Etude des interactions entre métaux lourds et champignons ectomycorhiziens : mise en évidence de gènes impliqués dans la réponse au cadmium de "Paxillus involutus"

Christophe Jacob

▶ **To cite this version:**

Christophe Jacob. Etude des interactions entre métaux lourds et champignons ectomycorhiziens : mise en évidence de gènes impliqués dans la réponse au cadmium de "Paxillus involutus". Sciences du Vivant [q-bio]. Université Henri Poincaré (Nancy 1), 2001. Français. NNT : . tel-02830283

HAL Id: tel-02830283
https://hal.inrae.fr/tel-02830283

Submitted on 7 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.

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document numérisé 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 au même titre que sa version papier. 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.
La Bibliothèque a pris soin d'adresser un courrier à l'auteur dans lequel elle l'informe de la mise en ligne de son travail. Celui-ci peut en suspendre la diffusion en prenant contact avec notre service.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.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

Faculté des Sciences

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

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Biologie Forestière

par **Christophe JACOB**

Etude des interactions entre métaux lourds et champignons ectomycorhiziens: mise en évidence de gènes impliqués dans la réponse au cadmium de *Paxillus involutus*

Soutenance publique le 28 septembre 2001

Membres du jury:

Rapporteurs :	Myroslawa MIGNIAC-MASLOW	Directeur de Recherches, CNRS, Paris
	Michel TOLEDANO	Directeur de Recherches, CEA, Saclay
Examinateurs :	Bernard BOTTON	Professeur, Université H. Poincaré, Nancy I
	Michel CHALOT	MCF, Université H. Poincaré, Nancy I
	Michel DAUCA	Professeur, Université H. Poincaré, Nancy I
	Jean-Pierre JACQUOT	Professeur, Université H. Poincaré, Nancy I
	Francis MARTIN	Directeur de Recherches, INRA Nancy

U.M.R. Interactions Arbres/Micro-organismes
Faculté des Sciences - 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements

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

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Bernard Botton de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Je le remercie pour sa grande disponibilité. Je voudrais également remercier Michel Chalot pour la confiance et la très grande liberté de travail qu'il m'a accordé tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier Madame Miginiac-Maslow et Monsieur Toledano pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire et de m'avoir accordé quelques jours supplémentaires pour le leur envoyer. Je tiens aussi à remercier Messieurs Bernard Botton, Michel Chalot, Michel Dauca, Jean-Pierre Jacquot et Francis Martin pour avoir accepté de juger ce travail, pour leurs encouragements et leurs conseils. Merci Francis pour ta disponibilité et tes conseils dans la dernière ligne droite...semée d'embûches.

Je voudrais également remercier Annick Brun pour sa grande patience à l'épreuve de tous les étudiants, pour m'avoir supporté lors de mon arrivée au sein de l'équipe et pour ses nombreux conseils. Ensemble, nous avons fait en sorte que la "salle du fond" devienne la "salle B.M.".

De la science...

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler dans notre équipe: Nathalie, pour ta gentillesse et ta grande efficacité, Mikaël, même si ça n'a pas toujours été "rose", on a quand même réussi à faire de bonnes choses ensemble et la petite dernière, Mélanie, qui a une fâcheuse tendance à tout casser...Aux thésards disparus: merci Daniel pour ta sociabilité lors de mes premiers pas dans cette ville du "Nord", je ne saurais oublier Damien qui n'a jamais réussi à se débarrasser de moi sur un site pollué, malgré toute sa bonne volonté, et Agathe. A ceux qui restent encore un peu: a Blanca, le soleil de Mexico qui va devoir nous quitter, "sérénité, patience" qu'elle disait ! et il en aura fallu...Sans oublier Arnaud, le transporteur chantant du labo. Un grand merci à Régis pour les quelques analyses GC/MS qu'il a fait pour moi (c'est quoi déjà le nom barbare sorti de la machine ?) ainsi que pour les séances photos, et à Eliane pour les nombreux services rendus au labo et son écoute et sa compréhension en TP. Je tiens à remercier au sein de l'UMR-fac: Valérie, Joëlle, Elisabeth, Marie-France, Carole, Anne-Marie, Virginie, Sylvain, Eric, Jean-François, Nicolas, Mathieu et les autres, pour nos discussions, vos services et tout ce qui fait de 3 étages, un grand labo. Je pense également à l'autre partie de l'UMR cachée dans la forêt d'Amance: merci à Cathy pour toutes nos discussions et nos éclats de rires avec Dame Béatrice, merci à Christine et Annegret pour le séquençage des clones, merci Denis pour tes conseils, et enfin Sébastien pour tous les conseils, les discussions que nous avons pu avoir ces six derniers mois. Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'UMR pour leur grande amabilité.

Cependant, l'UMR n'est pas tout, je tiens à remercier les personnes du 2ème étage que j'ai pu côtoyer pendant ces années: merci à Nathalie Leblond et Annie Dary pour leur disponibilité,

54830 VILLERS-LES-NANCY

leurs conseils et la patience d'Annie pour la répartition des enseignements, merci à Brigitte pour tous tes conseils et services. Un grand merci à Yuri Motorin, Isabelle et Sandrine pour leur gentillesse et leur aide pour que ce manuscrit puisse être correctement imprimé.

Toutefois, c'est grâce aux connaissances, au goût pour la recherche en équipe et à tous les moments formidables (et moins formidables) que j'ai pu retenir de mon passage au sein du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'INRA de Bordeaux, lors de mon DEA, que j'ai eu envie de continuer en thèse. Comme je ne l'ai encore jamais fait, je tiens à remercier Joël et Sybille qui ont eu à me supporter pendant mon DEA dans leur équipe et qui m'ont appris des tonnes de choses, tous les thésards de l'époque (et oui! on a vieilli...): Agnès, Armelle, Cécile, Sandrine et les gars: Ricounet, Fafa, Loïck et Patoche; mais aussi Colette, Frédéric, Jeanne, Jean-Luc sans oublier toutes les personnes qui font la différence Chantal, Evelyne, Pierre, toutes les personnes aux petits soins des serres, et nos chefs, Monique Garnier et Monsieur Joseph Bové.

Mais pas seulement...

