). For $p \leq 0.05$, if the observed value was greater than the randomly generated statistics then the two matrices were significatively correlated.

2.8. Laccase activity in the brown forest soil

To analyse its relation with the laccase gene diversity, the total laccase activity was measured for the three soil horizons (O_h, A_h and B_v) collected in the brown forest soil. For each horizon, equivalent quantities of soil were taken from the different collected cores and pooled to reach the 40 g needed for performing four technical repetitions. The activity measurement was made in quadruplet as following: 5 g of soil were dissolved in 6 ml of a 50 mM phosphate buffer (pH 7.1), shacked and sonificated for 3 min in an ultrasonic bath (Sonorex Super RK 1028 H; Bandelin Electronic, Berlin, Germany). For each analysis, a negative control was included. It corresponded to the same soil preparation that was pre-incubated for 15 min at 100°C.

Total laccase activities in the extracts were measured spectrophotometrically (U-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) using 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-

Table 1. Diversity of basidiomycete laccase genes in the upper horizons of a brown forest soil ("Steinkreuz", Bavaria), a podzol ("Waldstein", Bavaria), and in agricultural field treatments (Unfertilized (U), fertilization with NPK (NPK) or with farmyard manure (FYM) ("Ewiger Roggen", Saxony-Anhalt).

Horizon	**pH*** **($CaCl_2$)**	**Total OC*** **(g kg^{-1})**	**Total number of different laccase genes**	**diversity index (Shannon)**
Steinkreuz				
O_h	4.2	354.3	30	2.94
A_h	3.2	70.0	17	2.71
B_v	3.9	6.0	12	2.41
Waldstein				
$O_{f\text{-}h}$	3.0	431.7	8	1.37
A_{he}	2.8	38.0	5	1.56
$B_{hs\text{-}sv}$	3.7	51.0	4	0.82
C_v	4.2	2.0	4	0.67
Ewiger Roggen				
U	6.3	12.3	9	2.09
NPK	6.5	12.3	8	2.02
FYM	6.5	16.4	17	2.77

* Some properties of the forest soil horizons and of the agricultural field treatments (pH and total organic carbon contents) were given. It is mean values issued from the measurements of Kaiser *et al.* (2002) and Schmidt *et al.* (2000).

sulfonate) (ABTS) (Sigma) as substrate (Matsumura *et al.*, 1987). For kinetic measurements, 850 µl of 50 mM phosphate-citrate-buffer (pH 4.5), 100 µl of ABTS (final concentration 0.3 mM) and 50 µl of soil extract were mixed in a 1 ml cuve. The oxidation rate of the ABTS was measured for 5 min at 420 nm ($\xi^M = 29{,}300\ M^{-1}\ cm^{-1}$). The results are expressed in units defined as µmol of product formed from the ABTS per minute (U) and per gram of dry matter ($U\ g^{-1}$ DM). For dry weight determination, the soil material was dried at 100°C for 24 h.

3. Results

3.1. Comparison of the basidiomycete laccase gene diversity within different soil types

The diversity of the basidiomycete laccase genes found in each horizon of the brown and podzolic forest soils and in the different agricultural field treatments is summarized in Table 1. This diversity expressed using the Shannon indexes (Shannon, 1948), as well as the total number of different genes, was clearly higher in the brown forest soil and lower in the podzol. In both forest soils, a decrease of diversity was noted from the upper and more organic horizons to the lower and more mineral ones. Within the agricultural field, the plot with FYM displayed the highest gene diversity (Shannon index of 2.77).

3.2. Spatial heterogeneity within the brown forest soil

3.2.1. Vertical distribution of the laccase genes

Basidiomycete laccase genes were amplified from DNA extracts of 39 soil samples (13 cores x 3 horizons) collected on a 10 x 10 m plot from the brown forest soil in Steinkreuz, which had shown the higher laccase gene diversity in the preliminary comparative analysis. After cloning into plasmids a given number of clones for each sample was sequenced (see Materials & Methods). From a total of 715 sequences, 432 sequences showed a high similarity of their deduced protein sequences with known basidiomycete laccase proteins and 283 sequences could not be unambiguously assigned to laccase genes (see Discussion section). The NJ analysis

Table 2. Repartition of the different basidiomycete laccase genes through the three upper horizons of a brown forest soil in Steinkreuz (Bavaria, Germany).

Horizon(s) #	Number of laccase gene types	(%)
O_h	69	41.3
A_h	34	20.3
B_v	25	15.0
O_h and A_h	16	9.6
A_h and B_v	11	6.6
O_h, A_h and B_v	12	7.2
Total	167	100.0

Table 3. Diversity of basidiomycete laccase genes in the three upper horizons of a brown forest soil in Steinkreuz (Bavaria, Germany).

Core sample #	O_h horizon	A_h horizon	B_v horizon
S0	2.89	1.92	1.69
S1	2.46	1.94	1.54
S2	2.16	1.79	1.33
S3	2.94	1.94	0.69
S4	2.34	1.94	1.72
S5	2.47	2.24	1.74
S6	2.26	1.95	2.16
S7	1.21	2.04	2.10
S8	1.88	1.66	1.32
S9	2.08	0.69	1.54
S10	2.04	1.73	1.27
S11	0.69	1.54	1.47
S12	2.22	1.83	0.63
Average	2.12	1.78	1.47

The diversity of the laccase sequences was measured for each horizon of each analysed soil core by the calculation of Shannon indexes (Shannon, 1948).

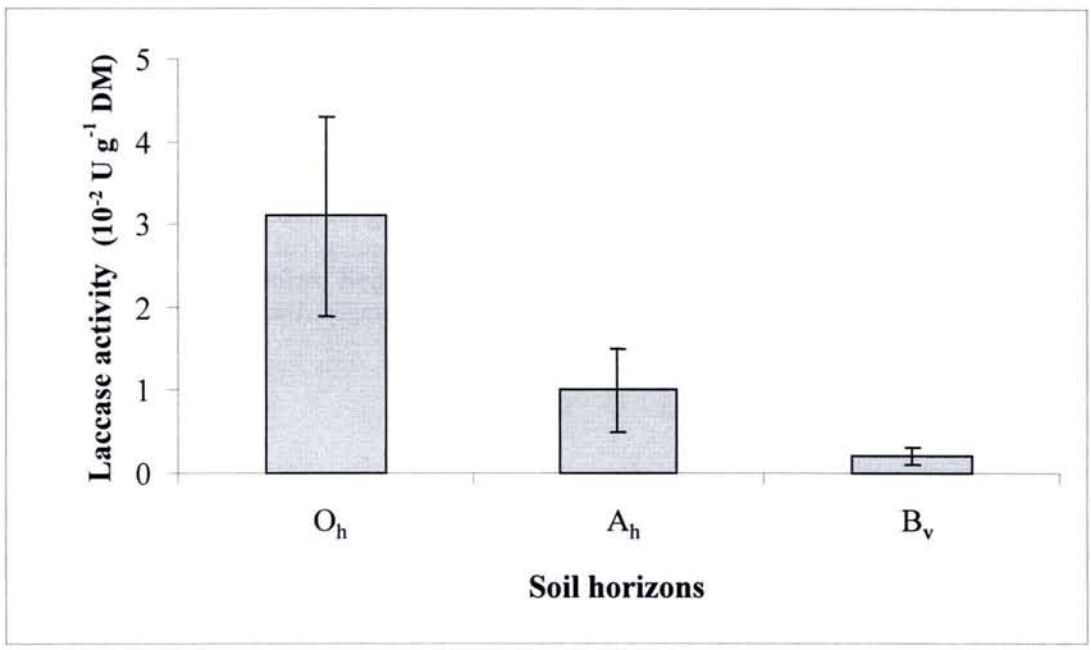


Fig. 1. Total laccase activity measured in the three upper horizons of a brown forest soil from Steinkreuz (Bavaria, Germany). The values represent the averages of four analyses (replicates) on samples collected in September 2002. Bars represent standard deviations.

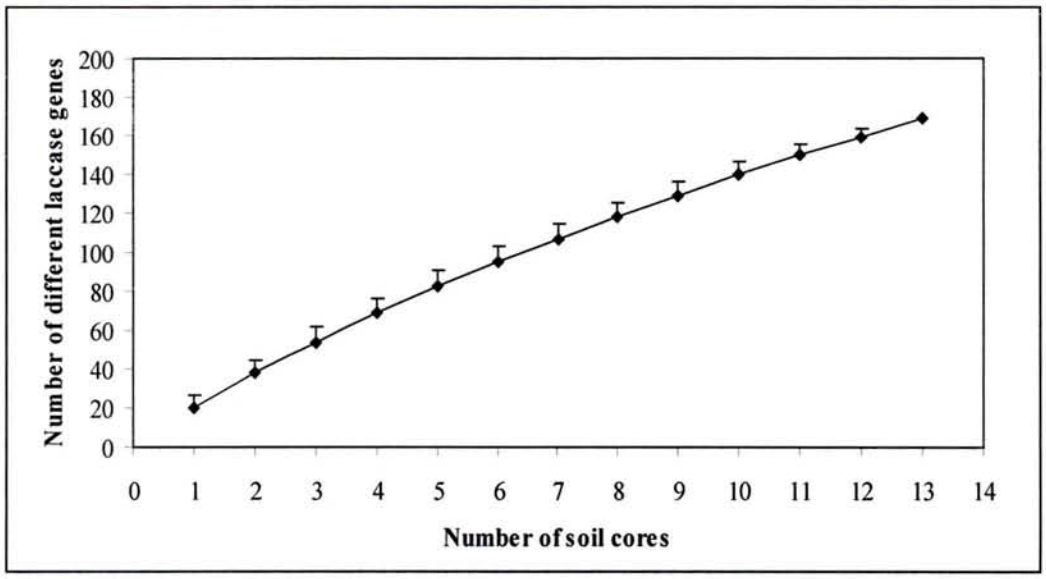


Fig. 2. Number of basidiomycete laccase gene found by analysing an increasing number of soil cores. The curve was generated from a quantitative matrix pointing out the number of each different laccase gene found in each soil core in a Jackknife analysis performed on the program PC Ord (McCune & Mefford, 1999). The values represent averages. Bars represent standard deviations.

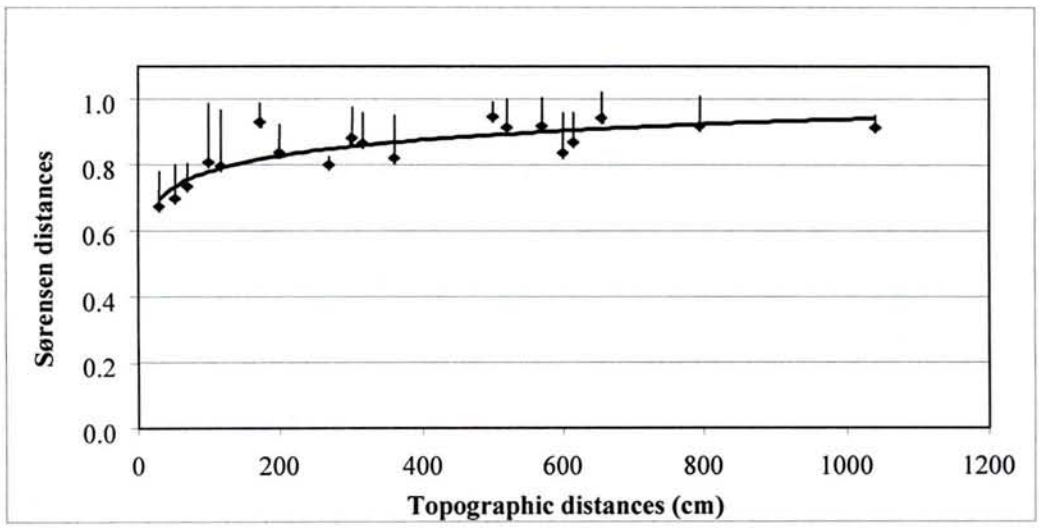


Fig. 3. Percentage of dissimilarity in the diversity profiles of basidiomycete laccase genes (Sørensen-distance) between soil cores taken at increasing distances in a mixed oak-beech forest in Steinkreuz (Bavaria, Germany). The values represent averages of the Bray-Curtis coefficients calculated with the program PC Ord (McCune & Mefford, 1999) for cores separated by the same spatial distance. The curve equation is $y = 0.0704Ln(x) + 0.455$ with a correlation coefficient of $R^2 = 0.7302$. Bars represent standard deviations.

Table 4. Species correspondences, horizon distribution and occurrence of the different types of laccase sequences detected in the brown forest soil of Steinkreuz.

Family	Species	Number of different laccase sequences	Distribution of the different laccase sequences in the soil horizons						Occurrence of the different laccase sequences in soil cores
			O_h	A_h	O_h/A_h	A_h/B_v	B_v	$O_h/A_h/B_v$	
Unknown Basidiomycetes	-	61	39	10	4	3	4	1	1 to 3 (Except one type: 2 to 14)
Boletaceae	Unknown species	19	7	6	2	1	1	2	1 to 7
Cortinariaceae	*Hebeloma radicosum*	2	-	-	2	-	-	-	1 to 2
Russulaceae	Unknown species	46	7	10	2	6	19	2	1 to 6
	Lactarius subdulcis	1	-	-	-	-	-	1	1 to 10
	Russula nigricans	3	-	-	-	-	-	3	1 to 4
Sebacinaceae	Unknown species	4	3	-	1	-	-	-	1 to 4
Agaricaceae	*Macrolepiota procera*	1	-	-	-	-	1	-	1
Polyporaceae	*Pycnoporus cinnabarinus*	1	-	-	-	1	-	-	1 to 3
Tricholomataceae	*Collybia peronata*	1	1	-	-	-	-	-	1
	Mycena unknown species	17	14	1	2	-	-	-	1 to 3
	Mycena cincerella	2	-	-	2	-	-	-	1 to 2
	Mycena crocata	2	-	-	-	-	2	-	1 to 2
	Mycena zephirus	3	2	-	1	-	-	-	1 to 5
	Lepista nuda	2	2	-	-	-	-	-	1
	Marasmius alliceus	2	2	-	-	-	-	-	1

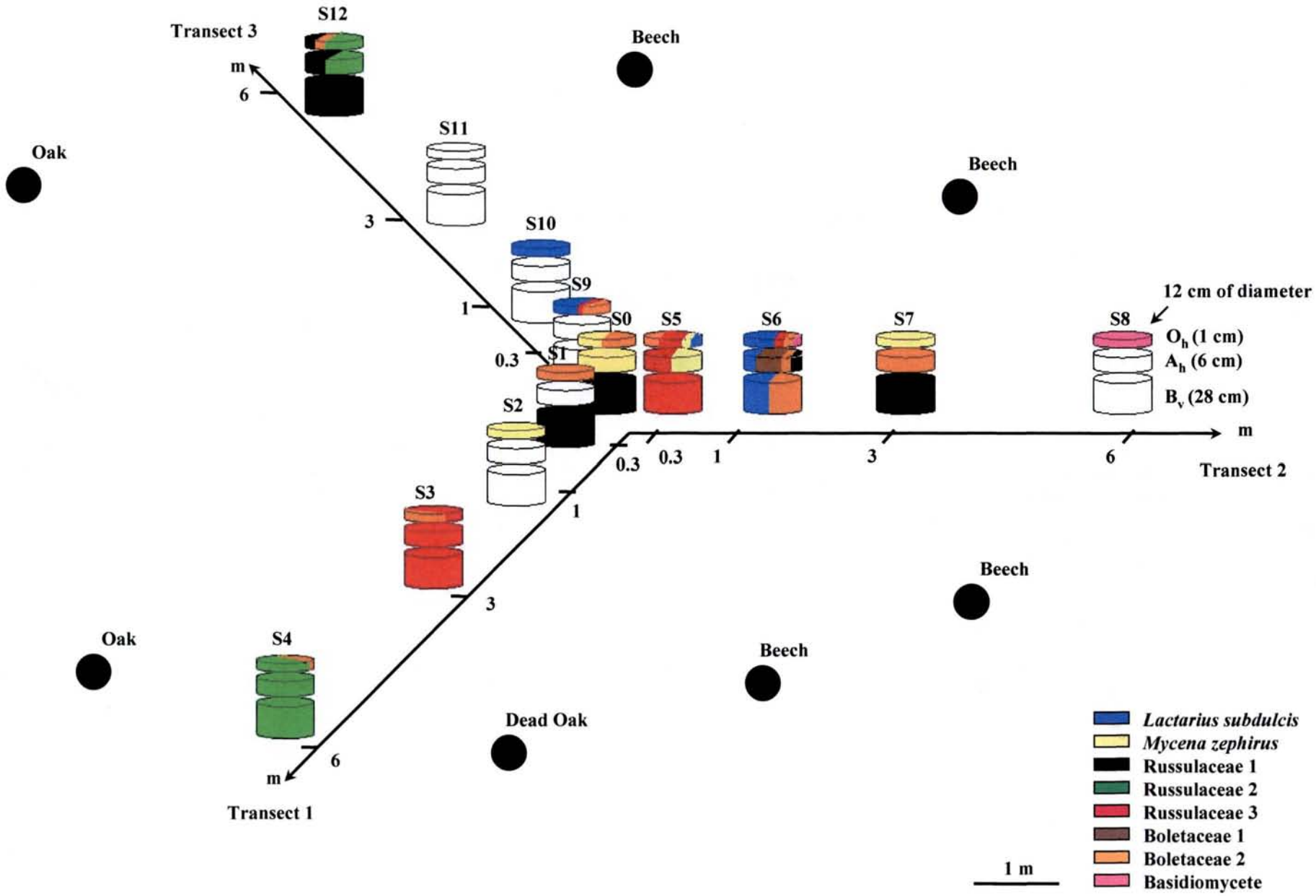


Fig. 4. Spatial distribution of eight dominant basidiomycete species through three transects in the brown forest soil of Steinkreuz (Bavaria, Germany). Each species is indicated by a different color. No dominant basidiomycete species was detected in blank squares. Black circles indicate tree positions.

clustered these 432 fragments into 167 different laccase gene types (data not shown). The final alignment and NJ tree of the deduced laccase coding regions are available on request. The vertical distribution of the different laccase gene types throughout the three horizons is shown in Table 2. The results show that most basidiomycetes carrying the detected laccase genes were restricted to a soil horizon.

The diversity of the laccase sequences was then measured for each horizon of each analysed soil core by calculating the Shannon indexes (Shannon, 1948) (Table 3). The diversity of the laccase sequences was higher in the O_h horizon and decreased in the A_h and B_v horizons (Table 3).

The total laccase enzymes activity, measured for each horizon, showed a distribution profile similar to the gene diversity, i.e. a decrease with the depth. The ABTS oxidation measured in A_h and B_v was 3- and 15-fold lower than the one in O_h, respectively (Fig 1).

3.2.2. Spatial distribution of the laccase genes

The spatial variation of the laccase gene diversity in the plot was analysed at the soil core level (i.e. the three horizons of each core were pooled). The Jackknife analysis performed on this data set showed that the saturation of the diversity of laccase gene types was not reached after the examination of 13 soil cores (Fig. 2). The potential number of different laccase genes present in the soil plot was estimated with the program PC Ord to be between 281 and 365.

The curve giving the dissimilarities of laccase gene types (Sørensen distances) between the soil cores in relation to their topographic distances showed that the laccase genes highly differed between cores (Fig. 3). Even at 30 cm of physical distance, two soil cores presented already 67% of dissimilarity. Despite this low similarity levels between adjacent cores, the dissimilarity of laccase gene types between two soil cores increased with the topographic distance (Fig. 3). The maximal diversity (94.6%) was reached up to an inter-core distance of 6 m. The overall correlation between physical and genetic (i.e. laccase gene type contents) distance matrices was $r_M = 0.2$ [$p < 0.05$ (Mantel's test, 9999 permutations)] confirming that spatial distance between soil cores has an influence on the specific types of laccase genes found. These results indicate a highly heterogeneous spatial distribution of basidiomycete species carrying laccase genes in the analysed forest soil.

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

3.2.3. Spatial distribution of the dominant basidiomycete species

Previous neighbor-joining (NJ) analyses showed that there was a limited congruence between laccase gene diversity and fungal taxa (Luis *et al.*, 2004). However, some clades, in which laccase sequences and fungal taxa (genera or families) were congruent, were found. This allowed us to attribute several clusters of sequences detected in soils to systematic fungal groups (Luis *et al.*, 2004). In such clusters, laccase sequences were generally grouped at the genus level in saprophytes and at the family level in ectomycorrhizal fungi. Of a total of 167 laccase genes, 61 belonged to different undetermined basidiomycete species, 75 to ECM and 31 to saprophyte species (Table 4). Russulaceae and Tricholomataceae laccases were among the most abundant. The Russulaceae ECM appeared to be more widely distributed vertically than the other ECM species while the saprophytes were mainly limited to the upper layers, A_h and especially O_h (Table 4).

The spatial distribution of the dominant basidiomycete species (i.e. the dominant laccase sequences) through the three transects is mapped in Figure 4. A species was considered dominant when its laccase gene sequence was detected more than 5 times in at least one of the 13 soil cores. The eight dominant laccase genes were found to belong to an undetermined basidiomycete, *Lactarius subdulcis*, *Mycena zephirus*, three Russulaceae and two Boletaceae species. While one soil core showed no dominant fungal species (S11), the others presented single (S2, S8, S10) or several dominant species (for example S5 and S6). Spatial distribution of these various species was patchy and each species was only detected within a relatively small area (max. 0.77 m^2).

4. Discussion

The comparison of three soils showed that the brown forest soil of Steinkreuz displayed the highest diversity of basidiomycete laccase genes. According to our previous investigations (Luis *et al.*, 2004), this higher gene diversity likely reflects a relative higher richness in fungal species. The diversity profile variations in each soil suggest that the laccase gene diversity depends on the organic matter content. In fact, the highest gene diversities (e.g. fungal species) were found in the most organic layers

of each forest soils and in the agricultural plot fertilized with FYM. Concerning the forest soils, as reported by Dickie *et al.* (2002), the total incidence of fungi was greatest in the lower litter and progressively decreased in the deeper layers.

