



Quantification de transcrits par RT-PCR in situ sur racines ligneuses : premiers résultats obtenus sur ectomycorhizes

Laurie Amenc, Claude Plassard

► To cite this version:

Laurie Amenc, Claude Plassard. Quantification de transcrits par RT-PCR in situ sur racines ligneuses : premiers résultats obtenus sur ectomycorhizes. 9. Journées scientifiques et techniques du réseau des microscopistes de l'INRA, Nov 2019, Nantes, France. 2019. hal-02735420

HAL Id: hal-02735420

<https://hal.inrae.fr/hal-02735420>

Submitted on 2 Jun 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

P2. Quantification de transcrits par RT-PCR *in situ* sur racines ligneuses : premiers résultats obtenus sur ectomycorhizes

Amenc L^{a*}, Plassard C^a

^a INRA, UMR EcoE@sols, 2 place Viala 34060 Montpellier cedex 2

* laurie.amenc@inra.fr

La RT PCR *in situ* est une technique robuste qui permet de quantifier l'expression de gènes dans des tissus complexes. Nous l'avons appliquée avec succès sur des coupes fines de nodosités pour suivre l'expression des différents gènes bactériens en fonction de différentes conditions environnementales appliquées à la plante [1][2]. Cette technique comprends les étapes (i) de fixation des organes frais, qui peuvent être ensuite déshydratés et conservés dans de la paraffine, (ii) de réalisation de coupes fines ou semi-fines, (iii) de retro-transcription des ARN messagers puis d'amplification des ADNc produits par PCR en présence de dUTP-digoxigénine, (iv) de couplage de la digoxigénine des transcrits à une phosphatase alcaline via des anticorps anti-digoxigénine spécifiques, et (v) de révélation de l'activité phosphatase avec un substrat fluorescent, l'ELF-97. La localisation et l'intensité de la fluorescence renseignent alors sur les cellules exprimant le gène étudié tout en quantifiant son niveau d'expression. Par rapport à l'hybridation *in situ*, les avantages de cette technique sont une plus forte sensibilité car les ARNm des gènes d'intérêt sont amplifiés et l'absence d'élément radioactifs. Malheureusement, elle est inopérante lorsque les tissus contiennent des composés phénoliques car ils vont inhiber le fonctionnement des deux enzymes utilisées, qui sont la Réverse Transcriptase (RT) et la Taq Polymérase. Dans ce poster, nous décrivons les premiers résultats que nous avons obtenus sur des coupes d'ectomycorhizes de Pin maritime associé au basidiomycète *Hebeloma cylindrosporum*. Parmi tous les composés testés pour lever l'inhibition des tanins et des polyphénols particulièrement actifs à haute température, l'apport de sérum albumine de bœuf nous a permis de révéler l'expression du gène de la tubuline de *H. cylindrosporum* et nous sommes en train de réaliser des RT-PCR *in situ* afin de localiser l'expression des trois gènes codant pour des transporteurs fongiques H⁺: phosphate (HcPT1.1, HcPT1.2, et HcPT2) identifiés dans le génome de ce champignon [3,4]. Dans une deuxième étape, nous tenterons de localiser les transcrits des autres gènes codant pour les transporteurs de P inorganique ou de P organique identifiés chez cette espèce fongique [5] afin de mieux comprendre leur rôle dans l'absorption de P inorganique du sol et le transport de P des cellules fongiques aux cellules de la plante-hôte au sein des ectomycorhizes.

[1] Bargaz A. *et al.* (2012). A phosphoenol pyruvate phosphatase transcript is induced in the root nodule cortex of *Phaseolus vulgaris* under conditions of phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 63 (13), 4723 - 4730. [2] Makoudi, B., et al. (2018). Phosphorus deficiency increases nodule phytase activity of faba bean–rhizobia symbiosis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40. [3] Tattray, M. V., et al. (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant Journal*, 57 (6), 1092-1102. [4] Becquer, A., et al. (2018). The *Hebeloma cylindrosporum* HcPT2 Pi transporter plays a key role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 220 (4), 1185-1199. [5] Plassard C, Becquer A, Garcia K. 2019. Phosphorus Transport in Mycorrhiza: How Far Are We? *Trends in Plant Science*. Vol. 24. 2019.