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Pierre Peycru pour la qualité de son enseignement et pour m'avoir encouragé dans cette voie.

Pour leur hospitalité lors de mes premiers jours à Nancy, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Christian Dournon, son épouse et Olivier. Merci à toute ma famille de Champagne et d'Aquitaine pour ses encouragements constants et son intérêt pour mes recherches. De mes années bordelaises, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi Marie-France, Etienne et Stéphane. Je ne saurai vous oublier, les 2A de ma famille nancéienne, pour votre patience et votre compréhension lors de mes sautes d'humeur de fin de rédaction, mais ça y est, c'est fini. Enfin, mais non des moindres, je tiens à exprimer toute mon affection et ma tendresse à mes parents qui m'ont accompagné durant ces années étudiantes, pour tous leurs sacrifices à mon égard, et leur compréhension...promis, l'été prochain, je viendrai à Belvès !

Abréviations

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AIA	acide indole acétique
AMP	adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
dNTP	désoxynucléoside 5' triphosphate
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
EELS	pour electron energy loss spectroscopy, spectroscopie par perte d'énergie des électrons
EST	pour expressed sequence tag, étiquette de gène exprimé
g	accélération de la pesanteur
kpb	kilopaires de bases
kDa	kilodalton
ORF	pour open reading frame, cadre ouvert de lecture
PCR	pour polymerase chain reaction, amplification enzymatique de l'ADN
ppm	partie par million, 1 pmm ≡ 1 mg/l
SDS	sodium dodécyl sulfate
UV	ultraviolet

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1

Sommaire

INTRODUCTION **1**

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE **4**

1.1. LES SYMBIOSES MYCORHIZIENNES 4

1.1.1. Les différents types d'associations mycorhiziennes *4*

1.1.2. Les avantages liés à l'association mycorhizienne *8*

1.2. LES MÉTAUX LOURDS 16

1.2.1 Généralités *16*

1.2.2. Toxicité des métaux lourds au niveau cellulaire *29*

1.2.3. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds *35*

1.2.4. Les mycorhizes et les métaux lourds *51*

1.3. LA GÉNOMIQUE 55

1.3.1. Avant-propos *55*

1.3.2. La génomique structurale: le séquençage à grande échelle *56*

1.3.3. La génomique fonctionnelle *57*

MATÉRIELS ET MÉTHODES **71**

2.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE 71

2.1.1. Les isolats fongiques *71*

*2.1.2. Les souches d'*Escherichia coli *72*

2.1.3. Les plasmides et bactériophages *73*

2.2. MÉTHODES 74

2.2.1. Analyse statistique des tests de tolérance *74*

2.2.2. Extraction des acides nucléiques *75*

2.2.3. Analyse des acides nucléiques par électrophorèse en gel d'agarose *77*

2.2.4. Transfert des acides nucléiques sur membrane et hybridations moléculaires *78*

2.2.5. Insertion d'ADN dans des vecteurs de clonage *80*

2.2.6. Transformation des bactéries *81*

2.2.7. Technique d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction) *83*

2.2.8. Séquençage des fragments d'ADN *84*

2.2.9. Hybridation soustractive et suppressive *87*

2.2.10. Analyse sur filtre d'ADNc de l'expression des gènes *89*

2.2.11. Construction et criblage d'une banque d'ADNc de P. involutus *93*

2.2.12. Technique d'amplification rapide des extrémités des ADNc ou RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends) *98*

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

2.2.13. Surexpression d'une superoxyde dismutase manganèse-dépendante.....100

*2.2.14. Complémentation fonctionnelle d'une souche SOD déficiente d'*E. coli *102*

2.2.15. Techniques d'analyse des protéines.....104

2.2.16. Transfert des protéines et détection immunologique.....111

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....114

3.1. ETUDE DE LA RÉPONSE DIFFÉRENTIELLE DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS AUX MÉTAUX LOURDS *IN VITRO*.....114

3.2. CLONAGE, CARACTÉRISATION ET RÉGULATION PAR LE CADMIUM D'UNE SUPEROXYDE DISMUTASE CHEZ LE CHAMPIGNON ECTOMYCORHIZIEN *P. INVOLUTUS*.....122

3.3. IDENTIFICATION DE GÈNES RÉGULÉS PAR LE CADMIUM CHEZ LE CHAMPIGNON ECTOMYCORHIZIEN *P. INVOLUTUS* EN COMBINANT L'HYBRIDATION SOUSTRATIVE ET SUPPRESSIVE ET L'HYBRIDATION DIFFÉRENTIELLE DE FILTRES D'ADNC.....134

DISCUSSION GÉNÉRALE 155

4.1. RÉPONSE DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS AUX MÉTAUX LOURDS *IN VITRO* 155

4.2. CARACTÉRISATION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE AU CADMIUM DU CHAMPIGNON ECTOMYCORHIZIEN *PAXILLUS INVOLUTUS* 156

4.2.1. Choix du modèle.....156

4.2.2. L'hybridation soustractive et suppressive.....156

4.2.3. Construction et analyse des filtres à moyenne densité en ADNc.....158

4.2.4. Isolement, caractérisation et étude de l'expression d'une superoxyde dismutase manganèse-dépendante chez le champignon ectomycorhizien Paxillus involutus *(Jacob* et al., *2001)* *161*

4.2.5. Isolement et caractérisation d'une lanostérol synthase.....161

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....164

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....167

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

Introduction

Dans la rhizosphère, qui renferme de nombreux et divers micro-organismes en compétition et en interaction entre eux et avec les racines des plantes, les champignons mycorhiziens sont quasi omniprésents. Dans nos forêts tempérées, les racines fines de la grande majorité des arbres sont presque entièrement mycorhizées. Les champignons mycorhiziens ont un rôle essentiel dans la nutrition des plantes auxquelles ils sont associés, notamment en raison de leur capacité à mobiliser des éléments nutritifs importants comme le phosphore et l'azote (Smith & Read, 1997). En conséquence, les champignons mycorhiziens peuvent conditionner la survie et la santé des plantes qui leur sont associées (Read, 1991).