However, besides this quantitative aspect, the quality of the organic matter and additional unknown soil factors probably influence the species diversity. Despite the SOM richness in its three upper horizons, the podzol at Waldstein displayed a low diversity of laccase genes but also a low number of detectable genes. This is reflected by the clearly smaller values of the Shannon diversity indexes in that soil. Podzols represent acidic substrates with a low quality litter, which can restrict the fungal colonization (Sariyildiz & Anderson, 2003).

Because of its higher laccase gene diversity, the detailed characterization of the spatial distribution was carried out in the brown forest soil of Steinkreuz. Our previous study (Luis *et al.*, 2004) showed that PCR with the Cu1F/Cu2R primers amplify laccase gene fragments of basidiomycetes with a size ranging from 140 to 200 bp. However, as some laccase gene fragments display a larger size (e.g. 238, 241 and 289 bp; see corresponding reference sequences deposited for *Pleurotus ostreatus* (AJ420179), *Mycena crocata* (AJ542590) and *M. cincerella* (AJ542607)), fragments between 140 and 300 bp were sequenced in the present study. From 715 DNA fragments sequenced, only 432 could be unequivocally attributed to basidiomycete laccases based on their deduced protein sequences. Most fragments selected for sequencing having more than 210 pb displayed no similarity with any laccase genes previously reported. Interestingly, such fragments appeared essentially in the A_h and B_v horizons, which have a low content of organic matter. At present, it is not possible to know whether they correspond to PCR artefacts produced in mineral substrates with reduced concentration of laccase genes, or whether they revealed the presence of unknown genes coding for copper proteins. Such enzymes might belong to a new family of phenoloxidases. However, as this putative new laccase family with longer gene fragments would be characterized by a high number of introns, it will be difficult to deduce the coding-region and to confirm the definitive attribution of these fragments obtained on soil DNA extracts to laccase genes.

The number of different basidiomycete laccase genes, found in the brown forest soil, was 167 genes in a plot of 100 m^2. This diversity level can be explained by four main factors: (1) the high diversity of fungi in soils (Thorn, 1997), (2) the considerable proportion of soil fungi presenting laccase activities (Gramss *et al.*, 1998), (3) the

species-specificity of laccase genes (Luis *et al.*, 2004) and (4) the existence of different laccase gene families leading to the frequent detection of several different sequences within a single taxon (Mansur *et al.*, 1997; Wahleithner *et al.*, 1996; Lyons *et al.*, 2003, Luis *et al.*, 2004).

The vertical distribution of the 167 different laccase-gene types confirmed two previous findings (Luis *et al.*, 2004). Firstly, a high horizon-specific distribution of laccase genes and thus of the corresponding fungal species occurred in forest soils (Table 2). Most sequences found (75%) were exclusively located in one of the three horizons. This supports earlier observations showing that the diversity of soil fungi varies vertically between successive horizons (Dickie *et al.*, 2002; Landeweert *et al.*, 2003). Secondly, a higher diversity of laccase genes occurred in the organic horizon (Table 3), in which a higher degradation of the organic matter is expected. The total laccase activity measured in this organic horizon was also the highest found in the whole soil profile (Fig. 1). The congruence between gene diversity and total enzyme activity in the horizons suggests that a large diversity of basidiomycete laccase genes reflects to a high laccase activity, thus giving some functional indications. However, the variation of gene diversity and enzyme activity were not in the same order of magnitude, and no simple correlation should be expected at this level. The activity profile found is in accordance with the positive correlation found by Criquet *et al.* (2000) between the proliferation of fungi producing phenoloxidases and the laccase activities. These authors have also estimated the laccase activity to reach $3.2\ 10^{-2}$ U g^{-1} DM in the Lv layer (leaves still recognizable despite the decay and often compressed in lumps) of an oak forest in October. The value of $3.1\ 10^{-2}$ U g^{-1} DM we found at the end of September in the organic horizon O_h of Steinkreuz is consistent with this result. Even if certain bacteria are able to synthesize laccases (Givaudan *et al.*, 1993), the laccase activity in litters is essentially attributable to fungi (Rosenbrock *et al.*, 1995). Thus, the estimation of the laccase gene diversity in soils can provide qualitative information on the oxidative potentials in soils.

The 167 different basidiomycete laccase genes found within the 100 m^2 plot of the Steinkreuz site probably represent a subfraction of the actual basidiomycete laccase gene diversity in the brown forest soil. It is known that the occurrence of introns in the primer annealing sites can preclude PCR amplification (Giardina *et al.*, 1995) and that an excess of some DNA matrices in the soil extracts can result in a lack of amplification of weakly present genes. The Jackknife analysis showed that the saturation level of the

laccase gene diversity was not reached using a sampling of 13 soil cores (Fig. 2). The analysis suggests that the potential number of different laccase genes detectable with our approach in the investigated soil plot might be around 300. The dissimilarity of laccase gene contents between two soil cores was high even within short spatial distances (30 cm) and increased with the topographic distances between cores. The curve generated from the comparison of the Sørensen and topographic distance matrices suggests that two soil samples could be considered as independents (>94% of dissimilarity), when they are separated by a distance of 6 m (Fig. 3). This kind of results was expected as Tedersoo *et al.* (2003) have found that the relative abundance of ECM fungal species was highly variable even at a 5 cm scale.

ECM fungi contributed for a large part of the identified taxa. Most of the dominant species (75%) carrying laccase genes in the brown forest soil belonged to ECM fungi and especially to Russulaceae. This result supports earlier observations showing that high ECM species richness occurs in forest soils (Taylor & Bruns, 1999; Zhou & Hogetsu, 2002; Dahlberg, 2001). The reason for such richness is unknown, although availability of heterogeneous nutrient resources in soils (Buscot *et al.*, 2000), influence of the plant host (Mason *et al.*, 1982, 1983; Molina *et al.*, 1992), natural disturbances (e.g. wildfire) favoring colonization of new spores (Dahlberg & Stenlid, 1995), competition and interactions between microorganisms (Wu *et al.*, 1999) are potential explanations. It is difficult to evaluate the real proportion of saprophytes compared to ECM fungi, as many laccase genes remain non-attributable to any fungal taxa. Moreover, contrary to ECM fungi, saprophytes tend to have a larger number of laccase genes (Luis *et al.*, 2004).

Our results confirm also that fungal communities consist of a small number of common species versus a large number of rarer ones, which make up the great majority of the species richness but which are very unlikely to be recorded in many soil cores. This well established evidence and the fact that fungi are non-randomly distributed in soils make difficult to determine a sampling design which gives a representative picture of the species diversity of a fungal community (Dahlberg, 2001; Horton & Bruns, 2001).

The spatial distribution of the eight dominant basidiomycete species was patchy and these species were only detected in relatively small areas (max. 0.77 m^2). This apparently restricted mycelial development can be due to different factors such as micro-environmental conditions in soil (Bruns, 1995) and competition (Wu *et*

al., 1999). Along each transect, the species composition largely differed from one soil core to the others. Similar variations in ECM species composition within small areas were found by Zhou & Hogetsu (2002) and Tedersoo *et al.* (2003). Compared to the ECM fungi belonging to the Russulaceae, saprophytes detected through their laccase genes were restricted to the upper horizons. Despite their wide distribution, ECM fungi were not homogenously split between horizons. Whereas *Lactarius subdulcis* colonized preferably the organic horizons (O_h), the Russulaceae type 1 occupied the mineral part of the soil cores (B_v). As previously mentioned, several soil factors could explain this distribution such as pH, moisture, O_2 and CO_2 concentrations, quantity and quality of organic matter (Landeweert *et al.*, 2003). However, the substrate preference due to their respective enzymatic potentials might be one of the major distribution factors. Our observations on the vertical distribution of ECM fungi are in accordance with recent determination of the nutrition mode of different ECM based on isotopic analyses ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) of fungal fruit-bodies (Högberg *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2003). The authors described certain ECM fungi (i.e. *Russula*) to acquire their carbon essentially from their host trees and we show here that they are more vertically distributed or preferentially localized in the mineral horizons. Others ECM fungi (i.e. *Lactarius*) were characterized as using the saprophytic pathway and acquiring preferentially their carbon and other nutrients from the degradation of remnants of decayed wood and soil humic polymers; we found such taxa to be essentially distributed in the organic horizons. This contribution of ECM fungi to degradation of polyaromatic complexes (wood debris...) was also often suggested (Burke & Cairney, 2002; Chen *et al.*, 2003; Read & Perez-Moreno, 2003).

Saprophytic fungi can create qualitatively different habitat patches (Pyles & Brown, 1999), which enhance the development of highly diverse communities of organisms including ECM fungi. The remnants of brown rotted wood are abundant in the uppermost soil layers, hence different decomposition pathways determine the structure and patchiness of whole organic horizons. The approximate diameter of such soil nutrient patches was found to be 20 cm in a deciduous woodland (Farley & Fitter, 1999). The patchy spatial distribution of the fungal species, detected through our analysis of laccase genes, could reflect the soil nutrient patchiness and tends to confirm that substrate preference could be one of the principal factors of fungal distribution. Soil substrates may display rapid changes (Dilly *et al.*, 2001), complementary analyses

of saisonal variations in the laccase gene profiles at defined plots are therefore needed to confirm this interpretation.

In conclusion, the results concerning the fungal community distribution obtained through their laccase genes analysis are in accordance with the previous findings obtained with ribosomal DNA regions analysis. In particular, we confirm that total incidence of fungi is greater in the lower litter and progressively decreases in the deeper layers (Dickie *et al.* 2002). High variability of fungi composition was found on short scale both vertically and horizontally (Tedersoo *et al.*, 2003). We also gathered additional indices that the niche differentiation of fungal species in soils could be partly ruled by substrate preferences conducting to a patchy distribution due to spatial heterogeneous substrate distributions. Laccases genes can be used to characterize the fungal distribution in soils and can provide ecological information on their functions in soils. The contribution of ECM fungi to degradation of polyaromatic complexes (wood debris, humic substances) has been suggested (Burke & Cairney, 2002), but should be confirmed by the analyses of extracted soil mRNA.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the frame of its joined program "Soils as source and sink of CO_2" (SPP1090) by grant number Bu 941/2-2. We are indebted to Uwe Hell and Dr. Kalbitz (Institute of Ecosystem Research (BITÖK), University of Bayreuth, Germany) for their help during the soil sampling. We would like to thank Christine Delaruelle and Dr. Annegret Kolher (INRA of Nancy, France) for their help with the laccase gene sequencing.

References

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25, 3389-3402.

Beals, E.W., 1984. Bray-Curtis ordination: an effective strategy for analysis of multivariate ecological data. Advances in Ecological Research 14, 1-55.

Burke, R.M., Cairney, J.W.G., 2002. Laccases and other polyphenoloxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 12, 105–116.

Burns, R.G., 1982. Enzymes activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. Soil Biology & Biochemistry 14, 423-427.

Bruns, T.D., 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 170, 63-73.

Buscot, F., Munch, J.-C., Charcosset, J.-Y., Gardes, M., Nehls, U., Hampp, R., 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. FEMS Microbiology Review 24, 601-614.

Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of the laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. Applied and Environmental Microbiology 64, 3175-3179.

Chen, D.M., Bastias, B.A., Taylor, A.F.S., Cairney, J.W.G., 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. New Phytologist 157, 547-554.

Corpet, F.,1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleid Acids Research 16, 10881-10890.

Criquet, S., Tagger, S., Vogt, G., Iacazio, G., Le Petit, J., 1999. Laccase activity of forest litter. Soil Biology & Biochemistry 31, 1239-1244.

Criquet, S., Farnet, A.M., Tagger, S., Le Petit, J., 2000. Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: influence of certain biotic and abiotic factors. Soil Biology & Biochemistry 32, 1505-1513.

Dahlberg, A., 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. New Phytologist 150, 555-562.

Dahlberg, A., Stenlid, J., 1995. Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations. Canadian Journal of Botany 73, 1222-1230.

Daina, S., Orlandi, M., Bestetti, G., Wiik, C., Elegir, G., 2002. Degradation of beta-5 lignin model dimers by *Ceriporiopsis subvermispora.* Enzyme and Microbial Technology 30, 499-505.

Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T., 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytologist 156, 527-535.

Dilly, O., Bartsch, S., Rosenbrock, P., Buscot, F., Munch, J.C., 2001. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn.) L.) forest. Soil Biology & Biochemistry 33, 921-930.

FAO-UNESCO, 1990. Soil Map of the world, revised legend. World Soil Resources Report 60, FAO, Rome.

Farley, R.A., Fitter, A.H., 1999. Temporal and spatial variation in soil resources in a decideous woodland. Journal of Ecology 87, 688-696.

Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G., Sannia, G., 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 61, 2408-2413.

Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M., Bally, R., 1993. Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from the rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiology Letters 108, 205-210.

Gramss, G., Guenther, T., Fritsche, W., 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. Mycological Research 102, 67-72.

Hättenschwiler, S., Vitousek, M., 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. Trends in Ecology & Evolution 15, 238-243.

Hitz, C., Egli, M., Fitze, P., 2002. Determination of sampling volumes needed for representative analysis of alpine soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 165, 326-331.

Högberg, P., Plamboeck, A.H., Taylor, A.F.S., Fransson, P.M., 1999. Natural C^{13} abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in

mycorrhizal fungi in mixed forests. Proceeding of the National Academy of Sciences 96, 8534-8539.

Horton, T.R., Bruns, T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. Molecular Ecology 10, 1855-1871.

Ilsemann, J., Goeb, S., Bachmann, J., 2001. How many soil samples are necessary to obtain a reliable estimate of mean nitrate concentrations in an agricultural field. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 164, 585-590.

Jany J.-L., Garbaye J., Martin F., 2002. *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. New Phytologist 154, 651-659.

Kaiser, K., Eusterhues, K., Rumpel, C., Guggenberger, G., Kögel-Knabner, I., 2002. Stabilization of organic matter by soil minerals – investigations of density and particle-size fractions from two acid forest soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 165, 451-459.

Killham, K., 1994. Soil ecology. Cambridge University Press, 260 pp.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 111-120.

Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. Soil Biology & Biochemistry 34, 139-162.

Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T.W., Hoffland, E., Rosling, A., Wernars, K., Smit, E., 2003. Molecular Identification of ectomycorrhizal mycelium in soil. Applied and Environmental Microbiology 69, 327-333.

Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., Buscot, F., 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. Soil Biology & Biochemistry, in press.

Lyons, J.I., Newell, S.Y., Buchan, A., Moran, M.A., 2003. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a Southeastern US salt marsh. Microbial ecology 45, 270-281.

Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J.B., Brizuela, M.A., González, A.E., 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology 63, 2637-2646.

Mantel, N., Valand, R.S., 1970. A technique of nonparametric multivariate analysis. Biometrics 26, 547-558.

Mason, P.A., Last, F.T., Pelham, J.J, Ingleby, K.K., 1982. Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*). Forest Ecological Management 4, 19-39.

Mason, P.A., Wilson, J.J., Last, F.T., Walker, C.C., 1983. The concept of succession in relation to the spread of sheating mycorrhizal fungi on inoculated tree seedling growing in unsterile soils. Plant and Soil 71, 247-256.

Matsumura, E., Shin, T., Murao, S., Yamamoto, E., Kawano, T., 1987. New enzymatic colorimetric reactions of benzoic acid derivatives with ABTS 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt in the presence of laccase. Agricultural and Biological Chemistry 51, 2743-2750.

Molina R., Massicotte, H., Trappe, J.M., 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and pratical implications. In: Allen, M.F. (Ed.) Mycorrhizal functioning. New York, USA. Chapman & Hall, 357-423.

McCune, B., Grace, J.B., Urban, D.L., 2002. Analysis of ecological communities. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, pp. 304.

McCune, B., Mefford, M.J., 1999. PC-Ord. Multivariate analysis of ecological data, version 4. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, USA.

Merbarch, M., Garz, J., Schliephake, W., Stumpe, H., Schmidt, L., 2000. The long-term fertilization trials in Halle – Introduction and overview. Journal of Plant Nutrition of Soil Science 163, 627-636.

Pyle, C., Brown, M.M., 1999. Heterogeneity of wood decay classes within hardwood logs. Forest Ecology and Management 114, 253-259.

Read, D.J., Perez-Moreno, J., 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytologist 157, 475-492.

Rosenbrock, P., Buscot, F., Munch, J.C., 1995. Fungal succession and chances in the fungal degradation potential during the initial stage of litter decomposition in a black alder forest [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.]. European Journal of Soil Biology 31, 1-11.

Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B.D., Larsson, K.-H., Kuyper, T.W., Taylor, A.F.S., Finlay, R.D., 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. New Phytologist 159, 775-783.

Sariyildiz, T., Anderson, J.M., 2003. Interactions between litter quality, decomposition and soil fertility: a laboratory study. Soil Biology & Biochemistry 35, 391-399.

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

Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. Bell System Technical Journal 27, 379-423.

Sinsabaugh, R.L., Carreiro, M.M., Alvarez, S., 2002. Enzymes and microbial dynamics of litter decomposition. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), Enzymes in the environment, activity, ecology, and applications. Marcel Dekker, New York, Basel, pp.249-265.

Schmidt, L., Warnstorff, K., Dörfel, H., Leinweber, P., Lange, H., Merbarch, W., 2000. The influence of fertilization and rotation on soil organic matter and plant yields in the long-term Eternal Rye trial in Halle (Saale), Germany. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163, 639-648.

Swofford, D.L., 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.

Taylor, D.L., Bruns, T.D., 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. Molecular Ecology 8, 1837-1850.

Taylor, A.F.S., Fransson, P.M., Högberg, P., Högberg, M.N., Plamboeck, A.H., 2003. Species level patterns in ^{13}C and ^{15}N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. New Phytologist 159, 757-774.

Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N., Larsson, K.-H., 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. New Phytologist 159, 153-165.

Thorn, G., 1997. The fungi in soil. In: van Elsaß, J.D., Trevors, J. T., Wellington, E.M.H. (Eds.), Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York, pp. 63-128.

Vares, T., Kalsi, M., Hatakka, A., 1995. Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. Applied and Environmental Microbiology 61, 3315-3520.

Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., Schneider, P., 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Current Genetics 29, 395-403.

Wilkinson, S.C., Anderson, J.M., 2001. Spatial pattern of soil communities in a Norway spruce (*Picea abies*) plantation. Microbial Ecology 42, 248-255.

Wu, B., Nara, K., Hogetsu, T., 1999. Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. Mycorrhiza 9, 151-159.

Zavarzina, A.G., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Trofimov, S.Y., 2004. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an *in vitro* study. Soil Biology & Biochemistry 36, 359-369.

Zhou, Z., Hogetsu, T., 2002. Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocarps in a *Larix kaempferi* forest. New Phytologist 154, 529-539.

CHAPITRE III

Optimisation d'une méthode moléculaire permettant d'analyser par RT-PCR et PCR semi-quantitative les profils d'expression des gènes laccasiques préalablement détectés au niveau ADN.

Une méthode moléculaire pour évaluer l'expression des gènes laccasiques de Basidiomycètes dans les sols forestiers

En utilisant une technique d'amplification PCR sur de l'ADN extrait de sols, nous avons précédemment montré pour un sol brun forestier que la plus haute diversité des gènes laccasiques se trouvait au niveau de l'horizon le plus organique (autrement dit O_h). Or ces gènes n'étant pas forcément exprimés, il apparaît nécessaire d'analyser l'ARNm parallèlement à l'ADN pour appréhender le rôle des différentes espèces fongiques productrices de laccases dans les phénomènes de dégradation de la MOS. Par conséquent, dans la présente étude, une méthode impliquant extraction d'ARN, RT-PCR et PCR semi-quantitative a été optimisée pour analyser *in situ* l'expression des gènes laccasiques de Basidiomycètes. Les niveaux de transcrits laccasiques sont hétérogènes selon les cinq points de prélèvement testés. Les deux échantillons de sol rhizosphérique montrent un fort niveau d'expression, les autres échantillons potentiellement non rhizosphériques présentent soit des niveaux de transcrits très faibles soit des niveaux de transcrits de gènes laccasiques non détectables. L'analyse des niveaux de transcrits des gènes codant l'actine, gènes exprimés constitutivement chez les champignons, exclut que ces différences d'expression soient dues à des défauts expérimentaux ou à des substances inhibitrices contenues dans les extraits d'ARN totaux. Une analyse cladistique montre que de nombreuses séquences issues des transcrits de gènes laccasiques sont groupées dans deux clades fortement reliés au champignon ectomycorhizien *Xerocomus chrysenteron*. La comparaison entre les séquences laccasiques issues des extraits d'ADN et d'ARN montre que moins de 30% des gènes de laccases détectés dans un échantillon de sol sont exprimés. Cette étude préliminaire démontre le potentiel de la RT-PCR pour l'étude de l'expression de gènes dans les sols forestiers. Le nombre d'échantillons analysés ne peut nous autoriser l'établissement de conclusions écologiques définitives. Cependant, il existe quelques indications selon lesquelles des différences d'expression existeraient entre un sol rhizosphérique et un sol non-rhizosphérique. Ces différences pourraient être dues à l'abondance de polyphénols, aux fortes densités microbiennes favorisant la compétition et la production de laccases dans la rhizosphère.

A molecular method to evaluate basidiomycete laccase gene expression in forest soils*

Patricia Luis[a,b], Harald Kellner[a], Francis Martin[b] and François Buscot[a]

[a]Institute of Botany, Department of Terrestrial Ecology, University of Leipzig, Johannisallee 21, D-04103 Leipzig, Germany

[b]UMR INRA/UHP 1136 "Interactions Arbres/Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France

*** A paraître dans Geoderma**

Abstract

Fungal laccases, exo-enzymes lacking high substrate specificity, play a central role in cycling of soil organic matter. In a precedent work based on a PCR technique on soil DNA extracts, we showed that the highest diversity of laccase genes occurred in the most organic horizon (i.e. O_h) of a brown forest soil. In the present article, we develop a method of RNA extraction, RT-PCR and semi-quantitative PCR to analyze the expression of basidiomycete laccase genes. We performed a very first assessment of the methodological approach on five cores of the O_h horizon of the same brown forest soil. The level of laccase transcripts was heterogeneous amongst the soil cores. Two samples gave strong expression levels, two showed very faint ones and the last replicate presented no detectable laccase transcripts. A control with a transcript analysis of the actin gene, which is constitutively expressed in fungi, allowed to rule out that the differences in the transcript level of laccases were due to experimental failures or inhibiting substances in the RNA extracts. A cladistic analysis showed that most laccase transcript sequences detected were grouped in two clades closely related to the ectomycorrhizal fungus *Xerocomus chrysenteron*. Comparison between DNA laccase sequences found in our previous study and RNA laccase sequence profiles found here showed that less than 30% of the laccases genes detected in a soil core were expressed. This preliminary study demonstrates the potential of RT-PCR for gene expression profiling in forest soils. The number of analyzed samples cannot allow us to draw definitive ecological conclusions, but there are some indications that differences between rhizospheric and bulk soil samples (polyphenol abundances, microbial densities...) might be a potential explanation for the variable laccase expression observed.