Cependant, les conséquences de l'action de l'Homme sur les écosystèmes forestiers telles que les retombées acides ou les dépôts d'azote, l'augmentation du CO_2 atmosphérique, les contaminations par les métaux et/ou par des substances organiques, peuvent fortement influer sur la structure de la communauté mycorhizienne (Jentschke & Godbold, 2000).

Chez les plantes, la tolérance vis-à-vis des métaux a été étudiée en détail en termes de physiologie, écologie et évolution (Baker, 1987; Macnair, 1993; Meharg, 1994). En ce qui concerne les champignons ectomycorhiziens, les études ont porté sur la sensibilité des champignons aux concentrations toxiques en métaux, lorsqu'ils sont cultivés seuls ou en symbiose avec un partenaire végétal sur des substrats artificiels (Hartley *et al.*, 1997). Bien que les deux principales stratégies de tolérance reposent sur l'évitement et/ou la séquestration, les mécanismes de tolérance mis en jeu par les champignons mycorhiziens qui leurs confèrent, à eux et à leurs hôtes, une protection vis-à-vis des métaux lourds restent encore flous (Hartley *et al.*, 1997). D'autre part, les bases génétiques des mécanismes de tolérance des champignons mycorhiziens vis-à-vis des métaux ne sont pas encore élucidées, et leur connaissance permettrait de déterminer les mécanismes de tolérance susceptibles d'être impliqués.

Ce rôle bénéfique des champignons mycorhiziens dans la protection des plantes vis-à-vis des métaux lourds est à la base de l'un des principes de remédiation des sites pollués, la phytostabilisation. Le principe de cette méthode est de promouvoir la croissance de végétaux et la qualité des sols, de diminuer la biodisponibilité des métaux et les phénomènes d'érosion dûs au vent et à l'eau et enfin de réduire le lessivage des métaux. De nombreuses études ont montré que la mycorhization favorise la croissance des végétaux qui leur sont associés en présence de

concentrations critiques en métaux (Hartley *et al.*, 1997; Leyval *et al.*, 1997), cette association mutualiste pourrait donc être un bon moyen de revégétaliser des sites pollués non-réhabilités.

C'est dans ce contexte d'étude des interactions entre les champignons ectomycorhiziens et les métaux lourds que se situe mon travail de thèse. Il a été mené dans le cadre d'un projet européen (METOLEF), dont les principaux objectifs étaient:

- la récolte, l'identification et l'isolement de champignons ectomycorhiziens en vue d'étudier leur tolérance aux métaux lourds en conditions axéniques,
- la caractérisation des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la tolérance aux métaux lourds,
- le développement de couples arbres/champignons ectomycorhiziens en vue de re–végétaliser des sites pollués,
- l'étude au champ de l'efficacité de telles combinaisons arbres/champignons ectomycorhiziens,

Mes propres objectifs étaient:

- **l'isolement et l'identification de souches tolérantes aux métaux.** Des carpophores de champignons ectomycorhiziens ont été recoltés sur des sites non pollués et pollués, identifiés et isolés en culture pure. Leur tolérance vis-à-vis des métaux lourds tels que le cuivre, le cadmium, le nickel et le zinc a été déterminée en culture axénique. Les résultats de cette partie sont regroupés dans la publication n°1.
- **l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au cadmium chez le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus*.** Cette étude a débuté par l'utilisation de la technique d'hybridation soustractive et suppressive (Diatchenko *et al.*, 1996) qui a permis d'isoler, entre autres, un ADNc codant une superoxyde dismutase qui a été caractérisé et dont l'étude de l'expression a été réalisée au niveau des transcrits, de la quantité de polypeptides et de l'activité enzymatique. Cette première approche a été ensuite couplée à une analyse de l'expression de plusieurs centaines de gènes par le criblage différentiel de filtres d'ADNc. Les résultats de ces travaux sont présentés dans les publications n°2 et n°3.

L'ensemble des résultats acquis au cours de ce travail est présenté dans ce mémoire qui se divise en 5 chapitres:

- le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique composée de trois parties. La première propose un bilan des connaissances sur la symbiose mycorhizienne. La seconde partie est consacrée aux métaux lourds et plus

particulièrement à i) leur origine dans les sols, ii) leur absorption par les plantes et/ou les champignons, iii) aux mécanismes de leur toxicité, iv) et aux mécanismes de tolérance ainsi que les effets des symbiotes mycorhiziens. La troisième partie présente un aperçu des différents outils de l'analyse d'expression des gènes,

- le deuxième chapitre est consacré aux matériels biologiques et aux méthodologies utilisés et développés dans le cadre de ces travaux de recherche,
- le troisième chapitre regroupe, sous la forme de trois publications, les principaux résultats obtenus,
- le quatrième chapitre est consacré à leur discussion finale,
- le cinquième et dernier chapitre présentera les conclusions ainsi que les perspectives ouvertes par ce travail.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Tableau 1. Principales caractéristiques des différents types de mycorhizes (modifié d'après Smith & Read, 1997).
Zygo = Zygomycète, Basidio = Basidiomycète, Asco = Ascomycète
Bryo = Bryophytes, Ptérido = Ptéridophytes, Gymno = Gymnospermes, Angio = Angiospermes, Monotrop = Monotropacées.

	Types de mycorhize						
	VA	Ecto-mycorhize	Ectendo-mycorhize	Arbutoïde	Mono-tropoïde	Ericoïde	Mycorhize des Orchidées
Hyphes septés	-	+	+	+	+	+	+
Hyphes aseptés	+	-	-	-	-	-	-
Colonisation intracellulaire	+	-	+	+	+	+	+
Manteau	-	+	±	±	+	-	-
Réseau de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Vésicules	±	-	-	-	-	-	-
Taxon fongique	Zygo	Basidio/Asco (Zygo)	Basidio/Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Taxon végétal	Bryo Ptérido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotrop	Ericales Bryo	Orchidées

1.1. Les symbioses mycorhiziennes

Le terme "symbiose" a probablement été utilisé pour la première fois par Franck en 1877 pour décrire la coexistence régulière d'organismes dissimilaires, sans relation de parasitisme, comme cela peut être observé pour les lichens.