Keywords: Laccases; soil RNA extraction; RT-PCR; semi-quantitative PCR; basidiomycetes; brown forest soil.

1. Introduction

A great part of the terrestrial carbon (C) is bound as organic residues in soils (Killham, 1994). This C-pool is maintained quite constant by several processes, such as humification, recycling and mineralization. Soil microorganisms have been shown to be largely involved in these processes, and their high biodiversity contributes to the soil function in ecosystems (Emmerling *et al.*, 2002). As contribution to the present Geoderma special issue about the international conference "Mechanisms and Regulation of Organic Matter Stabilization in Soils", this article deals with a methodological development to characterize the expression in soils of fungal laccases, key enzymes involved in both mineralization and humification.

Fungi are one of the most important soil microorganism group involved in the carbon cycle in many regards. With 40 to 200 g of mycelial dry matter per square meter of soil, they represent a dominant part of the soil biomass (Thorn, 1997; Dighton & Kooistra, 1993). Due to their mycelial structure, they can explore soil compartments and reach organic matter fractions not accessible to many other organisms (Read & Perez-Moreno, 2003). As partners of mycorrhizal symbioses, they contribute to the transfer of 10 to 20% of the global photo-assimilates into soils (Smith & Read, 1997). Based on their nutritional mode, fungi can be divided in three functional groups (saprophytes, symbionts, and parasites) in each of which many species are able to produce oxidative exo-enzymes playing an important role in formation and decomposition of soil organic matter (SOM) (Cheftez *et al.*, 1998; Read & Perez-Moreno, 2003).

Laccases, lignin and manganese peroxidases are the main oxidative exo-enzymes produced by fungi (Gramss *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2003). Apart a lack of substrate-specificity common to other exo-enzymes, laccases have the widest distribution among fungi (Gramss *et al.*, 1998). Both features allow them to be involved in many biosynthetic processes such as formation of humic acids (Chefetz *et al.*, 1998) and in biodegradation of complex organic and aromatic substances (Eggert *et al.*, 1997). It was also shown that laccases can oxidize non-phenolic components in presence of appropriate radical mediators (Bourbonnais *et al.*, 1995, 1998) and so completely degrade lignin (Eggert *et al.*, 1996).

The development of molecular methods opened new perspectives for investigating and understanding the function of microorganisms in soils. They in particular allow determining the respective role of target groups of microorganisms by characterizing more relevant species and by assessing whether a loss of diversity might disturb soil functions (Emmerling *et al.*, 2002). Direct DNA extraction from soils and its use for PCR amplifications with specific primers has been developed from years for bacteria (Holben *et al.*, 1988; Wintzingerode *et al.*, 1997). Application of this method to fungi mainly focus on polymorphic regions of the ribosomal DNA to assess the diversity and spatial distribution of fungal communities in soils (Dickie *et al.*, 2002; Tedersoo *et al.*, 2003), but studies aiming to analyze protein-coding genes are scarce (Lyons *et al.*, 2003).

In a precedent work (Luis *et al.*, 2004), we optimized a PCR-based method on DNA extracted from different soil horizons of a brown forest soil to analyze the diversity of basidiomycete laccase genes. The gene diversity profiling provided a glimpse of the oxidative potential of fungi with laccase genes. But, as all genes might not be continually expressed, their distribution gave no information on the real fungal laccase activity in the soil. The aim of the present study was to develop a procedure to analyze the expression of basidiomycete laccase genes. This procedure was assessed on five soil samples on which the gene diversity had been characterized previously (Luis *et al.*, 2004). This allowed comparing the already known diversity with the expression pattern revealed here. To our knowledge this kind of comparison was never reported for soil fungi previously. We also assessed the respective part of the ectomycorrhizal and saprophytic basidiomycetes in the revealed expression pattern using a cladistic analysis of detected sequences.

2. Material and Methods

2.1. Samples of soils

Five cores (S1 to S5) with 12 cm diameter and 35 cm height of a brown forest soil under a mixed oak-beech forest of the "Steigerwald" (Northern Bavaria, 49°52'26"N, 10°27'54"E) that belongs to an experimental station of the Institute of Ecosystem Research (BITÖK) from the University of Bayreuth were randomly collected in September 2002 within a plot of 6 x 6 m. The position of the cores and their contact to the tree vegetation was noted. Two of the cores (S2 & S3) were densely colonized by tree roots indicating a high amount of rhizospheric soil, whereas the other three cores were more reflecting a bulk soil fraction. In each soil core, the O_h, was separated from the A_h and B_v horizons, transported in ice chests, and stored before use at -80°C.

2.2. RNA extraction from soil samples and cDNA synthesis

For each of the five cores, the O_h-horizon was homogenized and the total RNA was extracted from 1g fractions. Each fraction was divided into four 0.25 g aliquots which were suspended in 250 µl of DEPC (Diethyl pyrocarbonate) treated deionized water. The tubes containing the aqueous aliquots were incubated one hour at - 80°C. Then, 0.5 g of glass beads (106 microns, Sigma), 33.3 µl of 20% SDS, 167 µl of 3% diatomaceous earth (Sigma, Taufkirchen, Germany), and 583 µl of Tris-buffered phenol solution (250 g phenol in 75 ml 0.5M Tris-HCl pH 8, 0.1% (w/v) 8-Hydroxychinolin, 0.2% (v/v) 2-Mercaptoethanol) were added to the frozen aliquots before shaking 2.5 min at 2000 rpm s^{-1} on a Mikro-Dismembrator S (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany). After a centrifugation of 15 min at 14 000 g and 4°C, the supernatants transferred into new tubes were mixed with 36.7 µl of 3M sodium acetate and 478 µl of 100% ethanol solutions and incubated over night at -20°C. The nucleic acid pellets, obtained after a centrifugation (15 min at 14 000 g and 4°C) were washed with a 70% ethanol solution, dried at room temperature, and dissolved in 25 µl of DEPC treated deionized water. The nucleic acid solutions were pooled and the total RNA was separated from the DNA using the RNA/DNA Midi kit (10) (Qiagen, Hilden, Germany)

as recommended by the manufacturer. Before starting the purification of the extracted RNA with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manual instructions, active charcoal (Merck, Darmstadt, Germany) was added to the RLC buffer supplied (2.5 mg ml^{-1}). Moreover, during this RNeasy purification a DNAse step was added as recommended by the manufacturer. The purified DNA-free RNA was used as template in a RT-PCR to synthesized cDNAs. This reaction was performed with 3 µl of total RNA extract (0.18 µg $µl^{-1}$) by using the SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Heidelberg, Germany). As recommended by the manufacturer, the optimal number of RT-PCR cycles to strike a balance between maintaining transcripts representation and reducing non specific background amplification was determined. Gel quantifications were done with the software ImageQuant version 5.0 (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

2.3. Semi-quantitative PCR analyses

cDNAs corresponding to mRNA (transcripts) extracted from the O_h-horizons were used as template in a PCR. Fragments of cDNA corresponding to transcripts of basidiomycete laccase genes were amplified with the degenerate primers Cu1F (5'-CAT(C) TGG CAT(C) GGN TTT(C) TTT(C) CA-3') and Cu2R (5'-G G(A)CT GTG GTA CCA GAA NGT NCC -3') optimized previously (Luis *et al.,* 2004). For PCR amplification, 1 µl of the cDNA was added to a 50 µl reaction mixture containing 5 µl of 10x *Taq* buffer with $MgCl_2$ (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany), 4 µl of dNTPs (10 mM each) (MBI fermentas, St.Leon-Rot, Germany), 1 µl of each primer (60 µM), and 0.2 µl of *Taq* DNA polymerase (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany). All reaction mixtures were overlaid with two drops of sterile oil and run on a Master cycler gradient system (Eppendorf, Hamburg, Germany) with an initial cycle of denaturation (3 min at 94°C) followed by 35 cycles with denaturation (30 sec at 94°C), annealing (30 sec at 50°C) and elongation (2 min at 72°C), and by a final elongation (10 min at 72°C). A control reaction without template was systematically run to rule out the presence of contaminant DNA.

Additionally to the expression analysis of the laccase genes, the synthesized cDNA was used in a PCR to detected fungal actin, a constitutively expressed gene. This control reaction was performed to rule out that the lack of detection of a laccase gene expression in some samples did not result from a reaction inhibition. For this control

PCR, the degenerate primers Act1 (5'-GT(C,A)C ACC AGG GTG TNA TGG TCG-3') and Act2 (5'-GCC AGA TCT TCT CCA TGT CA(G)T CCC-3') were designed. *Collybia fusipes* DNA was also used as a positive control to rule out technical mistakes during the laccase and actin PCRs.

For each amplification product, 7 µl were loaded onto a 2% agarose gel (Applichem, Darmstadt, Germany) and electrophoresed in Tris-acetate-EDTA pH 8 buffer for 45 min at 80 V cm^{-1}. The 100 bp DNA size ladder mix (MBI fermentas, St Leon-Rot, Germany) was run in a separate lane. The gels were stained with ethidium bromide and the DNA bands visualized and photographed under UV light.

2.4. Sequence analysis

PCR products were directly cloned into the pCR 4-TOPO vector, using the TOPO TA Cloning kit for sequencing (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) as described by the manufacturer. The plasmid DNA, containing the PCR product, was extracted from 1.5 ml of *E. coli* TOP10 chemically competent cells by using the Perfectprep plasmid mini kit (Eppendorf, Hamburg, Germany). Cloned products were then sequenced in both directions with M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') and M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') fluorescent primers and the Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) on a DNA sequencer Long Reader 4200 (LI-COR, Nebraska, USA).

The cDNA sequences obtained for the soil RNA extracts have been deposited at EMBL under the accession numbers AJ580828 to AJ580837. These transcript sequences were compared in a cladistic analyses to reference sequences of three sources: (1) the deduced coding-regions of the laccase gene fragments previously obtained from our DNA investigation on the same soil (Luis *et al.*, 2004), (2) the deduced coding-regions of the laccase gene fragments amplified by ourselves from both fruit-bodies collected at the site and derived cultures or from a culture collection, and (3) the deduced coding-regions of the laccase gene sequences retrieved from GenBank database.

Search for sequence identity in the GenBank DNA database was conducted by Gapped BlastN (NCBI) (Altschul *et al.*, 1997). The 14 cDNA sequences from the present survey were aligned with the deduced coding regions of the DNA sequences

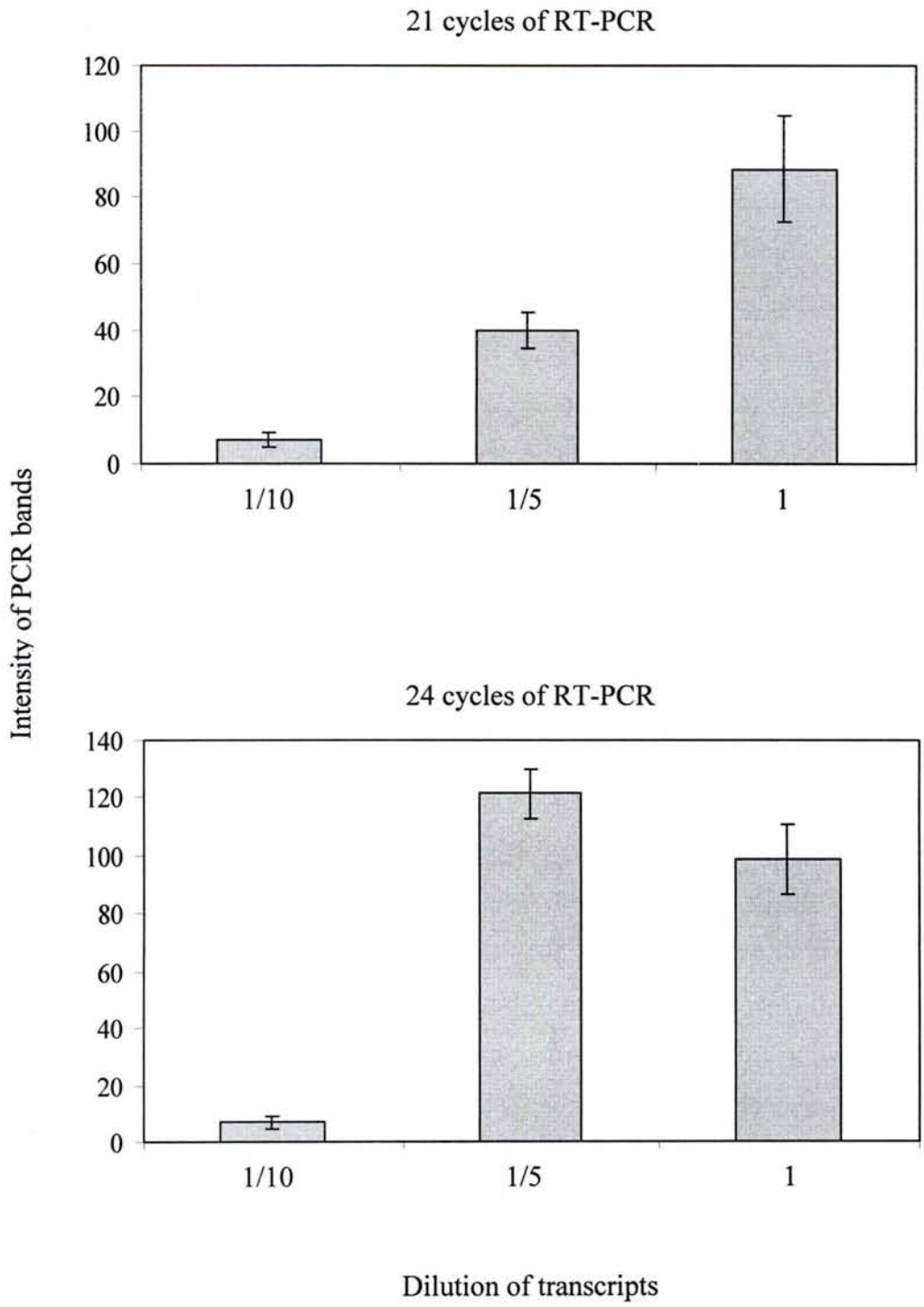


Fig. 1. Correspondence between the potential transcript quantity and the PCR fragment intensity. PCR were performed with the cDNAs respectively synthesized by 21 and 24 cycles of RT-PCR on the same soil RNA extracts. The PCR products were separated on two % agarose gels and their intensity quantified using ImageQuant software. The number (1) was given to the cDNA extracts not diluted, (1/5) and (1/10) correspond to the dilution factors tested. A value of 100 was given to the PCR product intensity obtained for the first undiluted extract of the two independent repetitions. Histograms represent the mean values, and bars standard deviations.

obtained from the soil samples (44 sequences), the fruit-body and culture collection (51 sequences) and GenBank (13 sequences), using the program MultAlin (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html) (IBCP, Lyon, France) (Corpet, 1988). The resulting alignment was optimized visually. Only unambiguous alignment was used in the phylogenetic and distance analyses. The aligned sequences were exported to a NEXUS file and analyzed using PAUP*4.0b10 (Swofford, 1998). The final alignment of the laccase coding regions has a total of 100 unambiguously aligned sites and 94 characters were parsimony-informative. The final alignment of laccase sequences is available on request. The final tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method. The approach selected for the analysis of the molecular data set was the Kimura two parameters (Kimura, 1980). All characters were treated with equal weight and the bootstrapping was performed with 1000 replications. The final result was compared to the 50% majority-rule consensus tree using maximum parsimony (MP) analysis. The MP tree was performed using heuristic search option with 50 random sequence additions and tree bissection reconnection (TBR) branch-swapping (Swofford, 1998). The tree was drawn with CorelDraw 11. Laccase sequences of the ascomycetes *Colletotrichum lagenarium* (GenBank accession n°AB055709), *Gaeumannomyces graminis* (GenBank accession n°AJ437319) and *Botryotinia fuckeliana* (GenBank accession n°AF243855) were used as out-group to root the tree.

3. Results

3.1. Semi-quantitative PCR analysis on the soil cDNAs

The cDNAs were synthesized by RT-PCR on the total RNA extracted from the O_h-horizon of each soil core. In two independent repeats, the exponential phase of cDNA synthesis allowing a positive correlation between transcript quantity in soil extracts and signal intensity on agarose electrophoresis gels was shown to be obtained for 21 RT-PCR cycles (Fig. 1). The two primer pairs Cu1F/Cu2R and Act1/Act2 were used to respectively amplify basidiomycete laccase and fungal actin fragments from these cDNAs. PCR fragments of 142 and 144 bp were obtained for laccase and actin, respectively (Fig. 2). As many laccase gene fragments contain introns in their coding region, which would have given longer PCR products, the absence of additional larger

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

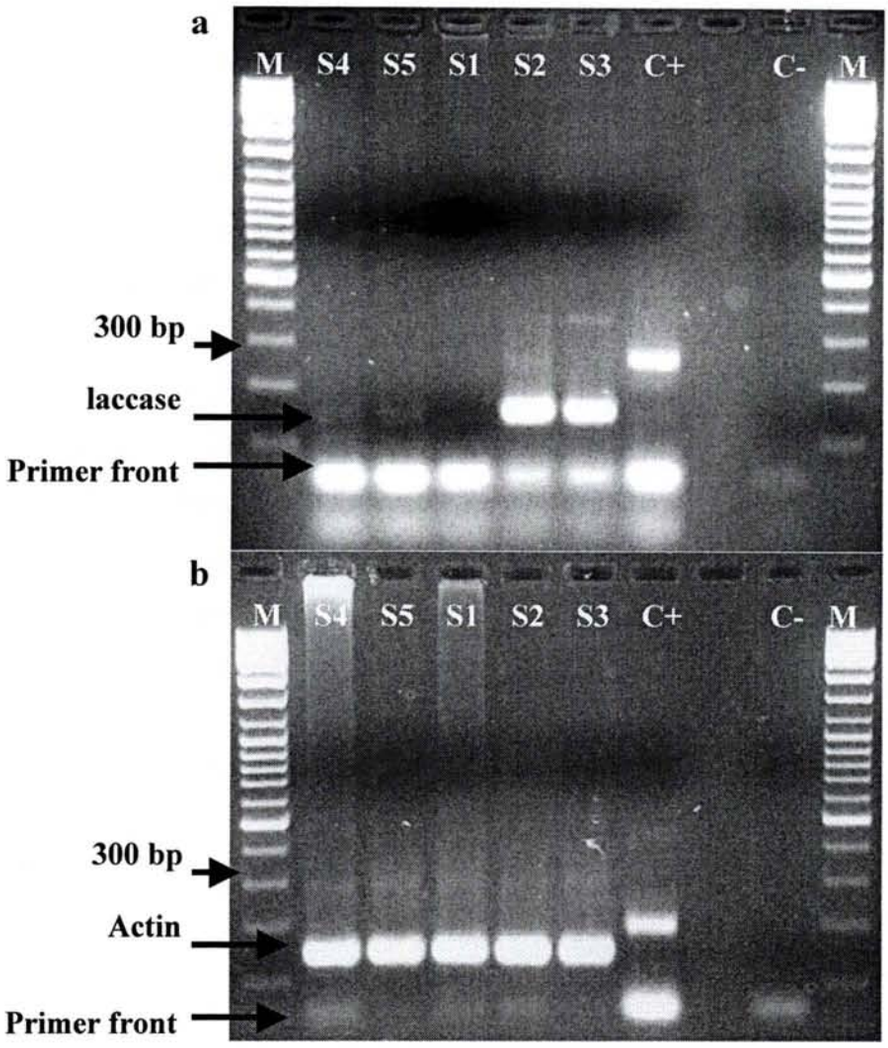


Fig. 2. Semi-quantitative PCR on laccase (a) and actin (b) cDNAs synthesized from total RNA isolated directly from 5 samples (S1-S5). PCR products were separated using 2 % agarose gel electrophoresis. (C+) and (C-) correspond to a 250 bp fragment obtained by PCR on the genomic DNA of *Collybia fusipes* and a negative control without genomic DNA or cDNA, respectively. The 100 bp DNA ladder mix (MBI fermentas) is represented by the letter (M).

bands on the gels allowed us to rule out any contamination with residual genomic DNA in both reactions. Under the optimized semi-quantitative PCR, the Cu1F/Cu2R primers gave bands of different intensities for the five compared soil RNA extracts (Fig. 2a). The extracts from samples S2 and S3 gave intensive bands, whereas those from samples S4 and S5 were very faint. No PCR product was detected with the RNA extract from sample S1 (Fig. 2a). By making additional PCRs with the Cu1F/Cu2R primers under less stringent conditions (increasing the number of cycles to 40 and the annealing time to 2 min), intensive 142 bp bands could be obtained for the RNA extracts S4 and S5. However, additional fragments having no compatible size with laccase transcripts indicated a loss of specificity in the PCR (data not shown).

Under the stringent conditions, the semi-quantitative PCR of actin transcripts gave bands of equal intensity for the five soil samples (Fig. 2b). This result allows to exclude that the variable band intensities for the expression analysis of the laccase genes were due to factors inhibiting the cDNA synthesis in some of the replicates. The variable band intensities likely reflected differences in the expression level of the laccase genes in the five soil cores, indicating a spatial heterogeneity of the gene expression in the analyzed forest soil.