Dans la littérature portant sur les mycorhizes, le terme de symbiose est souvent utilisé pour décrire cette relation mutualiste fortement interdépendante "où la plante perçoit les éléments minéraux alors que le champignon reçoit les photosynthétats" (Harley & Smith, 1983, Harley, 1989). Les mycorhizes sont des associations mutualistes très évoluées entre les champignons du sol et les racines des plantes. Les partenaires de cette association appartiennent au règne des champignons (Basidiomycètes, Ascomycètes et Zygomycètes) et de la plupart des plantes vasculaires (Harley & Smith, 1983, Kendrick, 1992, Brundrett, 1991).

Les associations mycorhiziennes sont les plus communes et les plus répandues des symbioses qui ont été décrites. Dans les écosystèmes naturels, la productivité ainsi que la diversité et la composition en espèces sont très souvent dépendantes de la présence et de l'activité des mycorhizes. En Europe, plus de 76 % des plantes sont mycorhizées (Harley & Harley, 1987). Toutes les gymnospermes sont mycorhizées et parmi les angiospermes, 83 % des dicotylédones et 79 % des monocotylédones sont mycorhizées (Wilcox, 1991). Les Crucifères et les Chénopodiacées, quant à elles, ne sont pas mycorhizées (Harley & Harley, 1987). En revanche, les plantes des sols arides, salés, inondés, ou perturbés (après exploitation minière par exemple), ou bien des sols dont la fertilité est trop faible ou trop forte, ne sont pas mycorhizées (Brundrett, 1991).

1.1.1. Les différents types d'associations mycorhiziennes

Différents types de mycorhizes sont distingués en fonction du champignon qui leur est associé: celles qui impliquent des champignons aseptés de la famille des Zygomycètes et de l'ordre des Glomales, et celles qui sont formées par des champignons septés appartenant à la famille des Ascomycètes et des Basidiomycètes. Une classification selon le partenaire végétal

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

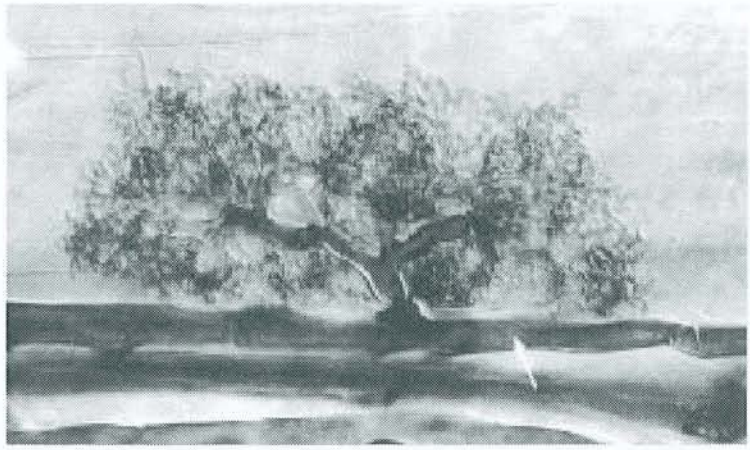


Figure 1. Endomycorhize à arbuscule.
Arbuscule mature de Glomus mosseae dans une cellule corticale d'Allium porrum. La flèche indique une hyphe intercellulaire à partir de laquelle s'est développée l'arbuscule (d'après Brundrett *et al.*, 1984).

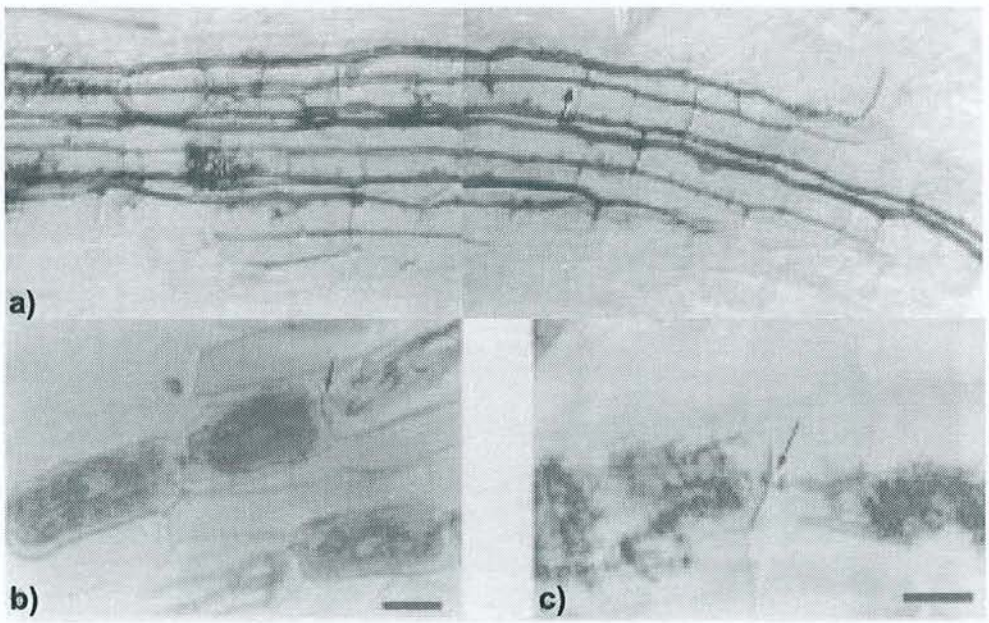


Figure 2. Variations dans la colonisation intra-racinaire des VA mycorhizes.
a) Une unité d'infection de type *Arum* de *Glomus versiforme* dans une racine de 10 jours d'*Allium porrum*. Les hyphes intercellulaires ont une croissance longitudinale entre les cellules corticales de la racine, parfois des arbuscules se développent (d'après Brundrett *et al.*, 1985). **b)** Mycorhize de type *Paris* dans *Acer saccharum* montrant des enroulements très développés dans les cellules corticales. **c)** Illustre le passage des hyphes d'une cellule corticale à l'autre (d'après Cooke *et al.*, 1993). Trait = 40µm.

n'est pas envisageable du fait de la grande variété taxonomique du symbiote végétal dans les mycorhizes.

Sept types d'associations peuvent être mis en évidence, dont les deux plus importants sont les mycorhizes à vésicules arbuscules (ou mycorhizes VA), et les ectomycorhizes (Tableau 1).

1.1.1.1. Les endomycorhizes

Les endomycorhizes sont appelées aussi mycorhizes à vésicules-arbuscules (mycorhizes VA) car des arbuscules sont observées dans les cellules corticales (Figure 1). La découverte d'arbuscules chez la plante *Aglaophyton major*, datant de l'ère primaire et plus précisément du Dévonien, semble indiquer que ce type de mycorhize s'est établi il y a plus de 400 millions d'années (Remy *et al.*, 1994). Les études récentes de Redecker *et al.* (2000) ont décrit des hyphes fossiles provenant de roches datant de l'Ordovicien (460 millions d'années). Le rôle joué par ces symbioses dans la colonisation du monde terrestre par les végétaux vasculaires et dans l'évolution des plantes semble donc être considérable (Simon *et al.*, 1993).

Les endomycorhizes sont les symbioses les plus communes (Harley & Harley, 1987). En fait, ce sont près de 25000 espèces végétales qui auraient la capacité de former des mycorhizes VA (Law & Lewis, 1983). Ces mycorhizes sont formées de l'association de racines d'une grande variété de plantes (angiospermes, gymnospermes et ptéridophytes) et de champignons symbiotiques obligatoires aseptés appartenant à quelques genres de l'ordre des Glomales (Zygomycotinés): *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulaspora*, *Sclerocystis*.

On peut distinguer deux groupes anatomiques d'endomycorhizes en fonction de l'espèce végétale (Gallaud, 1905). Le type "arum", considéré comme le type même des mycorhizes VA, dans lequel le champignon envahie rapidement le cortex racinaire par des hyphes intercellulaires. De courtes dérivations pénètrent dans les cellules corticales pour former les arbuscules caractéristiques (Figure 2A). Le type "Paris" est caractérisé par la présence de nombreux hyphes enroulés intracellulaires qui se propagent directement de cellule à cellule dans le cortex (Figure 2B). Les arbuscules se développent à partir de ces enroulements, et il y a peu ou pas de croissance intercellulaire. En conséquence, la croissance est plus lente que les endomycorhizes de type "arum".

Ces champignons formant des mycorhizes VA ne sont pas cultivables sans être associés à leur hôte.

1.1.1.2. Les ectomycorhizes

La trace la plus ancienne de ce type de mycorhize date de l'Eocène (50 millions d'années) (Le Page *et al.*, 1997). Il semble donc que les ectomycorhizes soient apparues bien après les endomycorhizes.

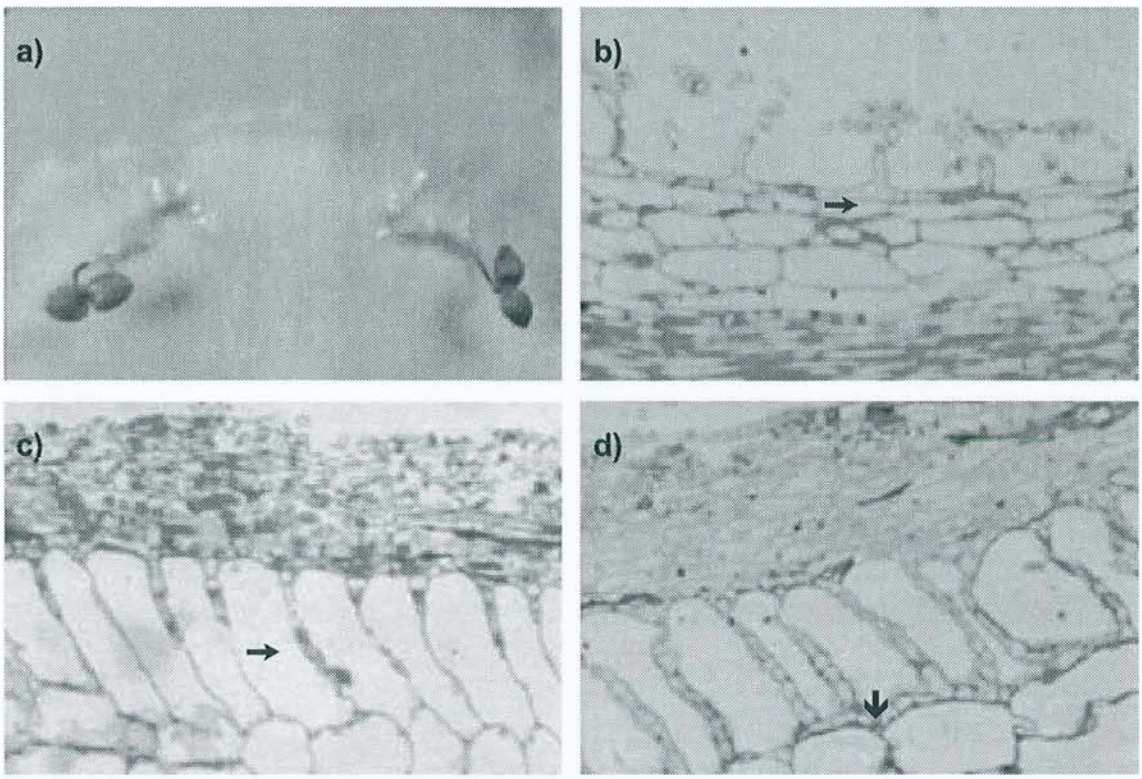


Figure 3. Ontogenèse de la mycorhize *Paxillus involutus - Betula pendula* (modifié d'après Brun *et al.*, 1995).
a) Plantules mycorhizées de bouleau après 4 jours de contact (x 2,5). **b)** Coupe longitudinale d'une racine après 1 jour de contact. Les poils absorbants sont encore visibles (flèche) (x 190). **c)** Coupe longitudinale d'une racine après 8 jours de contact. Les cellules fongiques ont commencé à s'insinuer entre les cellules corticales (flèche) qui se sont allongées radialement (x 210). **d)** Coupe longitudinale d'une mycorhize mature après 15 jours de contact. Les cellules fongiques forment un réseau de Hartig (flèche), entourant la première assise de cellules corticales uniquement (x 210).