3.2. Comparison between the distribution of laccase genes and laccase transcripts

For samples S2 and S3, the intensive fragments obtained by PCR on the transcripts (soil mRNA) were cloned into bacteria, and 25 clones per sample were sequenced. A total of 14 different laccase transcript sequences were revealed. Respectively six sequences were specific to each core S2 and S3, which shared two additional sequences. From this set of 14 sequences, the two shared transcripts corresponded to genes also detected in the O_h horizon of S2 and S3 in the analyses on DNA soil extracts (Luis *et al.*, 2004): the first transcript to a gene sequence deposited on GenBank under AJ540285 and matching closely to *Xerocomus chrysenteron* (see Fig. 3); the second transcript to a deposited sequence (AJ540297) included in a clade without identified fungus but related to boletaceae (see Fig. 3). Additionally, one transcript sequence of S3 (AJ540255) also closely matched to a *Xerocomus chrysenteron.* Laccase had already been detected in this sample at the genomic level (Luis *et al.,* 2004). In S2, one transcript fragment (AJ420347) belonged to the

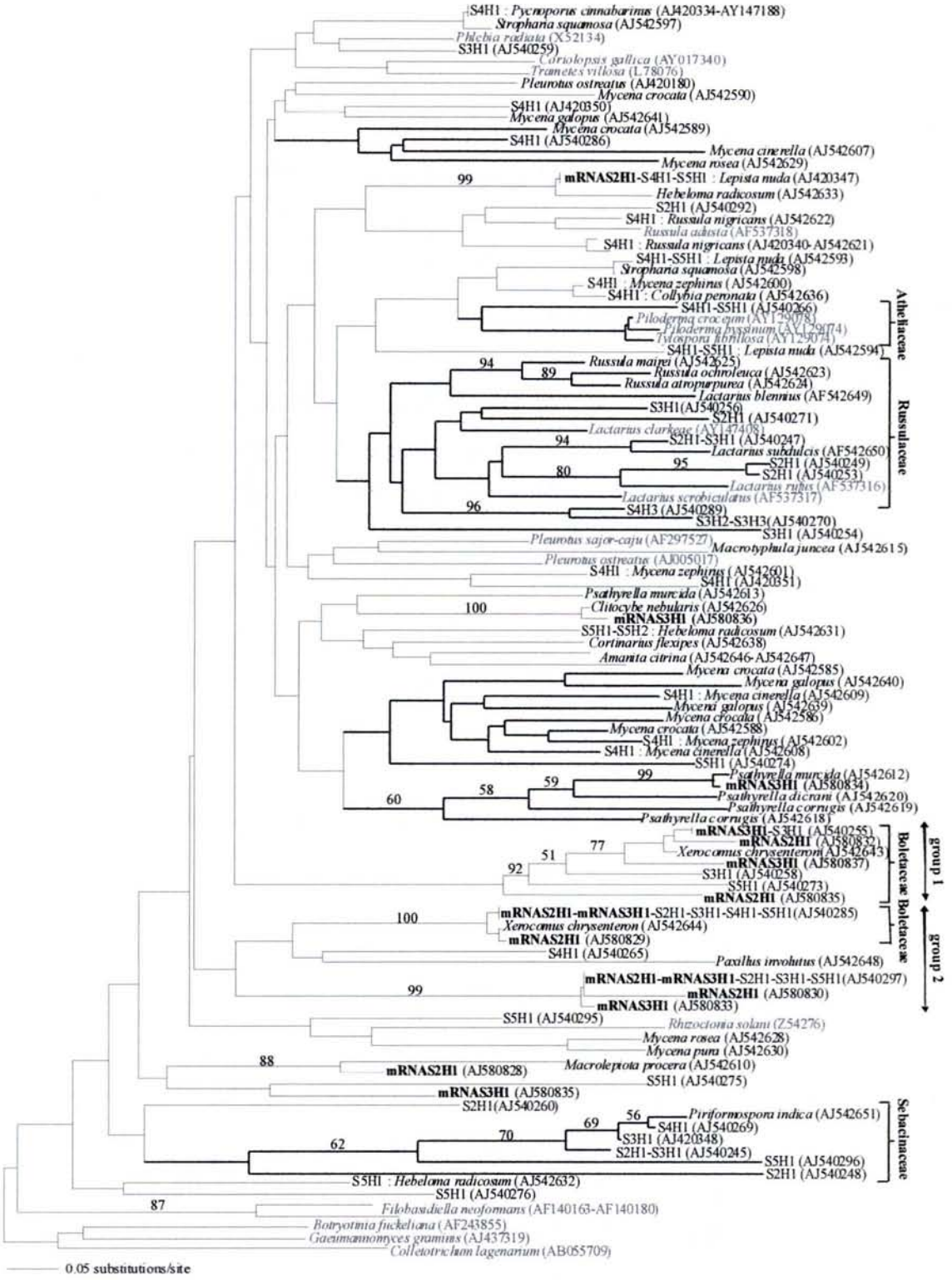


Fig. 3. Neighbor-joining tree representing the genetic distance between the 14 laccase transcript sequences (present study, in bold), the deduced coding-regions of 44 laccase genomic fragments found in the same soil cores (Luis *et al.*, 2004) (in black), 51 laccase genomic fragments amplified from fruit-body and culture collections (in black), and 13 laccase sequences retrieved from GenBank database (in gray). S1 to S5 correspond to the replicate numbers and H1 to the O_h-horizon. The NJ tree was rooted using sequences of the ascomycetes *Colletotrichum lagenarium* (GenBank accession n°AB055709), *Gaeumannomyces graminis* (GenBank accession n°AJ437319) and *Botryotinia fuckeliana* (GenBank accession n°AF243855). Bootstrapping was performed with 1000 replications in p-distance analysis. The potential mycorrhizal specific clades present bold branches.

saprophytic fungus *Lepista nuda*. The remaining five different transcript fragments in each soil sample corresponded to new sequences not detected in our previous analysis on DNA extracts at the site.

As 11 different laccase genes had been found with the DNA extracted from the O_h-horizon of each sample S2 and S3 (Luis *et al.,* 2004), the expression ratios revealed by the RNA analyses were of 18.2 (2/11) and 27.3% (3/11), respectively.

The 14 transcript sequences were included in a NJ analysis with the closely related deduced coding regions of laccase gene fragments obtained from the DNA extracts of identified fungi or soil samples and from the GenBank database. All transcript fragments sequenced appeared to be closely related to basidiomycete laccase gene sequences, confirming the specificity of the primer pair Cu1F and Cu2R for basidiomycetes. Six of the 10 new genes, revealed by the expression study, clustered in two groups (Fig. 3) containing a laccase gene sequence from *Xerocomus chrysenteron*, an ectomycorrhizal fungus collected at the field site. Among the four remaining new transcript sequences, three were closely related to the *Clitocybe, Psathyrella* and the *Macrolepiota* laccase sequences, respectively, three taxa for which no fruiting bodies were found at the site in the investigation period reported here, which did not allow assessing definitely the identity of those genes. The last transcript was related to no known sequence (Fig. 3).

4. Discussion

The aim of this study was to optimize a method based on RT-PCR on soil mRNA extracts followed by semi-quantitative PCR to characterize the expression of basidiomycete laccase genes in soils. In a very first assessment, the method was used in five soil cores of a brown forest soil to compare such expression profiles with the gene diversity profiles that had been found in the same cores previously (Luis *et al.,* 2004). The brown forest soil of the experimental station of Steigerwald has a fine moder humus layer characterized by a rapid turnover of the organic matter (OM) which sparsely accumulates in the lower horizons. The thin organic horizon O_h (1 to 0 cm) corresponding to the fine humus layer contains about 19.0% of organic carbon (C_{org}), while the organo-mineral A_h (0 to 6 cm) and the mineral B_v (6 to 34 cm) horizons present respectively 3.38% and 1.19% of C_{org} (Seiler, 1995). Vertical distribution of laccase nucleotide sequences previously determined for the five cores

had showed higher laccase-gene diversity in the organic O_h-horizons (Luis *et al.*, 2004). For the preliminary assessment of the expression profiles by RNA analysis, we therefore concentrated our investigation on the O_h-horizon.

The levels of the laccase transcripts assessed by semi-quantitative PCR were heterogeneous amongst the five soil cores. The equal amplification of the actin transcripts indicated that the absence or the weakness of laccase semi-quantitative PCR fragments in three of the samples (S1, S4, S5) likely resulted from the absence and low amount of laccase RNA matrice compared to S2 and S3 samples. Selection of an additional fungal gene as positive control system for the laccase expression followed strict criteria. The gene had to be constitutively expressed in fungi. A number of sequences for a diversity of fungi had to be available and to display a polymorphism compatible with PCR amplification in a wide range of basidiomycete with a single primer set. The amplified transcript had to display the same length as the ones amplified for laccase genes in order to warrant equal amplification conditions in the semi-quantitative PCR. A research in GenBank showed the actin genes to meet all demands and we developed this control system which to our knowledge was not described previously.

The primer pair Cu1F and Cu2R is basidiomycete specific and gives fragments around 200 bp for the laccase genes and 142 bp for the corresponding coding regions (Luis *et al.*, 2004). For most laccase transcripts revealed in samples S2 and S3, the corresponding genomic fragment had not been detected during the previous DNA analysis of the soil cores (Luis *et al.*, 2004). This discrepancy could result from (1) the occurrence of introns in the primer annealing sites precluding PCR amplification (Giardina *et al.*, 1995), (2) an excess of some DNA matrices in the soil extracts resulting in a lack of amplification of weakly present genes however displaying expression, and (3) the sequencing of a limited number of clones. Concerning the first hypothesis it is to underline that Cu1F and Cu2R primers were optimized in comparison to a set of different primers on a wide range of basidiomycetes and that they appeared to be the most universal in this group (Luis *et al.,* 2004). The copper binding sites are the most conserved region of laccase genes, but occurrence of introns in this region cannot be ruled out. Both last reasons can also basically explain the obtaining of *Lepista nuda* sequence from the RNA extract and not from the DNA extract of the soil sample S2. However, as a preliminary saturation experiment at the genomic DNA level had revealed that the sequencing of 25 clones allowed to characterize almost thoroughly the

diversity of the laccase gene fragments in the Oh horizon (Luis *et al.*, 2004), explanation (3) is less probable.

The NJ analysis showed that a majority of the detected laccase PCR sequences were grouped in two clades closely related to the ectomycorrhizal fungus *Xerocomus chrysenteron* (Fig. 3). In ectomycorrhizal fungi, laccase gene sequences tend to form distinct clades within families (Luis *et al.*, 2004). Therefore the new transcript sequences related to *Xerocomus chrysenteron* might correspond to fungi in the Boletaceae (Fig. 3). The remaining transcript fragments clustered closely to sequences of saprophytic species, such as *Clitocybe*, *Lepista*, *Psathyrella*, and *Macrolepiota* species to which they could be related. As we did not find fruiting bodies of these species at the site in the investigation time, this relation could not be assessed. However, these taxa are not uncommon in the forest type examined.

The clear detection of laccase gene expression in S2 and S3 could correspond to the fact that these samples were densely colonized by tree rootlets. Rhizospheric soil compartments are highly colonized by mycorrhizal fungi many of which were shown to have laccase genes (Chen *et al.*, 2003; Read and Perez-Moreno, 2003). In rhizospheric soils, root exudates (rich in carbon) maintain a broad community of microorganisms including producers of oxidative enzymes involved in the degradation of complex soil components (Landeweert *et al.*, 2003). This diversity is even larger in organic horizons densely colonized by roots due to the abundance of dead rootlets and polyphenols from the litter (McDowell, 2003). In such soil compartments, the high competition for resources (i.e. carbon, nitrogen, phosphate) in diverse forms might stimulates the production of fungal exo-enzymes by both mycorrhizal and saprophytic fungi. The lack or weak detection of laccase expression in S1, S4, S5 indicates that the concentration of the corresponding RNA matrices for the RT-PCR was lower in this bulk soil samples. This could reflect either a lower concentration of mycelia per volume unit or, as fungal laccases are known to be actively produced in presence of their substrates (Thurston, 1994; Smirnov *et al.*, 2001), a lack of laccase substrates compared to the rhizospheric soil. These hypotheses should however be considered cautiously, as only one fungal group (basidiomycetes) and one oxidative enzyme was analyzed. Furthermore, the limited sampling in this study aiming to demonstrate the potential of RT-PCR and semi-quantitative PCR for gene expression profiling in forest soils cannot allow us to draw definitive ecological conclusions.

As less than 30% of the laccases were found to be expressed in soil cores, simultaneous DNA and RNA analyses should be performed to have a representative assessment of the laccase genomic diversity versus laccase expression profiles. The approach developed here could be used in short to long time monitoring of the diversity and expression of the basidiomycete with laccases genes.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the frame of its joined program "Soils as source and sink of CO_2" (SPP1090) by grant number Bu 941/2-2. We are indebted to Uwe Hell and Dr. Kalbitz (Institute of Ecosystem Research (BITÖK), University of Bayreuth, Germany) for their help during the soil sampling. We would like to thank Bettina Zimdars (University of Leipzig, Germany) for technical assistance and Patrick Frettinger (University of Leipzig, Germany) for agarose gel quantifications.

References

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25, 3389-3402.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G., 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. Biochimica Biophysica Acta 1379, 381-390.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Applied and Environmental Microbiology 61, 1876-1880.

Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. Applied and Environmental Microbiology 64, 3175-3179.

Chen, D.M., Bastias, B.A., Taylor, A.F.S., Cairney, J.W.G., 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. New Phytologist 157, 547-554.

Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Research 16, 10881-10890.

Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T., 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytologist 156, 527-535.

Dighton, J., Kooistra, M., 1993. Measurement of proliferation and biomass of fungal hyphae and roots. Geoderma 56, 317-330.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.-E., 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Letters 391, 144-148.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.-E., 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. FEBS Letters 407, 89-92.

Emmerling, C., Schloter, M., Hartmann, A., Kandeler, E., 2002. Functional diversity of soil organisms – a review of recent research activities in Germany. Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences 165, 408-420.

Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G., Sannia, G., 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 61, 2408-2413.

Gramss, G., Guenther, T., Fritsche, W., 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. Mycological Research 102, 67-72.

Holben, W.H., Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M., 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial diversity. Journal of Bacteriology 180, 4765-4774.

Killham, K., 1994. Soil ecology. Cambridge University Press, 260 pp.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16, 111-120.

Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T. W., Hoffland, E., Rosling, A., Wernars, K., Smit, E., 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Applied and Environmental Microbiology 69, 327-333.

Luis, P., Walther, G., Kellner, K., Martin, F., Buscot, F., 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. Soil Biology and Biochemistry, in press.

Lyons, J.I., Newell, S.Y., Buchan, A., Moran, M.A., 2003. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a Southeastern US salt marsh. Microbial ecology 45, 270-281.

McDowell, W.H., 2003. Dissolved organic matter in soils – future directions and unanswered questions. Geoderma 113, 179-186.

Read, D.J., Perez-Moreno, J., 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytologist 157, 475-492.

Seiler, J., 1995. Bodenkundliche Charakterisierung der Einzugsgebiete "Steinkreuz/ Erlensumpf" bei Ebrach und "Runderbusch" bei Schrappach im nördlichen Steigerwald. Interner Bericht. Bayreuther Institut für Terrestrische Ökosystemforschung (BITÖK), Bayreuth. (in German).

Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis (2nd Ed). Academic Press, San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 605 pp.

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

Smirnov, S.A., Koroleva, O.V., Gavrilova, V.P., Belova, A.B., Klyachko, N.L., 2001. Laccases from Basidiomycetes: Physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. Biochemistry 66, 774-779.

Swofford, D.L., 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.

Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N., Larsson, K.-H., 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. New Phytologist 159, 153-165.

Thorn, G., 1997. The fungi in soil. In: van Elsaß, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York, pp. 63-128.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140, 19-26.

Wintzingerode, F.V., Gohel, U.B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Review 21, 213-229.

DISCUSSION GENERALE

Comme il l'a été évoqué dans l'analyse bibliographique (Introduction générale), le sol abrite une large diversité d'organismes et plus particulièrement de micro-organismes impliqués dans le fonctionnement des cycles bio-géochimiques. Ils assurent entre autre la minéralisation de la MOS et donc le recyclage du carbone. En d'autres termes, le stock de carbone organique dans les sols est soumis à un équilibre dynamique entre les apports de MO fraîche essentiellement d'origine végétale, l'accumulation de substances humiques et la décomposition par minéralisation principalement sous le contrôle de l'activité microbienne du sol (Belong *et al.*, 1996). La régulation de cet équilibre passe donc par la compréhension des processus biologiques qui le régissent. A plus d'un titre, les espèces fongiques impliquées apparaissent légitimement comme des cibles majeures et prioritaires dans les recherches à mener.

En premier lieu, en terme de biomasse, ils constituent le groupe d'organismes vivants le plus abondant dans la majorité des sols terrestres (Thorn, 1997). De plus, il est important de rappeler ici que les champignons s'avèrent, grâce à leur mode de croissance mais aussi et surtout à leurs capacités enzymatiques, fortement équipés pour assurer la dégradation des débris insolubles végétaux (Carlile *et al.*, 2001). Ils constituent ainsi l'un des principaux groupes d'organismes responsables du recyclage des composants des plantes, et par conséquent, des phénomènes de dégradation et d'humification se déroulant dans les sols. Une grande variété d'enzymes extracellulaires est produite par les champignons autorisant la dégradation de presque toutes les macromolécules existantes. Cependant, les très nombreuses espèces de champignons différant par leurs équipements enzymatiques propres, les processus de dégradation et d'humification sont sous le contrôle d'une communauté fongique complexe (Carlile *et al.*, 2001). La compréhension du rôle des champignons dans les processus de minéralisation et d'humification des sols, n'est envisageable qu'à l'issue d'études menées non pas sur quelques espèces mais portant sur la structure et le fonctionnement de la communauté fongique dans son ensemble. Ces études visent à répondre à de nombreuses questions d'importance écologique :

(1) *Quelle est la structure de ces communautés en terme de nombre et d'abondance d'espèces, de variabilité inter- et intra-spécifique, de distribution spatiale des espèces ?* (2) *Comment cette structure est maintenue ou affectée par les différents facteurs environnementaux tels la diversité du couvert végétal, les types de sols, les*

Tableau 7. Classification fonctionnelle des 1.2 millions de gènes détectés dans la mer des Sargasses. Il est à noter que 28 023 gènes ont été classés dans plus d'une catégorie fonctionnelle (d'après Venter *et al.*, 2004).

Catégorie fonctionnelle	Nombre total de gènes
Biosynthèse d'acides aminés	37 118
Biosynthèse de cofacteurs, de groupes prosthétiques ou de transporteurs	25 905
Enveloppe cellulaire	27 883
Processus cellulaires	17 260
Métabolisme intermédiaire central	13 639
Métabolisme de l'ADN	25 346
Métabolisme énergétique	69 718
Métabolisme des acides gras et des phospholipides	18 558
Fonctions des éléments mobiles ou extrachromosomales	1 061
Protéines d'adressage	28 766
Synthèse protéique	48 012
Purines, pyrimidines, nucléosides, et nucléotides	19 912
Fonction de régulation	8 392
Signal de transduction	4 817
Transcription	12 756
Transport et fixation protéiques	49 185
Fonction inconnue	38 067
Micelle	1 864
Protéines hypothétiques	794 061
Nombre de catégories fonctionnelles assignées	1 242 230
Nombre total de gènes détectés	1 214 207

apports organiques, les perturbations, les successions et les interactions (coopération, compétition...) ? (3) *Quel est le rôle joué par ces communautés dans le fonctionnement de l'écosystème, autrement dit, quelles fonctions possède chaque espèce ou chaque individu ? Ces fonctions sont-elles redondantes ou complémentaires ? A quel moment sont-elles exprimées ? Quel est le rôle joué par les isoenzymes et les familles multi-géniques au sein d'une même espèce ?*

Comprendre le fonctionnement de la communauté fongique dans les sols : une tâche difficile

Analyser cette communauté fongique complexe est un défi qui s'avère difficile à plus d'un titre. En premier lieu, comprendre la dynamique et le fonctionnement des communautés fongiques, c'est établir un lien entre la diversité génétique et la diversité fonctionnelle. C'est à dire idéalement identifier tous les individus du cortège fongique et comprendre comment ils fonctionnent et interagissent dans l'ensemble des conditions offertes par l'écosystème (Jany, 2002). Or malgré l'utilisation de plus en plus aisée de techniques de typages moléculaires (Dahlberg, 2001), il reste difficile d'identifier tous les individus en particulier pour certains genres et espèces encore méconnus (Horton & Bruns, 2001). De plus, étudier globalement la fonction des milliers de gènes et protéines fongiques dans les sols reste, même aujourd'hui avec le développement de la génomique fonctionnelle (Martin, 2001), difficile à court terme. En effet, ce genre d'étude « à grande échelle » en cours de développement n'est actuellement applicable qu'à un nombre restreint d'écosystèmes. Il s'agit essentiellement d'écosystèmes lacustres ou océaniques à faible structuration. Par exemple, Venter *et al.* (2004) ont détecté plus de 1.2 millions de gènes dans la mer des Sargasses. Ces gènes entrent dans plusieurs catégories fonctionnelles tels le métabolisme énergétique (plus de 69 000 gènes), les processus cellulaires (plus de 17 000 gènes) ou la biosynthèse des protéines (plus de 48 000 gènes) (Tableau 7). La sélection raisonnée de quelques gènes marqueurs fongiques dont la fonction est supposée importante pour les flux de carbone, d'azote et de phosphate (les laccases, les phosphatases, les protéases...) est l'une des meilleures approches envisageables à court terme (plus faible coût humain et financier) dans l'étude des sols.

Les laccases sont les seules enzymes à faible spécificité de substrat, largement distribuées chez les champignons, dont l'implication dans des phénomènes de dégradation complexes (Eggert *et al.*, 1997 ; Zavarzina *et al.*, 2004 ; Criquet *et al.*, 2000) et d'humification (Chefetz *et al.*, 1998 ; Zavarzina *et al.*, 2004) a été démontrée à plusieurs reprises. De nombreuses espèces fongiques impliquées étant des Basidiomycètes, notre étude s'est donc attachée à développer et à appliquer des techniques moléculaires permettant d'apporter des informations sur la diversité génétique et fonctionnelle des champignons Basidiomycètes présentant une activité laccasique dans les sols. Un œil critique notera que peu de liens entre diversités génétique et fonctionnelle ont été établis. Toutefois, notre étude apporte des informations considérables sur la diversité des gènes laccasiques chez les Basidiomycètes ectomycorhiziens et saprophytes et leur distribution dans les sols.