L'association ectomycorhizienne est caractérisée par la présence de 3 composantes structurales: i) un réseau d'hyphes extramatriciels en relation avec le sol et les fructifications du champignon, ii) un manteau de cellules fongiques qui entoure la racine, et iii) un réseau de Hartig constitué d'hyphes qui s'allongent vers le centre de la racine entre les cellules de l'épiderme et les cellules corticales sans jamais pénétrer à l'intérieur de ces cellules (Figure 3d). Le réseau de Hartig constitue la zone de contact entre les deux symbiotes et joue un rôle prépondérant dans le transfert des molécules au sein de l'interface symbiotique (Duddridge & Read, 1984). Sa structure est similaire dans toutes les associations étudiées à ce jour, mais sa pénétration vers l'intérieur de la racine est plus profonde lorsque le partenaire végétal appartient à la classe des gymnospermes que lorsqu'il appartient à la classe des angiospermes. La structure du manteau fongique, au contraire, varie en fonction de l'espèce de champignon qui le forme. Ce manteau pourrait être une structure appropriée pour le stockage et le transfert de nutriments à la plante. Le réseau d'hyphes extramatriciels quant à lui, peut éventuellement s'organiser en rhizomorphes, et permet d'augmenter le volume de sol en contact avec les racines mycorhizées. L'utilisation du système de synthèse axénique de mycorhizes décrit par Brun *et al.* (1995) a permis d'étudier le développement des ectomycorhizes formées entre *Betula pendula* et *Paxillus involutus* (Figure 3). La morphologie des ectomycorhizes dépend des espèces végétales et fongiques associées (Agerer, 1987). La figure 4 illustre la morphologie de trois types d'ectomycorhizes.

Les arbres sont très souvent associés à des champignons ectomycorhiziens, en particulier dans les régions boréales, subtropicales et tempérées, particulièrement sur sols acides. La plupart des plantes partenaires appartiennent aux familles des Pinacées, Fagacées, Bétulacées et Myrtacées. Elles pourraient également concerner des arbustes, comme le *Dryas* (Rosacée) et l'*Helianthemum* (Cistacée), et un faible nombre d'espèces herbacées (*Polygonum viviparum* et *Kobresia myosuroides*) (Wilcox, 1991). La famille des Salicacées à laquelle appartiennent les genres *Salix* et *Populus* est intéressante à noter ici, puisqu'elle peut-selon les conditions du sol-établir des mycorhizes VA dans les sols riches en éléments minéraux ou nutritifs, ou des ectomycorhizes dans les sols organiques.

Un grand nombre d'espèces fongiques peut former des ectomycorhizes, la majorité de celles-ci appartiennent aux Basidiomycètes, mais aussi aux Ascomycètes. Environ 5000 à 6000 espèces de champignons seraient capable de former des ectomycorhizes ou des ectendomycorhizes (voir paragraphe 1.1.1.3.4.) (Molina *et al.*, 1992). La plupart des champignons ectomycorhiziens est disponible en culture pure, contrairement aux champignons formant des mycorhizes VA.

1.1.1.3. Les autres types

L'ordre des Ericales est composé de familles très proches (Engler & Prantl, 1897), dont les membres sont présents dans tous les biomes. Trois types de mycorhizes dont la plante hôte

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

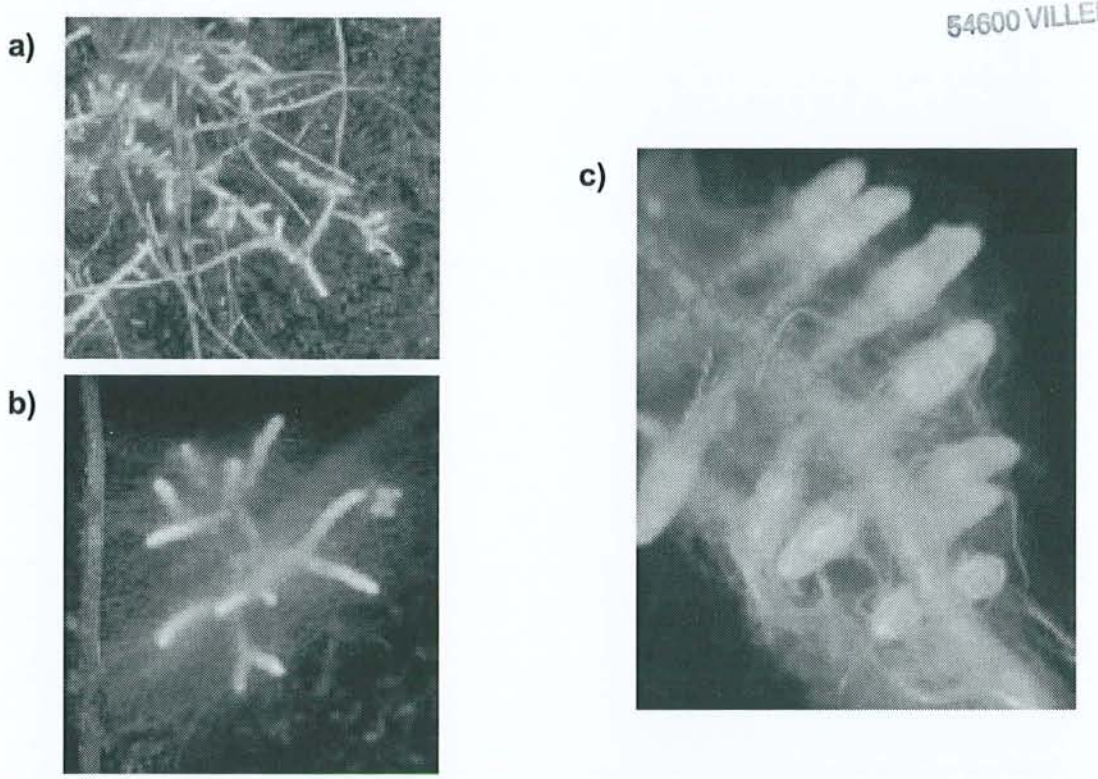


Figure 4. Exemples de morphologie d'ectomycorhizes.
a) Ectomycorhizes de bouleau associé à *Paxillus involutus*. **b)** Ectomycorhizes dichotomes de *Picea abies* associé à *P. involutus*. **c)** Ectomycorhizes d'*Eucalyptus globulus* associé à *Hebeloma* sp.

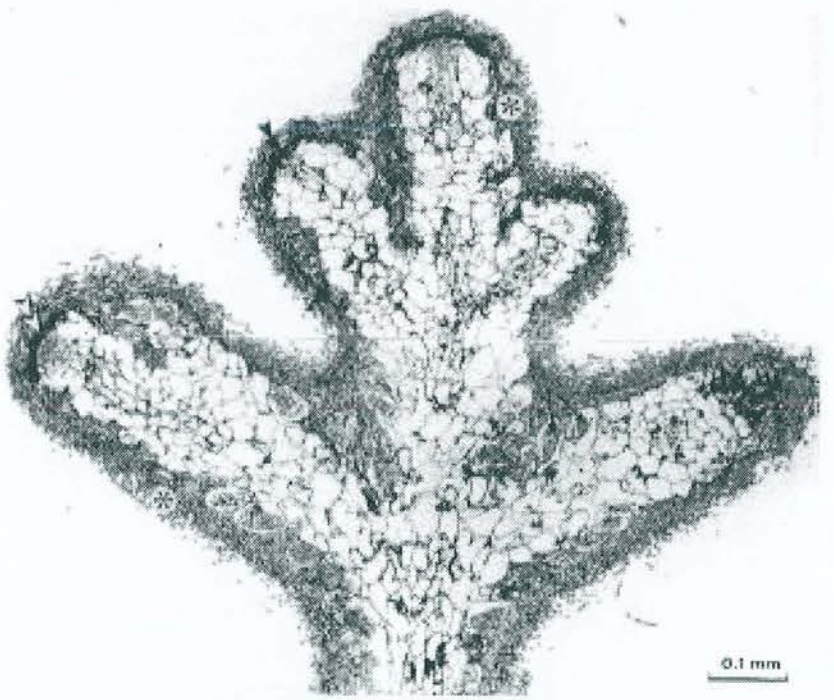


Figure 5. Coupe longitudinale de mycorhize formée entre *Pisolithus tinctorius* et *Arbutus menziesii* observée en microscopie optique.
On note l'applatissement de la partie apicale des racines, la présence d'un épais manteau, ainsi que la colonisation de nombreuses cellules racinaires par des hyphes intracellulaires (d'après Massicotte *et al.*, 1993).

appartient à l'ordre des Ericales ont été décrit: les mycorhizes éricoïdes, arbutoïdes et monotropoïdes.

1.1.1.3.1. Les mycorhizes arbutoïdes et monotropoïdes

Les techniques moléculaires ont permis de mettre en évidence des relations phylogénétiques possibles entre les taxons de plantes formant des mycorhizes arbutoïdes et monotropoïdes, et d'apporter des renseignements quant à la position taxonomique des champignons associés à ce dernier type de mycorhize. Il semblerait que ces deux types de mycorhizes soient issus d'un ancêtre commun et que les différences structurales soient dûes à différents processus d'acquisition et de transfert du carbone organique entre les symbiotes.

De nombreuses expériences ont permis de montrer que les champignons associés aux mycorhizes arbutoïdes sont des Basidiomycètes (Duddridge, 1980; Read, 1983; Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1983). Les plantes, photosynthétiques et ligneuses, qui leurs sont associées appartiennent aux genres Arbutoïdées et Pyrolacées. Molina & Trappe (1982) ont montré que des champignons ectomycorhiziens étaient capables d'établir des mycorhizes arbutoïdes avec *Arbutus menziesii* et *Arctostaphylos uva-ursi*. La plante peut donc jouer un rôle régulateur très important dans le développement des mycorhizes. D'un point de vue fonctionnel, il est supposé que les mycorhizes arbutoïdes fonctionnent comme les ectomycorhizes. L'analyse de la structure de telles mycorhizes révèle la présence d'un fin manteau, d'un réseau de Hartig et de la croissance d'hyphes à l'intérieur de cellules de l'épiderme (Figure 5).

Les plantes de la famille des Monotropacées sont non-chlorophylliennes (Wallace, 1975). Elles dépendent donc totalement des champignons mycorhiziens pour leurs besoins en carbone. Le terme de mycohétérotrophie a été employé par Leake (1994) pour décrire une telle association. Il a été montré que ces plantes peuvent également tirer leur nourriture des arbres voisins *via* un mycélium commun (Björkman, 1960). D'autre part, les expériences de Francke (1934) ont permis de montrer l'importance du partenaire fongique pour le bon développement de leurs embryons. D'un point de vue structural, on retrouve un manteau fongique compact et constitué de multiples épaisseurs qui entoure les racines de ces plantes. Un réseau de Hartig duquel s'échappe un hyphe qui se glisse à l'intérieur des cellules de l'épiderme dont la paroi semble s'allonger autour du champignon pour former une structure appelée "doigt" de champignon. La formation de cette structure a été très bien décrite dans le cas de la plante *Sarcodes sanguinea* (Robertson & Robertson, 1982).

1.1.1.3.2. Les mycorhizes éricoïdes

Dans l'ordre des Ericales, les Ericacées et les Epacridacées sont les plus importantes familles. A l'exception de quelques Ericacées, les membres de ces deux familles ainsi que des membres des Empétracées présentent des mycorhizes de type éricoïdes. Les racines de ces

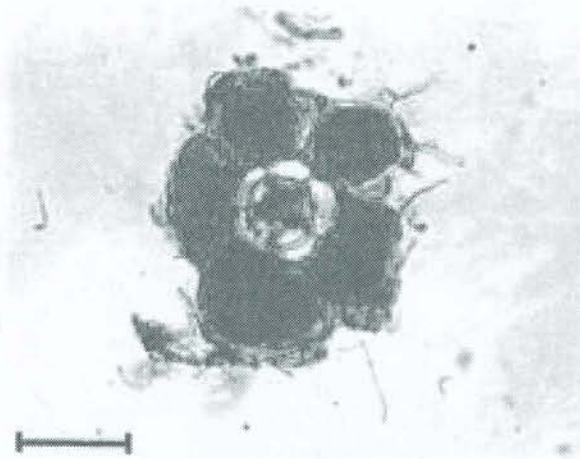


Figure 6. Coupe transversale d'une racine mycorhizée de *Calluna vulgaris*, montrant le cortex d'une couche cellulaire complètement colonisé par les hyphes du champignon. Trait = 1mm (d'après Smith & Read, 1997).