Approches développées afin d'étudier la diversité génétique et fonctionnelle des champignons Basidiomycètes présentant une activité laccasiques dans les sols, avantages et contraintes

Les deux approches développées, qui se sont révélées complémentaires, impliquent l'extraction d'acides nucléiques à partir d'échantillons de sol et leur utilisation dans des réactions ciblées de PCR. Une fois les méthodes d'extraction d'ADN (étude de la diversité génétique) et d'ARN (étude de la diversité fonctionnelle) établies à partir de protocoles existants (Hurt *et al.*, 2001), il a fallu développer des amorces spécifiques. La mise au point de ces amorces spécifiques (Cu1F et Cu2R) n'a été possible que grâce à deux principales caractéristiques propres aux laccases. (1) Tout comme les espaceurs inter-géniques transcrits (ITS) de l'unité répétée de l'ADN ribosomal nucléaire (White *et al.*, 1990), les laccases possèdent des régions relativement conservées (codant les sites de fixation des atomes de Cu) bordant des régions suffisamment variables pour permettre de distinguer les gènes amplifiés (Thurston, 1994 ; D'Souza *et al.*, 1996 ; Lyons *et al.*, 2003). (2) Les structures tertiaires des laccases de Basidiomycètes et d'Ascomycètes diffèrent par de nombreux aspects qui résultent de différences génétiques considérables (Hakulinen *et al.*, 2002). Grâce aux séquences protéiques et géniques d'espèces fongiques disponibles, nous avons pu déterminer dans les régions conservées des séquences propres aux Basidiomycètes et, après synthèse des amorces adéquates, réaliser l'amplification sélective de fragments de

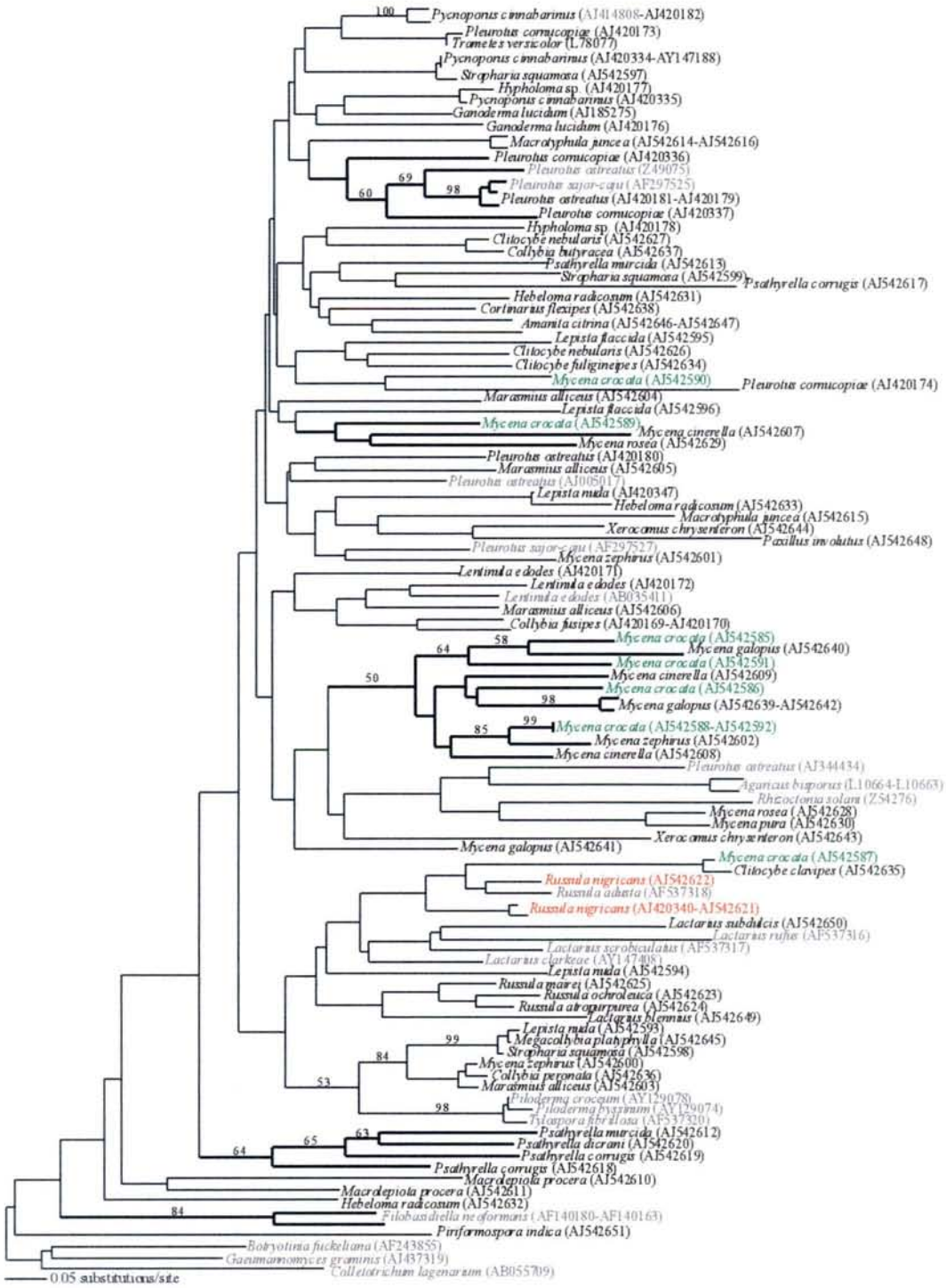


Figure 10. Cladogramme présentant les distances génétiques entre les 90 gènes laccasiques obtenus par PCR à partir des souches de référence (en noir) et les 19 séquences issues de GenBank (en gris). Sont indiquées en vert toutes les séquences issues du champignon saprophyte *Mycena crocata* et en rouge les séquences du champignon ectomycorhizien *Russula nigricans* .

gènes laccasiques chez ce groupe fongique. La spécificité des amorces pour les espèces Basidiomycètes semble avoir été, jusqu'à présent, confirmée lors de nos différentes investigations (Cf. Chapitre I, II, III). Cependant, il est important de signaler que ces amorces ont été déterminées à partir des séquences disponibles dans la base de donnée internationale GenBank du NCBI. Par conséquent, d'éventuels Ascomycètes présentant des domaines conservés plus proches de ceux des Basidiomycètes que de leur propre groupe pourraient être amplifiés. Inversement, des Basidiomycètes présentant des domaines conservés plus proches des Ascomycètes pourraient ne pas être amplifiés. Ce genre de problème fut souligné par Lyons *et al.* (2003) lors de leur étude sur la diversité des gènes laccasiques d'Ascomycètes.

Lors de l'évaluation de la spécificité et de l'efficacité des amorces sur une soixantaine de souches fongiques de références (cultures pures et carpophores) appartenant à une large gamme de taxa, les caractères multi-géniques et spécifiques des gènes laccasiques de Basidiomycètes sont apparus remarquables (Cf. Chapitre I). En effet, les résultats obtenus à partir de ces souches de références ont confirmé un aspect établi déjà depuis plusieurs années, c'est à dire qu'une même espèce peut posséder plusieurs types différents de gènes laccasiques (famille multi-génique)(Wahleithner *et al.*, 1996 ; Mansur *et al.*, 1997 ; Hoegger *et al.*, 2004). Elle a surtout permis de souligner deux aspects importants jamais évoqués jusqu'à présent : (1) Une séquence de gène laccasique n'appartient qu'à une seule espèce de Basidiomycète (synonyme d'absence de transfert horizontal) et (2) les champignons ectomycorhiziens possèdent généralement de une à trois versions de ce gène, alors que les saprophytes peuvent en posséder plus de huit (Fig. 10). Ce plus grand nombre d'exemplaires de laccases chez les espèces saprophytes pourrait être le reflet de leur mode de nutrition. La MOS étant leur unique source de carbone, la possession d'une plus large variété de laccases permettrait aux saprophytes d'accéder à une plus grande variété de substrats. Une forte diversité en laccases apparaît moins indispensable à la survie des champignons ECM, puisqu'ils reçoivent un apport de carbone sous forme de sucres de leur plante hôte (Smith & Read, 1997). Si la spécificité d'espèce des gènes laccasiques facilite l'évaluation du nombre de Basidiomycètes porteurs présents dans un sol, la multi-génie la complique. Toutefois, si un nombre d'espèces fongiques ne peut être déterminé, une plus grande diversité en gènes laccasiques est incontestablement synonyme d'une plus grande diversité en espèces.

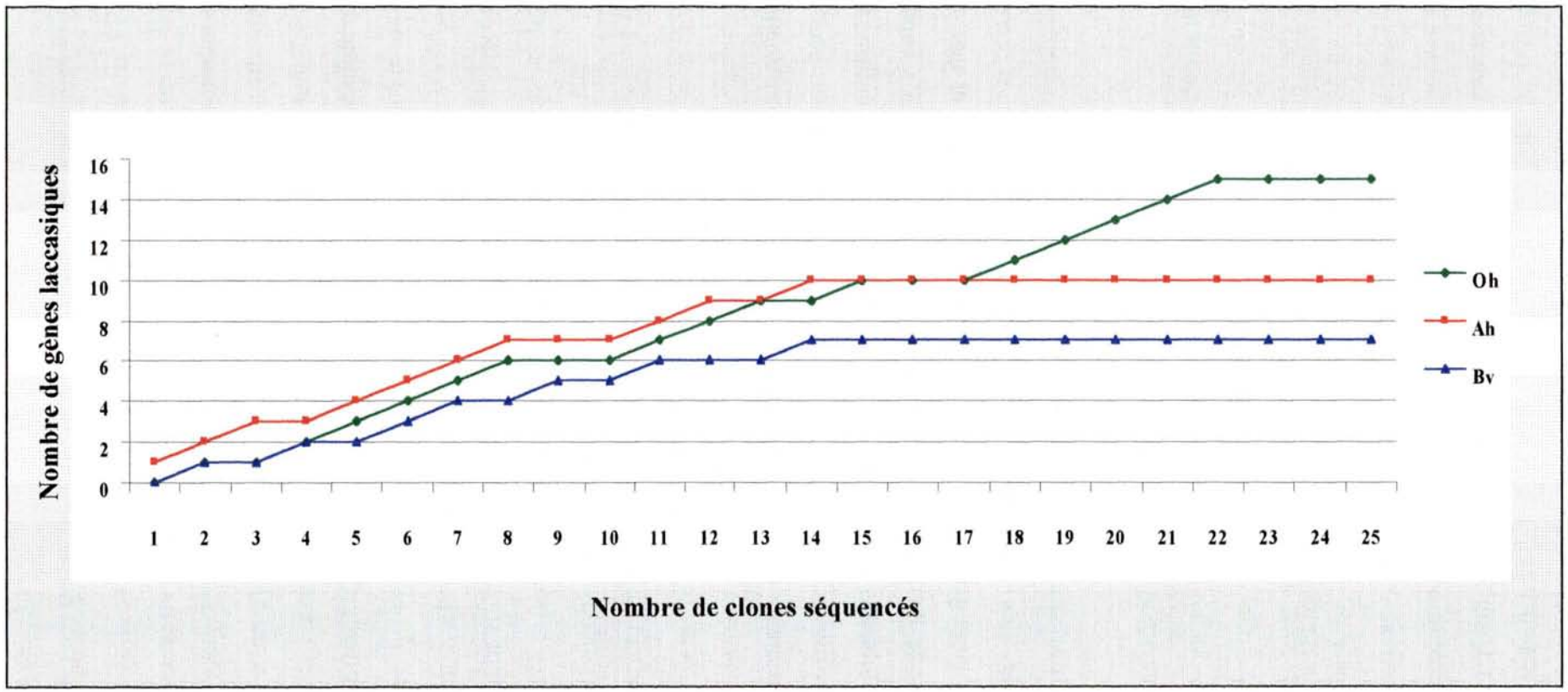


Figure 11. Courbes de raréfaction indiquant la richesse relative en gènes laccasiques de Basidiomycètes pour chaque horizon du sol brun forestier de Steigerwald en Bavière.

Le séquençage des produits amplifiés et clonés restant la méthode la plus puissante d'identification des espèces (Horton & Bruns, 2001), nous avons choisi cette approche d'analyse pour les gènes laccasiques. Bien que l'identification ait souvent été limitée par le manque de séquences de références disponibles dans les bases de données, l'attribution taxonomique au niveau de l'espèce (*Hebeloma radicosum*, *Lactarius subdulcis*, *Mycena zephirus*...), du genre (*Mycena*) ou de la famille (Boletaceae, Russulaceae, Sebacinaceae...) a été possible lors d'analyses cladistiques impliquant les séquences issues des fructifications collectées sur les sites de prélèvement (Cf. Chapitres I, II, III). Si l'utilisation de l'échantillon de sol prélevé sur le terrain supprime les nombreux biais liés à la récolte de carpophores, ce résultat souligne l'importance du maintien des inventaires mycologiques. Cette approche de séquençage implique également que soit déterminé, par analyse de raréfaction, le nombre de clones nécessaires à la caractérisation de la diversité en gènes laccasiques. En théorie, le séquençage de clones supplémentaires doit se poursuivre tant que le plateau de saturation n'est pas atteint (Francis *et al.*, 2003). Concernant le sol brun forestier étudié (Steigerwald en Bavière) qui s'est avéré détenir la plus grande diversité en gènes laccasiques, ce plateau a été atteint dès 22 clones séquencés pour l'horizon organique (O_h) et dès 14 clones pour les horizons plus minéraux (A_h et B_v) (Fig. 11). Par voie de conséquence, lors de l'analyse de diversité génétique nous avons séquencé selon le cas 25 à 15 clones. Cet ordre de grandeur semble en accord avec de précédentes études réalisées sur de l'ADN extrait de sol. Par exemple, Landeweert *et al.* (2003) ont estimé à 30 le nombre de clones nécessaires pour avoir une bonne estimation de la diversité fongique ectomycorhizienne dans un sol forestier de type podzol.

Evaluation de la diversité génétique des gènes laccasiques dans différents types de sols

Trois types de sols ont fait l'objet de cette étude sur la diversité des gènes laccasiques de Basidiomycètes. Les échantillons analysés provenaient plus précisément d'un sol brun forestier (type *Cambisol dystrique*), d'un podzol forestier (type *Podzol haplique*) et d'un sol agricole (type *Phaeozem haplique*) soumis à trois traitements (fertilisation organique, fertilisation minérale (NPK) ou absence de fertilisation). Le sol brun est situé sous une ancienne chênaie-hêtraie en phase de rajeunissement localisée à

Tableau 8. Diversité en gènes laccasiques de Basidiomycètes pour les différents horizons du sol brun forestier (Steigerwald, Bavière), du podzol forestier (Fichtelgebirge, Bavière), et pour les différents traitements du sol agricole (Halle-Saale, Haute-Saxe) (absence de toute fertilisation (U), fertilisation minérale (NPK), fertilisation organique (FYM)).

Horizon	pH* ($CaCl_2$)	C_{org} total* ($g\ kg^{-1}$)	Nombre total de gènes	Indice de diversité (Shannon)
Steigerwald				
O_h	4.2	354.3	30	2.94
A_h	3.2	70.0	17	2.71
B_v	3.9	6.0	12	2.41
Fichtelgebirge				
$O_{f\text{-}h}$	3.0	431.7	8	1.37
A_{he}	2.8	38.0	5	1.56
$B_{hs\text{-}sv}$	3.7	51.0	4	0.82
C_v	4.2	2.0	4	0.67
Halle (Saale)				
U	6.3	12.3	9	2.09
NPK	6.5	12.3	8	2.02
FYM	6.5	16.4	17	2.77

* Données issues des travaux de Kaiser *et al.* (2002) et de Schmidt *et al.* (2000)

Steigerwald en Bavière. Le podzol se situe dans le Fichtelgebirge en Bavière sous une forêt d'épicéas de plus de 145 ans. Le sol agricole quant à lui se situe au sein d'une culture de seigle localisée à Halle (Saale) en Haute-Saxe (pour plus de détails Cf. Chapitre II). Avec des indices de diversité Shannon variant de 2.41 à 2.94 selon les horizons, le sol brun forestier présente la plus forte diversité en gènes laccasiques (Tableau 8).

Pour tous les sols, nous avons mis en évidence un rapport positif entre quantité de matière organique et diversité en espèces présentes. En d'autres termes, pour les deux sols forestiers (brun et podzolique) c'est au niveau des horizons les plus riches en carbone organique que la plus grande diversité en gènes laccasiques a été détectée. De même, la parcelle agricole présentant la plus grande diversité est celle soumise à la fertilisation organique. Cependant, à côté de cet aspect purement quantitatif, la qualité de la MOS en plus d'autres facteurs souvent non déterminés semblent avoir une influence primordiale sur la diversité des espèces porteuses de gènes laccasiques. Ainsi le podzol, bien que plus riche en carbone organique que le sol brun ou que le sol agricole soumis aux différents traitements, présente la plus faible diversité génétique (Tableau 8). Un pH plus acide et une litière issue de résineux peuvent être moins propices au développement d'une population de décomposeurs variée au profit d'espèces plus adaptées à la spécificité de ce substrat (Sariyildiz & Anderson, 2003).

Au niveau des deux sols forestiers, où il existe une nette stratification des horizons, l'analyse de diversité effectuée sur chacun des horizons a permis la mise en évidence d'une diminution progressive de la diversité en gènes laccasiques (donc des espèces) en fonction de la profondeur (Tableau 8). Cette perte progressive de diversité fongique selon un gradient vertical (basse litière-horizon minérale) a également été mise en évidence lors de l'étude de Dickie *et al.* (2002) sur la distribution des espèces ectomycorhiziennes. Leur démarche était très proche de la notre en ce sens qu'elle impliquait une extraction d'ADN total à partir d'échantillons de sol et son utilisation dans des réactions ciblées de PCR. Cependant, leur gène cible n'était pas un gène fonctionnel mais les régions ITS de l'ADNr qu'ils identifiaient ensuite par T-RFLP. Ce résultat semblerait suggérer que les gènes laccasiques soient, tout comme les régions ITS, de bons marqueurs pour étudier la distribution des espèces fongiques dans les sols. Cette capacité des gènes fonctionnels à décrire la diversité génétique et la distribution

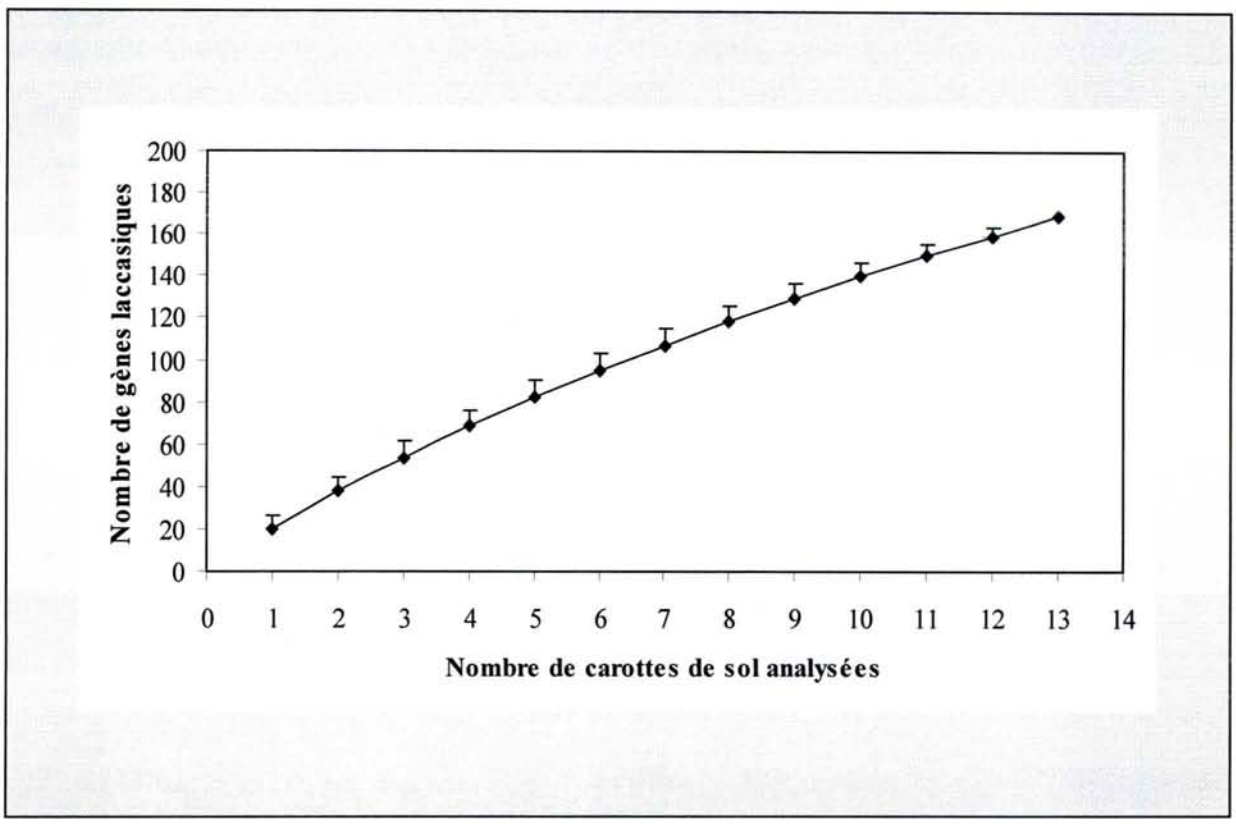


Figure 12. Courbe de raréfaction indiquant la richesse relative en gènes laccasiques de Basidiomycètes atteinte en fonction du nombre de carottes de sol analysées. Courbe réalisée sur PC Ord à partir des séquences de gènes obtenues lors de l'analyse de diversité sur le sol brun forestier de Steigerwald (Bavière).

des populations microbiennes dans leurs milieux est un fait établi chez les organismes bactériens (Ohkuma *et al.*, 1999 ; Buchan *et al.*, 2001 ; Francis *et al.* 2003). L'étude de la diversité des gènes fonctionnels dans les environnements naturels est donc devenue un outil important en écologie microbienne. Ces outils sont pourtant encore peu utilisés en écologie fongique (Lyons *et al.*, 2003). Le sol brun présentant la plus grande diversité en gènes laccasiques est le siège d'une étude plus approfondie évoquée dans les prochains paragraphes.

Etude approfondie de la diversité génétique des gènes laccasiques dans le sol brun forestier (Steigerwald en Bavière)

Diversité globale en gènes laccasiques

Le nombre total de gènes laccasiques détectés sur une surface de 100 m^2 est de 167. Cependant, la courbe de raréfaction réalisée à l'aide de ces données montre que notre échantillonnage ne permet pas encore d'atteindre le niveau de saturation (Fig. 12). Le programme ayant généré cette courbe estime la diversité globale en gènes laccasiques de cette placette à 300. Cette diversité élevée peut être liée à quatre principaux facteurs : (1) la forte diversité en organismes fongiques dans les sols (Thorn, 1997), (2) la proportion considérable de champignons présentant des activités laccasiques et donc des laccases (Gramss *et al.*, 1998), (3) le caractère spécifique des gènes laccasiques et (4) l'existence d'une famille de gènes laccasiques chez de nombreuses espèces (sinon toutes) (Wahleithner *et al.*, 1996 ; Mansur *et al.*, 1997 ; Lyons *et al.*, 2003 ; Hoegger *et al.*, 2004).

Distribution verticale des gènes laccasiques

Cette analyse souligne tout d'abord que 76% des gènes laccasiques sont localisés dans un seul horizon alors que 7% seulement sont distribués dans les trois horizons. Il semblerait par conséquent que les espèces de Basidiomycètes aient comme caractéristique d'être spécifiques d'un horizon. Seules les espèces ectomycorhiziennes feraient principalement exception à cette constatation. Si ces champignons mycorhiziens sont plus largement distribués, ils présentent toutefois une répartition préférentielle. Ainsi alors que la Russulacée de type 1 est d'avantage présente dans

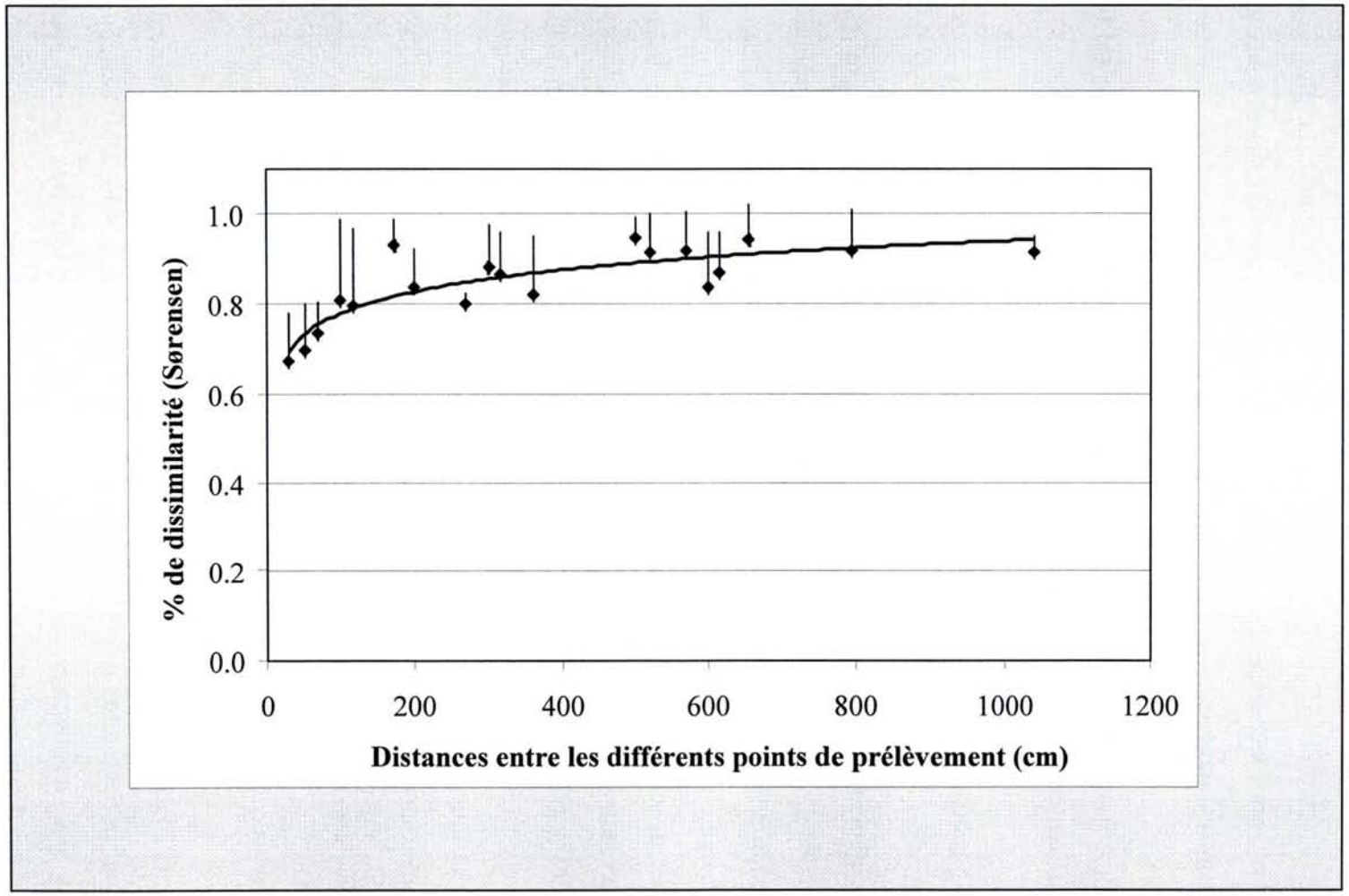


Figure 13. Pourcentage de dissimilarité entre les profils de gènes laccasiques de Basidiomycètes détectés pour chaque point de prélèvement en fonction des distances topographiques les séparant. Les valeur correspondent aux moyennes des coefficients de Bray-Curtis calculées sur PCOrd. Les barres verticales représentent les déviations standard.

l'horizon minéral (B_v), *Lactarius subdulcis* colonise préférentiellement l'horizon organique (O_h) (Cf. pages suivantes Fig.14). Compte tenu de leur mode de nutrition, les espèces saprophytes colonisent essentiellement voir uniquement les horizons superficiels plus riches en MO. Cette distribution en niches verticales des espèces fongiques en partie selon les gradients de nutriments a été également mise en évidence par plusieurs auteurs (Dickie *et al.*, 2002 ; Landeweert *et al.*, 2003 ; Tedersoo *et al.*, 2003). Dickie *et al.* (2002) en analysant la distribution du mycélium extramatriciel ectomycorhizien ont mis en évidence six principaux profils de distribution : (1) des espèces (*Ramaria concolor*, *Lactarius* sp., *Tylopilus felleus*) exclusivement localisées au niveau de la litière, (2) des espèces préférentiellement distribuées au niveau de la litière (*Trichoderma* sp., *Scleroderma citrinum, Russula* sp.), (3) de l'horizon de fermentation (*Suillus intermedius*), (4) de l'horizon humifère (*Russula* sp., *Amanita rubescens*) et (5) de l'horizon minéral (*Amanita vaginata*). Le sixième profil de distribution correspondait aux espèces à large distribution verticale telles *Clavinula cristata* et *Cenococcum geophilum*.

L'autre aspect marquant dégagé de notre étude est la congruence mise en évidence entre la diversité en gènes laccasiques et l'activité enzymatique globale mesurée au sein des horizons. Ce résultat suggère qu'une forte diversité en gènes laccasiques soit la marque d'une large activité. Cependant, les variations détectées en diversité de gènes et en activité enzymatique globale n'étant pas du même ordre de grandeur, une véritable corrélation ne peut être affirmée à ce stade. Criquet *et al.* (2000) ayant corrélé positivement une forte activité laccasique à une prolifération de champignons producteurs de polyphénoloxydases, une certaine relation entre forte diversité en gènes laccasique fongiques et large activité enzymatique totale semble cependant probable. Elle illustre l'importance fonctionnelle des champignons dans les sols.

Distribution spatiale des gènes laccasiques

La composition en espèces fongiques, possédant des gènes laccasiques, est très différente (67% de dissimilarité) entre deux points de prélèvements même lorsque ceux-ci ne sont séparés que de 30 centimètres. De plus, le pourcentage de dissimilarité augmente avec la distance (Fig. 13). Dans notre étude du site de Steigerwald, le

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

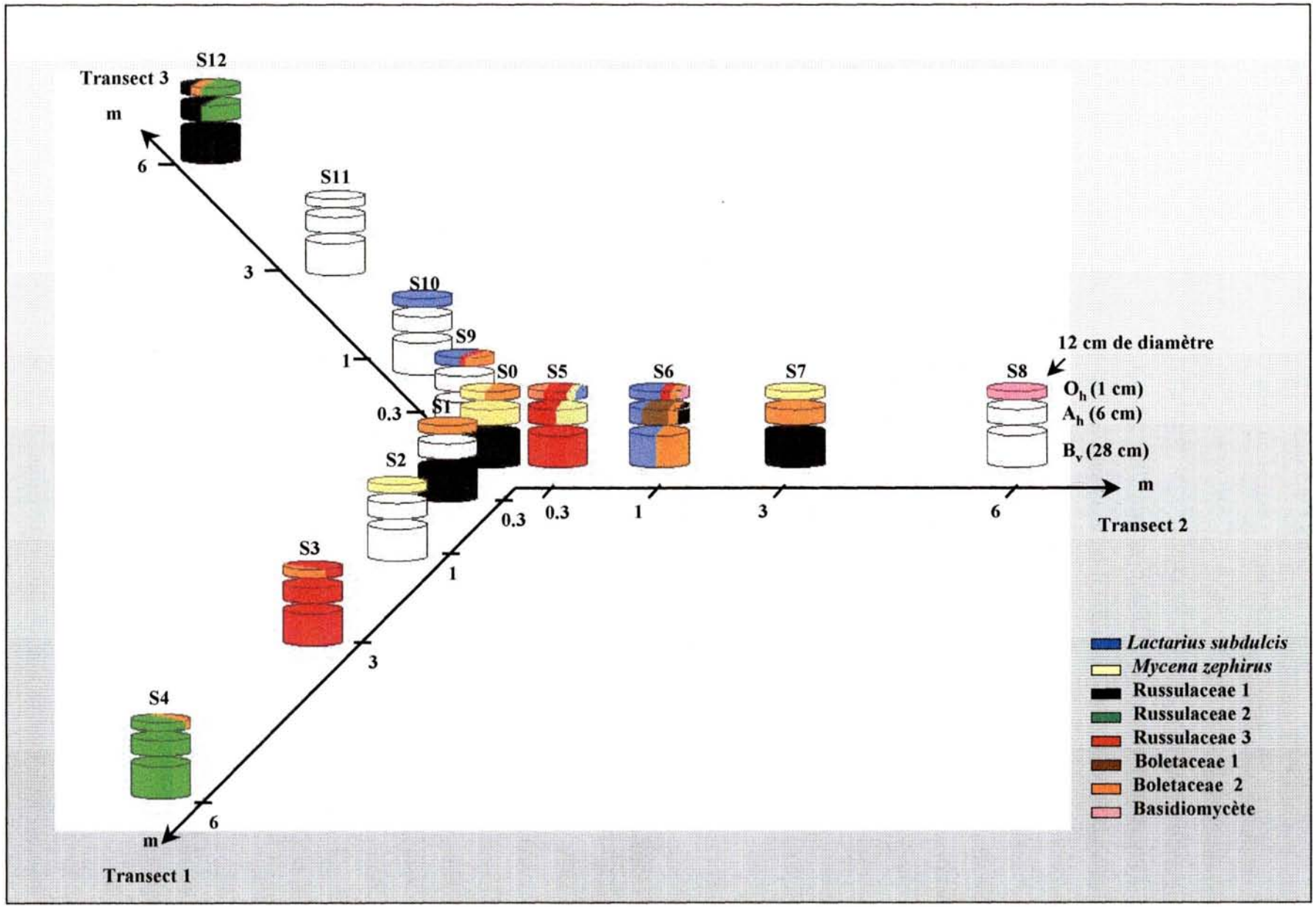


Figure 14. Distribution spatiale des huit espèces dominantes de Basidiomycètes détectées grâce à leurs laccases dans le sol brun forestier de Steigerwald (Bavière).

maximum de dissimilarité est obtenu lorsque les points de prélèvement sont éloignés de plus de 6 mètres. Ce genre de résultat était attendu compte tenu que les différentes études portant sur la composition et la distribution des espèces fongiques dans les sols ont toutes montrées qu'un échantillon de sol contient une mosaïque d'espèces plus ou moins différente de celle contenue dans l'échantillon de sol adjacent (Gardes & Bruns, 1996a ; Dahlberg *et al.*, 1997 ; Zhou & Hogetsu, 2002). De plus, les travaux récents effectués par Tedersoo *et al.* (2003) montrent que la composition en espèces ectomycorhiziennes est hautement variable entre deux échantillons distants de 5 cm et qu'un changement presque total a lieu à 50 cm de distance. *Les sols forestiers se caractérisent donc par une hétérogénéité spatiale considérable de la communauté fongique.*

Distribution spatiale des espèces dominantes

Sont considérées comme dominantes les espèces fongiques dont les laccases ont été détectées plus de cinq fois dans un des 13 échantillons de sol prélevés. Sur ce critère, huit espèces seulement sont considérées comme dominantes. Alors qu'un échantillon de sol (S11) ne renfermait aucune des espèces dites dominantes, les autres échantillons en présentaient de 1 à 6 (Fig. 14). Par conséquent, la règle générale qui veut qu'un échantillon de sol renferme de nombreuses espèces rares et peu d'espèces dominantes (Horton & Bruns, 2001) a été confirmée par notre étude. Parmi les taxa identifiés comme saprophytes ou ECM, les Basidiomycètes ectomycorhiziens constituent la majeure partie de la communauté fongique du sol forestier de Steigerwald. De plus, 75% des espèces dominantes sont des champignons ectomycorhiziens et plus particulièrement des membres de la famille des Russulacées. Cette dominance des Russulacées dans les écosystèmes forestiers tempérés a été suggérée à plusieurs reprises (Horton & Bruns, 2001).

Il n'apparaît pas de lien entre la prépondérance d'une espèce et son aire de répartition. En effet, les espèces dominantes auraient plutôt tendance à coloniser des surfaces réduites (max. 0.77 m^2). Trois principales hypothèses peuvent être émises : (1) la distribution du système racinaire et la physiologie des apex racinaires (Molina *et al.*, 1992), (2) les facteurs de compétition entre espèces (Wu *et al.*, 1999) et (3) les changements de propriétés du sol (Bruns, 1995). Ce développement mycélien limité à

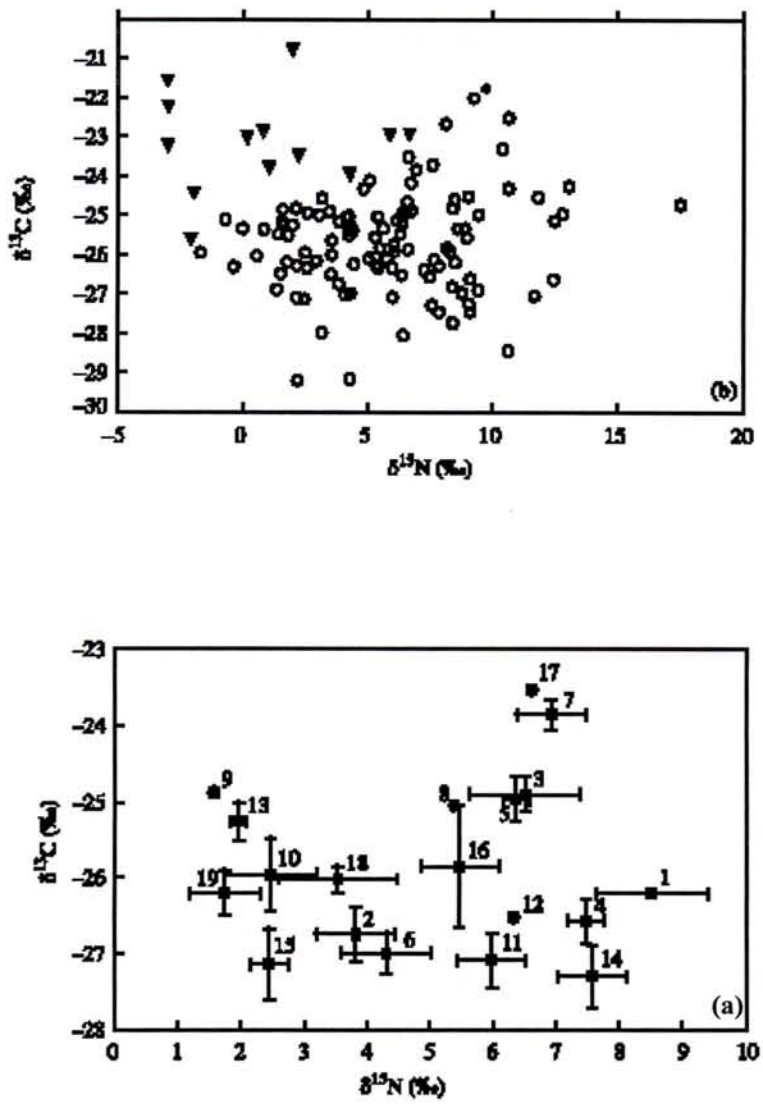


Figure 15. Signatures isotopiques chez quelques espèces fongiques. (a) Variation interspécifique de l'abondance naturelle en ^{15}N et ^{13}C chez le genre *Lactarius* (a chaque numéro correspond une espèce différente: 13 *L. rufus*, 17 *L. trivialis*...). (b) Abondance naturelle en ^{15}N et ^{13}C chez des champignons ectomycorhiziens (cercles) et des champignons saprophytes (triangles). Toutes ces mesures ont été effectuées par Taylor *et al.* (2003) sur des carpophores.

de petites surfaces et la distribution en mosaïque des espèces ont été mis en évidence dans de nombreuses autres études récentes (Zhou & Hogetsu, 2002 ; Tedersoo *et al.*, 2003). Une exploitation sélective des substrats, liée à des potentiels enzymatiques variables selon les espèces, a été mise en évidence chez de nombreux champignons (Gramss *et al.*, 1998) et notamment chez les champignons ectomycorhiziens (Read & Perez-Moreno, 2003). Cette spécificité de substrat pourrait expliquer en partie la distribution très morcelée des espèces. Tedersoo *et al.* (2003) ont souligné que les espèces saprophytes peuvent créer des habitats qualitativement différents à partir des débris tombés au sol. *La distribution en mosaïque des débris en décomposition pourrait influer sur la nature des substrats alors disponibles et donc sur la distribution des espèces ECM ou autres.*

La distribution préférentielle au sein des horizons des espèces ectomycorhiziennes précédemment évoquée pourrait être également le reflet d'une préférence de substrat liée à des potentiels enzymatiques différents (notion de diversité fonctionnelle). Ainsi, *Lactarius subdulcis* colonisant préférentiellement l'horizon organique (O_h) pourrait présenter une activité plus proche de celle des saprophytes et par conséquent obtenir une partie de son carbone de la dégradation de composés organiques présents dans le sol. D'autres Russulacées telle la Russulacée Type 1, essentiellement retrouvées dans l'horizon minéral (B_v), utiliseraient comme source principale de carbone les substances carbonées fournies par la plante hôte. Cependant, ce genre d'hypothèse ne pourra être confirmé ou infirmé que par l'application de techniques *SIP* impliquant un marquage isotopique de la litière. Une autre approche permettant d'infirmer ou de confirmer nos résultats serait d'établir les signatures isotopiques ($\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$) des carpophores de ces espèces fongiques. La règle générale veut que les espèces ectomycorhiziennes soient plus pauvres en ^{13}C et plus riches en ^{15}N que les champignons saprophytes (Hobbie *et al.*, 2001 ; Taylor *et al.*, 2003). Taylor *et al.* (2003) confirment lors de leur étude que les espèces ectomycorhiziennes et les espèces saprophytes peuvent être séparées selon leurs signatures isotopiques. Cependant, ils démontrent également que certaines espèces ectomycorhiziennes auraient des signatures plus proches de celles des saprophytes tel *Chalciporus piperatus*. De même, parmi les différentes espèces testées appartenant au genre *Lactarius* certaines présentent des signatures typiquement mycorhiziennes alors que d'autres possèdent des signatures isotopiques plus proches des saprophytes (Fig. 15).

Etude de l'expression des gènes laccasiques dans le même sol brun forestier

L'étude de l'expression des gènes laccasiques par RT-PCR et PCR semi-quantitative a été réalisée sur l'horizon organique présentant le potentiel d'expression le plus important par la richesse en substrat qu'il contient et la diversité fongique qu'il y est observée (Cf. Chapitre III). *Les résultats obtenus ont mis en évidence une expression différentielle selon que l'échantillon de sol était riche ou non en racines.* Les échantillons présentant la plus forte densité racinaire arboraient la plus forte expression de gènes laccasiques. La rhizosphère, contrairement au sol non rhizosphérique, est un lieu directement influencé par la plante avec une forte production de substrats potentiels des laccases comme les polyphénols provenant des feuilles ou encore les débris racinaires et foliaires. Or, il est admit que la sécrétion des exo-enzymes laccasiques est stimulée par la présence de son substrat. De plus, la rhizosphère possède pour chaque petit volume de sol prélevé une forte concentration de mycorhizes et de mycélium extramatriciel associé pouvant excréter des laccases. Tous ces aspects peuvent expliquer pourquoi le sol rhizosphérique pourrait présenter des concentrations plus élevées d'ARN laccasique matrice que le sol non rhizosphérique. De plus, la rhizosphère étant le siège d'une compétition forte entre organismes, cette distribution différentielle pourrait suggérer que les champignons exploitent au maximum les sources carbonées disponibles en excrétant une large quantité d'enzymes oxydatives, telles les laccases. Cependant, ces hypothèses devront être confirmées par des analyses complémentaires sur des prélèvements de sol rhizosphérique et non rhizosphérique.

Il est important de noter que seulement 30% des gènes laccasiques détectés par amplification de l'ADN génomique sont exprimés. Le séquençage des amplificats issus de la PCR semi-quantitative a également révélé que la plupart des séquences obtenues n'avaient pas été détectées lors du séquençage des produits issus de la PCR sur l'ADN du sol. Ces disjonctions entre ADN et ARN laccasiques pourraient résulter de trois principaux facteurs : (1) la présence d'introns dans la zone de fixation des amorces, (2) la possibilité d'ADN rares présentant une faible chance d'être d'amplifiés, et (3) le nombre de clones séquencés ne couvrant pas l'intégralité des séquences amplifiées. Une explication additionnelle plausible est un biais possible apporté par le fait que les

extractions d'ARN et d'ADN aient été réalisées sur des sous-échantillons différents d'un même échantillon préalablement homogénéisé. Malgré cette homogénéisation, deux sous-échantillons peuvent présenter quelques différences au niveau des espèces rares. La récupération et l'utilisation de l'ADN génomique éliminé lors du protocole d'extraction de l'ARN pourrait être une solution pour diminuer ce biais potentiel.

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible grâce à la technique développée d'identifier quels gènes laccasiques (et donc quelles espèces, quand l'identification est possible) sont exprimés dans le sol à un moment donné. L'application de cette technique sur une échelle correspondant par exemple à un cycle de dégradation de la litière pourrait mettre en évidence les successions éventuelles de gènes (et donc d'espèces) au cours de ces phénomènes dégradatoires. Le problème majeur des gènes laccasiques est cependant qu'ils codent des enzymes non seulement impliquées dans les phénomènes de dégradation mais aussi dans d'autres phénomènes, telles la formation de carpophores et la pigmentation. Leur implication dans les phénomènes de décomposition et donc dans l'assimilation d'un substrat ne pourra être confirmée que par l'utilisation de techniques *SIP*. Une autre approche pouvant apporter des informations essentielles sur le rôle des laccases (et donc des espèces fongiques associées) dans la dégradation de la MOS serait de coupler une analyse de la signature isotopique des tissus fongiques et l'expression génique. Sachant que l'ARNm peut ne pas conduire à une enzyme fonctionnelle (phénomènes postraductionnels) il serait judicieux de coupler étude de l'expression génique et mesures enzymatiques sur les même extraits de sol.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'étude des communautés fongiques naturelles à travers l'analyse de leurs gènes fonctionnels apparaît à l'heure actuelle constituer le meilleur moyen d'établir le lien entre diversité génétique et diversité fonctionnelle nécessaire à la compréhension des phénomènes complexes telle la dégradation de la MO. Les deux approches développées, qui se sont révélées complémentaires, impliquent l'extraction d'acides nucléiques à partir d'échantillons de sol et leur utilisation dans des réactions d'amplification ciblées sur les gènes laccasiques. Elles ont permis de caractériser la distribution spatiale et l'activité laccasique du mycélium des espèces de Basidiomycètes (cultivables ou non) présentes dans un sol brun forestier (Steigerwald en Bavière). Elles ont également permis la comparaison de la diversité potentielle en espèces entre sols forestiers et sols agricoles soumis à différents traitements.

Nos résultats ont mis en évidence un rapport positif entre quantité de matière organique et diversité en espèces présentes. C'est au niveau des horizons ou des traitements les plus riches en carbone organique que la plus grande diversité en gènes laccasiques et donc en espèces fongiques a été détectée. Notre étude a confirmé trois principaux aspects de la structure génétique des communautés souterraines fongiques en milieu forestier. (1) Ces communautés sont riches en espèces et notamment en espèces mycorhiziennes. (2) Elles sont caractérisées par un faible nombre d'espèces dominantes et un large nombre d'espèces rares. Ces dernières constituant l'essentiel de la diversité en espèces ne sont cependant retrouvées que dans très peu voir un seul échantillon de sol. (3) Les espèces fongiques ne sont pas aléatoirement distribuées dans les sols. Un développement mycélien horizontal, limité à de petites surfaces sous l'effet de différents facteurs (couvert végétal, conditions physico-chimiques du sol, compétition...), conduit à une distribution spatiale en mosaïque des espèces. Verticalement, certains taxa sont spécifiquement localisés dans un horizon (organique ou minéral) alors que d'autres sont plus largement distribués à travers le profile. Ces deux derniers aspects empêchent bien souvent la détermination d'un échantillonnage donnant une image exacte de la communauté fongique souterraine.

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible grâce à la technique développée d'identifier quels gènes laccasiques (et donc quelles espèces, quand l'identification est possible) sont exprimés dans le sol à un moment donné. Les échantillons de sol riches en racines (rhizosphère) semblent arborer la plus forte expression en gènes laccasiques.

Cependant, seulement 30% des gènes détectés au niveau de l'ADN génomique sont exprimés.

A court terme, ces approches pourront être utilisées dans des suivis temporels permettant l'observation des successions de Basidiomycètes dans les phénomènes de dégradation. L'établissement du même genre d'étude sur les Ascomycètes, pouvant présenter des distributions et des profils d'expression différents, est nécessaire pour avoir une vision plus globale de la communauté fongique. Les laccases étant impliquées dans de nombreuses réactions de synthèse (carpophore, mélanine...), le rôle des gènes exprimés dans les phénomènes de dégradation devra être mis en évidence dans des expériences *SIP* utilisant des substrats marqués (litière marquée au ^{13}C ou au ^{15}N). Une autre approche serait de coupler les analyses d'expression génique à des études de signatures isotopiques ou d'activités protéiques. Sachant que l'ARNm peut ne pas conduire à une enzyme fonctionnelle (phénomènes postraductionnels), l'idéal serait de travailler au niveau protéique (extraction des protéines et détermination de leurs séquences).

A plus long terme, d'autres gènes impliqués dans ces fonctions de dégradation fongiques compléteront les travaux qui viennent d'être présentés. Le développement de *microarrays* devrait constituer une aide conséquente dans le suivi d'un tel ensemble de gènes fonctionnels (et donc des espèces porteuses) dans les phénomènes de dégradation de MOS. Il s'agit là du seul moyen permettant la compréhension du rôle des gènes fongiques et des espèces associées dans les cycles bio-géochimiques tel le cycle du carbone. Ce nouvel outil devrait, de plus, permettre de comparer un plus grand nombre de sites avec plus de facilité et de rapidité. En effet, un filtre donné peut parfaitement permettre en un temps rapide de connaître quelles espèces sont présentes en un lieu, si l'on fait l'a priori réaliste que les communautés fongiques de deux sols comparables devraient être caractérisées par un nombre important d'espèces potentielles communes, et surtout si on fait abstraction des espèces rares.

BIBLIOGRAPHIE

Abesha, E., Caetano-Anollés, G., Høiland, K., 2003. Population genetics and spatial structure of the fairy ring fungus *Marasmius oreades* in a Norwegian sand dune ecosystem. Mycologia 95, 1021-1031.

Agerer, R., 1987-96. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Schwäbisch Gmünd.

Alphei, J., 1998. Differences in soil nematode community structure of beech forests: comparison between a mull and a moder soil. Applied Soil Ecology 9, 9-15.

Annibale, D.A., Celletti, D., Felici, M., Di Mattia, E., Giovannozzi, S.G., 1996. Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes.* Acta Biotechnologica 16, 257-270.

Aramayo, R., Timberlake, W.E., 1990. Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (laccaseI) gene. Nucleic Acids Research 18, 3415.

Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G., Reid, I.D., 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor.* Journal of Biotechnology 53, 215-236.

Arora, D.S., Sandhu, D.K., 1984. Laccase EC 1.10.3.2 production and wood degradation by *Trametes hirsuta.* Folia Microbiologica 29, 310-315.

Asiegbu, F.O., Abu, S., Stenlid, J., Johansson, M., 2004. Sequence polymorphism and molecular characterization of laccase genes of the conifer pathogen *Heterobasidion annosum*. Mycological Research 108, 136-148.

Baar, J., Horton, T.R., Kretzer, A.M., Bruns, T.D., 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand replacing wildfire. New Phytologist 143, 409-418.

Bao, W., O'Malley, D.M., Whetten, R., Sederoff, R.R., 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. Science 260, 672-674.

Batjes, N.H., 1996. Total carbon and nitrogen in the soils of the world. European Journal of Soil Science 47,151-163.

Bekker, E.G., Petrova, S.D., Ermolova, O.V., Elisashvili, V.I., Sinitsyn, A.P., 1990. Extraction purification and some properties of laccase from *Cerrena unicolor.* Biokhimiya 55, 2019-2024.

Belong, M., Harper, J.L., Townsend, C.R., 1996. Ecology (3rdEd). Blackwell Science, Malden, Oxford, Melbourne, Berlin, Turin, 1068 pp.

Bending, G.D., Read, D.J., 1996. Nitrogen mobilisation from protein-polyphenol complex by ericoid and ectomycorrhizal fungi. Soil Biology & Biochemistry 28, 1603-1612.

Bending, G.D., Read, D.J., 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. Mycological Reseach 101, 1348-1354.

Bergemann, S.E., Miller, S.L., 2002. Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. New Phytologist 156, 313-320.

Bertrand, G., 1896. Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 123, 463-465.

Bidartondo M., Kretzer, A.M., Bruns, T.D., 2000. High root concentration and uneven ectomycorrhizal diversity near *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae): a cheater that stimulates its victims? American Journal of Botany 87, 1783-1788.

Binz, T., Canevascini, G., 1997. Purification and partial characterization of the extracellular laccase from *Ophiostoma novo ulmi.* Current Microbiology 35, 278-281.

Bligny, R., Douce, R., 1983. Excretion of laccase by sycamore *Acer pseudoplatanus* cells purification and properties of the enzyme. Biochemical Journal 209, 489-496.

Bohlen, P.J., Edwards, C.A., Zhang, Q., Parmelee, R.W., Allen, M., 2002. Indirect effects of earthworms on microbial assimilation of labile carbon. Applied Soil Ecology 20, 225-261.

Bonnen, A.M., Anton, L.H., Orth, A.B., 1994. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus.* Applied and Environmental Microbiology 60, 960-965.

Bonkowski, M., Cheng, W., Griffiths, B.S., Alphei, J., Scheu, S., 2000. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. European Journal of Soil Biology 36, 135-147.

Bourdonnais, R., Leech, D., Paice, M.G., 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. Biochimica et Biophysica Acta 1379, 381-390.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Applied and Environmental Microbiology 61, 1876-1880.

Brundrett, M.C., 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist 154, 275-304.

Brundrett, M.C., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N., 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. The Australian Centre for International Agricultural Research, 653 pp.

Bruns, T.D., 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 170, 63-73.

Brussaard, L., 1998. Soil fauna, guilds, functional groups and ecosystem processes. Applied Soil Ecology 9, 123-135.

Buchan, A., Neidle, E.L., Moran, M.A., 2001. Diversity of the ring-cleaving dioxygenase gene *pcaH* in a salt marsh bacterial community. Applied and Environmental Microbiology 67, 2801-2809.

Bürgmann, H., Widmer, F., Sigler, W.V., Zeyer, J., 2003. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. Applied and Environmental Microbiology 69, 1928-1935.

Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset, J.Y., Gardes, M., Nehls, U., Hampp, R., 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 24, 601-614.

Canadell, J., Jackson, R.B., Ehleringer, J.R., Mooney, H.A., Sala, O.E., Schulze, E.D., 1996. Maximum rooting depth of vegetation types at global scale. Oecologia 108, 583-595.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. The Fungi (2nd Ed). Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, 588 pp.

Cassland, P., Jönsson, L.J., 1999. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. Applied Microbiology and Biotechnology 52, 393-400.

Chakraborty, T.K., Das, N., Sengupta, S., Mukherjee, M., 2000. Accumulation of a natural substrate of laccase in gills of *Pleurotus florida* during sporulation. Current Microbiology 41, 167-171.

Chaussod, R., 1996. La qualité biologique des sols: évaluation et implications. Forum « le sol, un patrimoine menacé », n° spéc. 3,4, Etudes et Gestion des Sols, Paris, pp. 261-278.

Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. Applied and Environmental Microbiology 64, 3175-3179.

Chen, D.M., Bastias, B.A., Taylor, A.F.S., Cairney, J.W.G., 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. New Phytologist 157, 547-554.

Choi, G.H., Larson, T.G., Nuss, D.L., 1992. Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. Molecular Plant Microbe Interactions 5, 119-128.

Claus, H., Filip, Z., 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. Microbiological Research 152, 209-216.

Coll, P.M., Fernandez, A.M., Villaneuva, J.R., Santamaria, R., Perez, P., 1993a. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). Applied and Environmental Microbiology 59, 2607-2613.

Coll, P.M., Tabernero, C., Santamaria, R., Perez, P., 1993b. Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycete PM1 (CECT 2971). Applied and Environmental Microbiology 59, 4129-4135.

Collins, P.J., Dobson, A.D.W., 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology 63, 3444-3450.

Coûteaux, M.M., Darbyshire, J.F., 1998. Functional diversity amongst soil protozoa. Applied Soil Ecology 10, 229-237.

Criquet, S., Farnet, A.M., Tagger, S., Le Petit, J., 2000. Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: influence of certain biotic and abiotic factors. Soil Biology & Biochemistry 32, 1505-1513.

Criquet, S., Tagger, S., Vogt, G., Iacazio, G., Le Petit, J., 1999. Laccase activity of forest litter. Soil Biology & Biochemistry 31, 1239-1244.

Curir, P., Thurston, C.F., D'Aquila, F., Pasini, C., Marchesini, A., 1997. Characterization of a laccase secreted by *Armillaria mellea* pathogenic for *Genista*. Plant Physiology and Biochemistry 35, 147-153.

Dahlberg, A., 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. New Phytologist 150, 555-562.

Dahlberg, A., Jonsson, L., Nylund, J.E., 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. Canadian Journal of Botany 75, 1323-1335.

Dahlberg, A., Stenlid, J., 1994. Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L., Fr.) Roussel revealed by somatic incompatibility. New Phytologist 128, 225-234.

Dahlberg, A., Stenlid, J., 1995. Spatiotemporal patterns in ectomycorhizal fungi. Canadian Journal of Botany 73, 1222-1230.

Dakora, F.D., Phillips, D.A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and Soil 245, 35-47.

Das, N., Chakraborty T.K., Mukherjee, M., 2001. Purification and characterization of a growth-regulating laccase from *Pleurotus florida*. Journal of Basic Microbiology 41, 261-267.

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

Das, N., Sengupta, S., Mukherjee, M., 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. Applied and Environmental Microbiology 63, 4120-4122.

Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Iacazio, G., Gil, G., Le Petit, J., 2000. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. Applied and Environmental Microbiology 66, 925-929.

Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T., 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytologist 156, 527-537.

Drever, J.L., 1994. The effect of land plants on weathering rates of silicate minerals. Geochimica et Cosmochimica Acta 58, 2325-2332.

D'Souza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A., 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. Applied and Environmental Microbiology 62, 3739-3744.

Duchaufour, P., 2001. Introduction à la science du sol - Sol, végétation, environnement -Abrégé de pédologie. (6th Ed.). Dunod, Paris, 331 pp.

Dugassa, G.D., von Alten, A., Schonbeck, F., 1996. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. Plant and Soil 185, 173-182.

Edens, W.A., Goins, T.Q., Dooley, D., Henson, J.M., 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Applied and Environmental Microbiology 65, 3071-3074.

Edsberg, E., 2000. The quantitative influence of enchytraeids (Oligochaeta) and microarthropods on decomposition of coniferous raw humus in microcosms. Pedologia 44, 132-147.

Eggert, C., Lafayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.E.L., Dean, J.F.D., 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied and Environmental Microbiology 64, 1766-1772.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L., 1995. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. FEBS Letters 376, 202-206.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L., 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Letters 391, 144-148.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L., 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology 62, 1151-1158.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L., 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. FEBS Letters 407, 89-92.

Ejechi, B.O., Obuekwe, C.O., Ogbimi, A.O., 1996. Microchemical studies of wood degradation by brown rot and white rot fungi in two tropical timbers. International Biodeterioration and Biodegradation 38, 119-122.

Fernández-Larrea, J., Stahl, U., 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from Podospora anserine. Molecular and General Genetics 252, 539-551.

Fiore-Donno, A.M., Martin, F., 2001. Genetic structure of populations of the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron* and *Xerocomus pruinatus* in an old mixed forest. New Phytologist 152, 533-542.

Francis, C.A., O'Mullan, G.D., Ward, B.B., 2003. Diversity of ammonia monooxygenase (*amoA*) genes across environmental gradients in Chesapeake Bay sediments. Geobiology 1, 129-140.

Frankland, J.C., 1998. Fungal succession – unravelling unpredictable. Mycological Research 102, 1-15.

Fukushima, Y., Kirk, T.K., 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. Applied and Environmental Microbiology 61, 872-876.

Gardes, M., Bruns, T.D., 1996a. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. Canadian Journal of Botany 74, 1572-1583.

Gardes, M., Bruns, T.D., 1996b. ITS-RFLP matching for identification of fungi. Methods in Molecular Biology 50, 177-186.

Garzillo, A.M.V., Colao, M.C., Caruso, C., Caporale, C., Cellette, D., Buonocore, V., 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii.* Applied Microbiology and Biotechnology 49, 545-551.

Gebauer, G., Taylor, A.F.S., 1999. ^{15}N natural abundance in fruit bodies of different functional groups of fungi in relation to substrate utilization. New Phytologist 142, 93-101.

Gehring, C.A., Theimer, T.C., Whitham, T.G., Keim, P., 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. Ecology 79, 1562-1572.

Germann, U.A., Müller, G., Hunziker, P.E., Lerch, K., 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Journal of Biology and Biochemistry 263, 885-896.

Gianinazzi-Pearson, V., 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. Plant Cell 8, 1871-1883.

Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G., Sannia, G., 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus.* Applied and Environmental Microbiology 341, 655-663.

Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., Sannia, G., 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus.* Biochemical Journal 341, 655-663.

Gill, R.A., Jackson, R.B., 2000. Global pattern of root turnover for terrestrial ecosystems. New Phytologist 147, 13-31.

Gisi, U., Schenker, R., Schulin, R., Stadelmann, F.X., Sticher, H., 1997. Bodenökologie (2ndEd). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 235 pp.

Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M., Bally, R., 1993. Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from the rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiology Letters 108, 205-210.

Gramss, G., Guenther, T., Fritsche, W., 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. Mycological Research. 102, 67-72.

Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants, the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Applied Soil Ecology 5, 29-56.

Grime, J.P., 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. American Naturalist 111, 1169-1194.

Guidot, A., Debaud, J.C., Marmeisse, R., 2001. Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. Molecular Ecology 10, 1121-1131.

Guidot, A., Debaud, J.C., Marmeisse, R., 2002. Spatial distribution of the below-ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. FEMS Microbiology Ecology 42, 477-486.

Guidot, A., Debaud, J.C., Effosse, A., Marmeisse, R., 2003. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. New Phytologist 161, 539-547.

Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinen, J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. Nature Structural Biology 9, 601-605.

Hättenschwiler, S., Vitousek, M., 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. Trends in Ecology & Evolution 15, 238-243.

Harrison, M.J., 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. Trends in Plant Science 2, 54-60.

Hibbett, D.S., Gilbert, L.B., Donoghue, M.J., 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. Nature 407, 506-508.

Hintikka, V., 1993. Occurrence of edible fungi and other macromycetes on tree stumps over a sixteen-year period. Actua Botanica Fennica 149, 11-17.

Hobbie, E.A., Weber, N.S., Trappe, J.M., 2001. Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. New Phytologist 150, 601-610.

Hoegger, P.J., Navarro-González, M., Kilaru, S., Hoffmann, M., Westbrook, E.D., Kües, U., 2004. The laccase gene family in *Coprinus cinerea* (*Coprinus cinereus*). Current Genetics 45, 9-18.

Holben, W.H., Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M., 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial diversity. Journal of Bacteriology 180, 4765-4774.

Holtze, M.S., Ekelund, F., Rasmussen, L.D., Jacobsen, C.S., Johnsen, K., 2003. Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa: differential effects of mercury. Soil Biology & Biochemistry 35, 1175-1181.

Horton, T.R., Bruns, T.D., 1998. Multiple host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) and bishop pine (*Pinus muricata* D.Don). New Phytologist 139, 331-339.

Horton, T.R., Bruns, T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. Molecular Ecology 10, 1855-1871.

Horton, T.R., Bruns, T.D., Parker, V.T., 1999. Ectomycorrhizal fungi associated with Arctostaphylos contribute to *Pseudostuga menziesii* establishment. Canadian Journal of Botany 77, 93-102.

Hurt, R.A., Qiu, X.Y., Wu, L.Y., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiegje, J.M., Zhou, J.H., 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. Applied and Environmental Microbiology 67, 4495-4503.

Hutchison, L.J., 1990. Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. Canadian Journal of Botany 68, 1522-1530.

Jackson, R.B., Canadell, J., Ehleringer, J.R., Mooney, H.A., Sala, O.E., Schulze, E.D., 1996. A global analysis of root distributions for terrestrial biomes. Oecologia 108, 389-411.

Janse, B.J.H., 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.

Jany, J.L., 2002. Le champignon ectomycorhizien *Cenococcum geophilum* Fr. dans les hêtraies lorraines : structure génétique des populations et rôle dans la résistance à la sécheresse des racines superficielles du hêtre. Thèse de l'université Henri Poincaré, Nancy I.

Jany, J.L., Garbaye, J., Martin F., 2002. *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. New Phytologist 154, 651-659.

Johannes, C., Majcherczyk, A., 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Applied and Environmental Microbiology 66, 524-528.

Jones, D.L., Darrah, P.R., 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant and Soil 166, 247-257.

Jongmans, A.G., van Breemen, N., Lundström, U.S., van Hees, P.A.W., Finlay, R.D., Srinivasan, M., Unestam, T., Giesler, R., Melkerud., P.A., Olsson, M., 1997. Rock-eating fungi. Nature 389, 682-683.

Jonsson, L., Dahlberg, A., Brandrud, T.E., 2000. Spatiotemporal distribution of an ectomycorrhizal community in an oligotrophic Swedish *Picea abies* forest subjected to experimental nitrogen addition: above- and below-ground views. Forest Ecology and Management 132, 143-156.

Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Kårén, O., Zackrisson, O., 1999a. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. New Phytologist 142, 151-162.

Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Zackrisson, O., Kårén, O., 1999b. Ectomycorrhizal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. Molecular Ecology 8, 205-215.

Jung, H., Xu, F., Li, K., 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. Enzyme and Microbial Technology 30, 161-168.

Kaiser, K., Eusterhues, K., Rumpel, C., Guggenberger, G., Kögel-Knabner, I., 2002. Stabilization of organic matter by soil minerals – investigations of density and particle-size fractions from two acid forest soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 165, 451-459.

Kaiser, K., Zech, W., 2000. Dissolved organic matter sorption by mineral constituents of subsoil clay fractions. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163, 531-535.

Kanunfre, C.C., Zancan, G.T., 1998. Physiology of exolaccase production by *Thelephora terrestris*. FEMS Microbiology Letters 161, 151-156.

Karahanian, E., Corsini, G., Lobos, S., Vicuna, R., 1998. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Biochimica et Biophysica Acta 1443, 65-74.

Kårén, O., Nylund, J.E., 1997. Effects of ammonium sulphate on the community structure and biomass of ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce stand in southwestern Sweden. Canadian Journal of Botany 75, 1628-1642.

Killham, K., 1994. Soil ecology. Cambridge University Press, 260 pp.

Kjøller, A.H., Struwe, S., 2002. Fungal communities, succession, enzymes, and decomposition. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), Enzymes in the environment – Activity, ecology and applications. Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 267-284.

Ko, E.M., Leem, Y.E., Choi, H.T., 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum.* Applied Microbiology and Biotechnology 57, 98-102.

Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. Soil Biology & Biochemistry 34, 139-162.

Kojima, Y., Tsukuda, T., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sugiura, J., Sakaino, M., Kita, Y., 1990. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. Journal of biology and Chemistry 265, 15224-15230.

Koroleva, O.V., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P., Biniukov, V.I., Jaropolov, A.I., Varfolomeyev, S.D., Scheller, F., Makower, A., Otto, A., 1999. Laccase of *Coriolus zonatus*: Isolation, purification, and some physicochemical properties. Applied Biochemistry and Biotechnology 76, 115-127.

Koroleva, O.V., Yavmetdinov, I.S., Shleev, S.V., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P., 2001. Isolation and study of some properties of laccase from the basidiomycetes *Cerrena maxima* Biochemistry 66, 618-622.

Kottke, I., Oberwinkler, F., 1986. Mycorrhiza of forest trees – structure and fonction. Trees 1, 1-24.

Kuzyakov, Y., Domanski, G., 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163, 421-431.

Laborde, J., 1896. Sur la casse des vins. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 123, 1074-1075.

Lafayette, P.R., Eriksson, K.E.L., Dean, J.F.D., 1999. Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). Plant Molecular Biology 40, 23-35.

Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., van Breemen, N., 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. Trends in Ecology & Evolution 16, 248-254.

Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T.W., Hoffland, E., Rosling, A., Wernars, K., Smit, E., 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Applied and Environmental Microbiology 69, 327–333.

Lepage, B.A., Currah, R.S., Stockey, R.A., Rothwell, G.W., 1997. Fossil ectomycorrhizae from middle Eocene. American Journal of Botany 84, 410-412.

Lilleskov, E.A., Bruns, T.D., 2001. Nitrogen and ectomycorrhizal fungal communities: what we know, what we need to know. New Phytologist 149, 154-158.

Litvintseva, A.P., Henson, J.M., 2002. Characterization of two genes of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* and their differential transcription in melanin mutants and wild type. Mycological Research 106, 808-814.

Liu, L., Tewari, R.P., Williamson, P.R., 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. Infection and Immunity 67, 6034-6039.

Long, S.R., 1996. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. Plant Cell 8, 1885-1898.

Lord, N.S., Kaplan, C.W., Shank, P., Kitts, C.L., Elrod, S.L., 2002. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. FEMS Microbiology Ecology 42, 327–337.

Luoma, D.L., Eberhart, J.L., Amaranthus, M.P., 1997. Biodiversity of ectomycorrhizal types from southwest Oregon. In: Kaye, T.N., Liston, A., Love, R.M., Luoma, D.L., Meinke, R.J., Wilson, M.V. (Eds.), Conservation and Management of

Native Plants and Fungi. Corvallis, Native Plant Society of Oregon, Oregon, pp. 249-253.

Lyons, J.I., Newell, S.Y., Buchan, A., Moran, M.A., 2003. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a Southeastern US salt marsh. Microbial ecology 45, 270-281.

Majcherczyk, A., Johannes, C., Huettermann, A., 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor.* Enzyme and Microbial Technology 22, 335-341.

Malmström, B.G., 1997. Early and more recent history in the research on multi-copper oxidases. In: Messerschmidt, A. (Eds.), Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong-Kong, pp. 1-22.

Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J.B., Brizuela, M.A., González, A.E., 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology 63, 2637–2646.

Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. (2nd Ed.). Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 889 pp.

Martin, F., 2001. Frontiers in molecular mycorrhizal research – genes, loci, dots and spins. New Phytologist 150, 499-507.

Martins, A., Santos, M., Santos, H., Pais, M.S., 1999. A ^{31}P nuclear magnetic resonance study of phosphate levels in roots of ectomycorrhizal and non-ectomycorrhizal plants of Castenea sativa. Trees 13, 168-172.

Massicote, H.B., Peterson, R.L., Ackerley C.A., Melville, L.H., 1990. Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. Canadian Journal of Botany 68, 579-593.

McDowell, W.H., 2003. Dissolved organic matter in soils – future directions and unanswered questions. Geoderma 113, 179-186.

Mehmann, B., Egli, S., Braus, G.H., Brunner, I., 1995. Coincidence between molecular or morphologically classified ectomycorrhizal morphotypes and fruitbodies in a spruce forest. In: Stocchi, V., Bonfante, P., Nuti, M. (Eds.), Molecular Approaches. Plenum Press, New York, pp. 41-52.

Mendum, T.A., Sockett, R.E., Hirsch, P.R., 1998. The detection of gram-negative bacterial mRNA from soil by RT-PCR. FEMS Microbiology Letters 164, 369-373.

Min, K.L., Kim, Y.H., Kim, Y.W., Jung, H.S., Hah, Y.C., 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis.* Archives of Biochemistry and Biophysics. 392, 279-286.

Molina R., Massicotte, H., Trappe, J.M., 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and pratical implications. In: Allen, M.F. (Ed.) Mycorrhizal functioning. New York, USA. Chapman & Hall, pp. 357-423.

Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. Applied and Environmental Microbiology 63, 2166-2174.

Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T., 1995. Symbiotic nitrogen fixation. Plant Cell 7, 869-885.

Näsholm, T., Ekblak, A., Nordin, A., Giester, R., Högberg, M., Högberg, P., 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. Nature 392, 914-916.

Nylund, J.E., Dahlberg, A., Högberg, N., Kårén, O., Grip, K., Jonsson, L., 1995. Methods for studing species composition of mycorrhizal fungal communities in

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

ecological studies and environmental monitoring. In: Stocchi, V., Bonfante, P., Nuti, M. (Eds.), Molecular Approaches. Plenum Press, New York, pp. 229-239.

Ohkuma, M., Noda, S., Kudo, T., 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. Applied and Environmental Microbiology 65, 4926-4934.

Peláez, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. Mycological Research 99, 37-42.

Pérez, J., Martínez, J., De La Rubia, T., 1996. Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. Applied and Environmental Microbiology 62, 4263-4267.

Perie, F.H., Reddy, G.V.B., Blackburn, N.J., Gold, M.H., 1998. Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. Archives of Biochemistry and Biophysics 353, 349-355.

Perry, C.R., Matcham, S.E., Wood, D.A., Thurston, C.F., 1993a. The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Journal of General Microbiology 139, 171-178.

Perry, C.R., Smith, M., Britnell, C.H., Wood, D.A., Thurston, C.F., 1993b. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Journal of General Microbiology 139, 1209-1218.

Peter, M., Ayer, F., Egli, S., 2001. Nitrogen addition in Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition measured by PCR-RFLP analysis of the ribosomal ITS-region. New Phytologist 149, 311-324.

Peterson, R.L., Bonfante, P., 1994. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. Plant and Soil 159, 79-88.

Poly, F., Monrozier, L.J., Bally, R., 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. Research Microbiology 152, 95-103.

Ponge, J.F., 2003. Humus forms in terrestrial ecosystems: a framework to biodiversity. Soil Biology & Biochemistry 35, 935-945.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. Microbiologie (2e édition française). de boeck, Bruxelles, Belgique, 1137 pp.

Preston, C.M., 1992. The application of NMR to organic matter inputs and processes in forest ecosystems of the Pacific northwest. The Science of the Total Environment 113, 107-120.

Pritsch, K., Boyle, H., Munch, J.C., Buscot, F., 1997. Characterization and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR-RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). New Phytologist 137, 357-369.

Prospero, S., Rigling, D., Holdenrieder, O., 2003. Population structure of *Armillaria* species in managed Norway spruce stands in the Alps. New Phytologist 158, 365-373.

Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., Murrell, J.C., 2000. Stable- isotope probing as tool in microbial ecology. Nature 403, 646-649.

Radajewski, S., McDonald, I.R., Murrell, J.C., 2003. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. Current Opinion in Biotechnology 14, 296-302.

Read, D.J., Perez-Moreno, J., 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytologist 157, 475-492.

Redecker, D., Szaro, T.M., Bowman, R.J., Bruns, T.D., 2001. Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor*, and *Amanita francheti* in late stage ectomycorrhizal successions. Molecular Ecology 10, 1025-1034.

Rennert, T., Mansfeldt, T., 2003. Adsorption of "real" dissolved organic matter on the clay and fine silt fractions of a forested Stagnic Gleysol. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 166, 204-209.

Renvall, P., 1995. Community structure and dynamics of wood-rotting basidiomycetes on decomposing conifer trunks in northern Finland. Karstenia 35, 1-51.

Richardson, A., Duncan, J., McDougall, G.J., 2000. Oxidase activity in lignifying xylem of a taxonomically diverse range of trees: Identification of a conifer laccase. Tree Physiology 20, 1039-1047.

Rigling, D., Van Alfen, N.K., 1993. Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* Applied and Environmental Microbiology 59, 3634-3639.

Rillig, C.M., Wright, S.F., Eviner, V.T., 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. Plant and Soil 238, 325-333.

Roland, J.C., Roland, F., 2003. Biologie végétale 2. Organisation des plantes à fleurs (8th Ed.). Dunod, Paris, 156 pp.

Rosenbrock, P., Buscot, F., Munch, J.C., 1995. Fungal succession and changes in the fungal degradation potential during the initial stage of litter decomposition in a black alder forest (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn). European Journal of Soil Biology 31,1-11.

Rousseau, J.D.V., Sylvia, D.M., Fox, A.J., 1994. Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. New Phytologist 128, 639-644.

Salas, S.D., Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., Williamson, P.R., 1996. Effect of the laccase gene, *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Experimental Medecine 184, 377-386.

Sanchez-Amat, A., Lucas, E.P., Fernandez, E., Garcia, B.J.C., Solano, F., 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea.* Biochimica et Biophysica Acta 1547, 104-116.

Saparrat, M.C.N., Guillén, F., Arambarri, A.M., Martinez, A.T., Martinez, M.J., 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Applied and Environmental Microbiology 68, 1534-1540.

Sariyildiz, T., Anderson, J.M., 2003. Interactions between litter quality, decomposition and soil fertility: a laboratory study. Soil Biology & Biochemistry 35, 391-399.

Sawyer, N.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G., 1999. Molecular investigation of genet distribution and genetic variation of *Cortinarius rotundisporus* in eastern Australian sclerophyll forests. New Phytologist 142, 561-568.

Scherer, M., Fischer, R., 2001. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans.* FEMS Microbiology Letters 199, 207-213.

Schlosser, D., Grey, R., Fritsche, W., 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. Applied Microbiology and Biotechnology 47, 412-418.

Schmidt, L., Warnstorff, K., Dörfel, H., Leinweber, P., Lange, H., Merbarch, W., 2000. The influence of fertilization and rotation on soil organic matter and plant yields in the long-term Eternal Rye trial in Halle (Saale), Germany. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163, 639-648.

Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F.L., van der Kaaij, R.M., van Kan, J.A.L., 2002. Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. Molecular Microbiology 43, 883-894.

Selosse, M.A., 1998. Etude de populations de champignons basidiomycètes ectomycorhiziens du genre *Laccaria*, introduits ou spontanés sous Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Thèse de l'université Paris XI, Orsay.

Selosse, M.A., Le Tacon, F., 1999. Les champignons dopent la forêt. La Recherche 319, 33-35.

Sethuraman, A., Akin, D.E., Eriksson, K.E.L., 1998. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* Biotechnology and Applied Biochemistry 27, 37-47.

Shin, K.S., Lee, Y.J., 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. Archives of Biochemistry and Biophysics 394, 109-115.

Sinsabaugh, R.L., Carreiro M.M., Alvarez, S., 2002. Enzymes and microbial dynamics of litter decomposition. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), Enzymes in the environment – Activity, ecology and applications. Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 249-265.

Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A., Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. Plant and Soil 241, 155-176.

Slomczynski, D., Nakas, J.P., Tanenbaum, S.W., 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. Applied and Environmental Microbiology 61, 907-912.

Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Dirk van Elsas, J., Wernars, K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified

genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 65, 2614-2621.

Smith, J.E., Molina., R., Huso, M.M.P., Larsen, M.J., 2000. Occurrence of *Piloderma fallax* in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade range of Oregon, U.S.A. Canadian Journal of Botany 78, 995-1001.

Smith, M., Thurston, C.F., 1997. Fungal laccases: role in delignification and possible industrial applications. In: Messerschmidt, A. (Eds.), Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong-Kong, pp. 201-224.

Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis (2nd Ed). Academic Press, San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 605 pp.

Srinivasan, C., D' Souza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A., 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Applied and Environmental Microbiology 61, 4274-4277.

Stendell., E.R., Horton, T.R., Bruns, T.D., 1999. Early effects of prescribed fire on the structure of the ectomycorrhizal fungus community in a Sierra Nevada ponderosa pine forest. Mycological Research 103, 1353-1359.

Stenström, E., Damm, E., Unestam, T., 1997. Le rôle des ectomycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol. Revue Forestière Française XLIX (n°spécial. 1997), 121-128.

Sylvia, D.M., Sinclair, W.A., 1983. Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and on Douglas fir seedlings. Phytopathology 73, 384-389.

Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E.M., Francis, C.A., Ward, B.B., 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. Applied and Environmental Microbiology 69, 1159-1171.

Tate III, 2002. Microbiology and enzymology of carbon and nitrogen cycling. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), Enzymes in the environment – Activity, ecology and applications. Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 267-284.

Taylor, D.L., Bruns, T.D., 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. Molecular Ecology 8, 1837-1850.

Taylor, A.F.S., Fransson, P.M., Högberg, P., Högberg, M.N., Plamboeck, A.H., 2003. Species level patterns in ^{13}C and ^{15}N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. New Phytologist 159, 757-774.

Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N., Larsoon, K.H., 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. New Phytologist 159, 153-165.

Thorn, G., 1997. The fungi in soil. In: van Elsaß, J.D., Trevors, J. T., Wellington, E.M.H. (Eds.), Modern soil microbiology. Marcel Dekker, New York, pp. 63-128.

Thorn, R.G., Reddy, C.A., Harris, D., Paul, E.A., 1996. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. Applied and Environmental Microbiology 62, 4288-4292.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140, 19-26.

Tiunov, A.V., Scheu, S., 1999. Microbial respiration, biomass, biovolume and nutriment status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae). Soil biology & biochemistry 31, 2039-2048.

Tiunov, A.V., Scheu, S., 2000. Microbial biomass, biovolume. biovolume and respiration in *Lumbricus terrestris* cast material of different age. Soil biology & biochemistry 32, 265-275.

Vainio, E.J., Hantula, J., 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Mycological Research 104, 927-936.

van Breemen, N., Lundström, U.S., Jongmans, A.G., 2000. Do plants drive podzolization via rock-eating mycorrhizal fungi? Geoderma 94, 163-171.

Vares, T., Kalsi, M., Hatakka, A., 1995. Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. Applied and Environmental Microbiology 61, 3315-3520.

Venter, C.J., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., Smith, H.O., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science 304, 66-74.

Verschoor, B.C., 2002. Carbon and nitrogen budgets of plant-feeding nematodes in grasslands of different productivity. Applied Soil Ecology 20,15-25.

Vogt, K.A., Grier, C.C., Vogt, D.D., 1986. Production, turnover, and nutrition dynamics of above- and belowground detritus of world forests. Advances in Ecological Research 15, 303-377.

Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., Schneider, P., 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Current Genetics 29, 395-403.

Waid, J.S., 1984. Biological and biochemical analysis of soils. Plant and Soil 76, 127-137.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand,

D.H., Sninsky, J.J., White, T.D. (Eds.), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, London, pp. 315-322.

Williamson, P.R., 1994. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. Journal of Bacteriology 176, 656-664.

Wintzingerode, F.V., Gohel, U.B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Review 21, 213-229.

Wu, B., Nara, K., Hogetsu, T., 1999. Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. Mycorrhiza 9, 151-159.

Yaver, D.S., Del, C.O.M., Xu, F., Nelson, B.A., Brown, K.M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, S.H., Kauppinen, S., 1999. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase *Lcc1*. Applied and Environmental Microbiology 65, 4943-4948.

Yaver, D.S., Golightly, E.J., 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic organization of the laccase gene family. Gene 181, 95-102.

Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., Dalboge, H., 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Applied and Environmental Microbiology 62, 834-841.

Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (*Urusbi*) part 1., Journal of Chemistry Society 43, 472-486.

Youn, H.D., Hah, Y.C., Kang, S.O., 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. FEMS Microbiology Letters 132, 183-188.

Zavarzina, A.G., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Trofimov, S.Y., 2004. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study. Soil Biology & Biochemistry 36, 359-369.

Zeller, B., Colin-Belgrand, M., Dambrine, E., Martin, F., 2001. Fate of nitrogen released from ^{15}N labeled litter in European beech forests. Tree Physiology 21, 153-162.

Zhao, J., Kwan, H.S., 1999. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. Applied and Environmental Microbiology 65, 4908-4913.

Zhou, Z., Hogetsu, T., 2002. Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocarps in a *Larix kaempferi* forest. New Phytologist 154, 529-539.

Zvyagintsev, D.G., 1994. Vertical distribution of microbial communities in soils (2nd Ed). In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. (Eds.), Beyond the biomass. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 29-37.

université HENRI POINCARÉ NANCY 1

Mademoiselle **LUIS Patricia**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1

en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°947

Nancy, le 07 juillet 2004

Le Président de l'Université

J.P. FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY I LE PRÉSIDENT

Université Henri Poincaré, Nancy I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY Cédex
Tél. : 03 83 68 20 00 - Fax : 03 83 68 21 00

Résumé

Les micro-organismes du sol participent au bon fonctionnement des cycles bio-géochimiques. Les laccases fongiques sont des enzymes sécrétées, à fort potentiel oxydatif, capables de promouvoir la décomposition et la condensation d'une très grande diversité de composés organiques. Elles devraient ainsi participer de façon majeure à la formation, la stabilisation et à la décomposition de la matière organique (MO) dans les sols. Nous avons donc développé des méthodes moléculaires, reposant sur la PCR, permettant d'étudier *in situ* les profils de distribution et d'expression de gènes laccasiques de Basidiomycètes dans les sols.

Trois types de sols (un sol agricole soumis à différents traitements fertilisants, un sol brun forestier et un podzol forestier) ont fait l'objet de cette étude sur la diversité des gènes laccasiques de Basidiomycètes. Pour tous les sols, nous avons mis en évidence un rapport positif entre la quantité de matière organique et la diversité en gènes présentes. Il apparaît également une nette relation entre la diversité de gènes laccasiques et l'activité enzymatique globale mesurée au sein des horizons. Ce résultat suggère qu'une forte diversité en gènes laccasiques soit la marque d'une large activité. Au niveau des deux sols forestiers, où il existe une nette stratification des horizons, une diminution progressive de la diversité des gènes laccasiques (donc des espèces) en fonction de la profondeur a été soulignée. Le sol brun présentant la plus grande diversité en gènes laccasiques (indices de diversité Shannon allant de 2.41 à 2.94 contre 0.67 à 1.56 pour le podzol et 2.09 à 2.77 pour les différents traitements agricoles) a fait l'objet d'une étude plus approfondie. Sur une parcelle de 100 m^2, le nombre total de gènes laccasiques détectés dans 13 échantillons de sol prélevés sur trois transects divergents a été de 167. Cependant, la diversité globale en gènes laccasiques de cette placette, détectable grâce notre approche PCR, a été estimée approcher les 300. Les pourcentages de dissimilarité en gènes sont élevés (67%) même pour des échantillons de sol adjacents (30 cm) et augmentent avec la distance topographique (94% au delà de 6 m). Plusieurs séquences ont pu être attribuées à des taxa ou à des groupes fonctionnels (saprophytes ou ectomycorhiziens). Les champignons saprophytes apparaissent être restreints aux premiers centimètres du sol. Les espèces ectomycorhiziens, bien que souvent détectées au niveau de tous les horizons, présentent une distribution préférentielle (horizon O_h, A_h ou B_v). Chaque échantillon de sol analysé apparaît renfermer de nombreuses espèces rares et peu d'espèces dominantes. La majorité (75%) de ces espèces dominantes, dont la présence fut détectée *via* leurs gènes laccasiques, sont des champignons ectomycorhiziens plus particulièrement des membres de la famille des Russulaceae. Ceux-ci sont agrégés en petits patchs (< 0.77 m^2).

L'étude de l'expression des gènes laccasiques par RT-PCR et PCR semi-quantitative a été réalisée sur l'horizon organique du sol brun forestier. Car celui-ci présente le potentiel d'expression le plus important par la richesse en substrat qu'il contient et par la diversité fongique qu'il y a été observée. Les résultats obtenus ont mis en évidence une expression différentielle selon que l'échantillon de sol était riche ou non en racines. Les échantillons présentant la plus forte densité racinaire arboraient la plus forte expression de gènes laccasiques. Il est important de noter que seulement 30% des gènes laccasiques détectés par amplification de l'ADN génomique sont exprimés.

Mots clés: Laccases, Basidiomycètes, diversité génétique et fonctionnelle, extraction d'ADN et d'ARN du sol, amorces dégénérées, RT-PCR, PCR semi-quantitative, hétérogénéité spatiale.