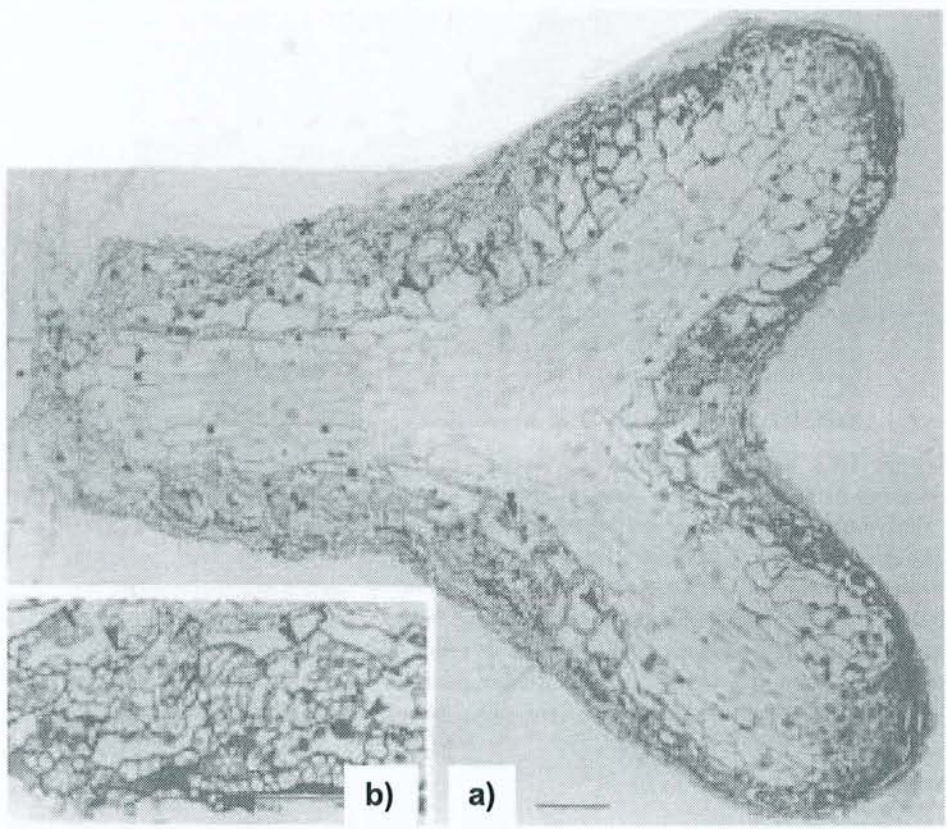


Figure 7. Coupe longitudinale d'une racine courte dichotomisée de *Pinus banksiana* mycorhizée par *Wilcoxina mikolae* var. *mikolae*.
a) Cette vue montre le réseau de Hartig (flèches), le manteau (*) et les hyphes intracellulaires (doubles flèches). Trait = 100µm. **b)** Grossissement d'une zone de la photographie a) montrant la forte vacuolisation des hyphes constituant le réseau de Hartig (flèches) et des hyphes intracellulaires (doubles flèches). Trait = 50µm (d'après Scales & Peterson, 1991).

plantes sont très fines et morphologiquement très simples. Ces racines n'ont pas d'épiderme (Peterson *et al.*, 1980: Allaway & Ashford, 1996). La mycorhization a donc lieu au niveau des cellules corticales dans lesquelles le champignon peut proliférer pour former des amas denses qui ont servi de caractéristique à ce qu'Harley (1969) appelait pour la première fois des mycorhizes éricoïdes. Le diamètre des racines mycorhizées n'excède généralement pas les 100 µm. Les champignons formant de telles mycorhizes sont le plus souvent des Ascomycètes du genre *Hymenoscyphus* (Smith & Read, 1997), *Oidiodendron* (Burgeff, 1961), bien que des Basidiomycètes du genre *Clavaria* aient été trouvés associés avec des racines d'Ericacées (Peterson *et al.*, 1980) (Figure 6).

1.1.1.3.3. Les mycorhizes orchidacées

Les Orchidacées regroupent des milliers d'espèces aux formes et niches écologiques très différentes. La plupart des orchidées adultes sont photosynthétiques, mais les orchidées souterraines ainsi que près de 200 autres espèces ne sont pas chlorophylliennes et sont mycohétérotrophes (Leake, 1994). Toutes les orchidées sont mycorhizées et forment des associations avec des champignons dans les premiers stades de leur développement. Bernard (1904) a été le premier chercheur à travailler sur ces mycorhizes, et a isolé et identifié le champignon Basidiomycète *Rhizoctonia*. D'autres genres ont depuis été isolés (Smith & Read, 1997).

1.1.1.3.4. Les ectendomycorhizes

Ce terme décrit les racines mycorhizées qui, du point de vue de leur structure et de leur développement, ressemblent aux ectomycorhizes, sauf en ce qui concerne l'invasion intracellulaire des cellules de la plante hôte par les hyphes fongiques (Figure 7). Les champignons impliqués dans ce type de mycorhizes sont des Ascomycètes qui appartiennent aux genres *Wilcoxina* (Mikola, 1965; Laiho, 1965), *Complexipes* (Walker, 1979); ainsi que quelques Hyphomycètes du genre *Phialophora* (Melin, 1923; Wang & Wilcox, 1985).

1.1.2. Les avantages liés à l'association mycorhizienne

Le fonctionnement de tous les systèmes mycorhiziens dépend de la capacité du partenaire fongique d'absorber des éléments disponibles sous forme organique et/ou inorganique dans le sol et de les transférer (ou leurs métabolites) aux racines de la plante qui leur est associée. Dans la plupart des systèmes mycorhiziens, le carbone organique, qui provient de la photosynthèse, est transféré de la plante vers le champignon. C'est ce mouvement bidirectionnel qui est à la base de cette association mutualiste. Par contre, comme nous l'avons vu

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

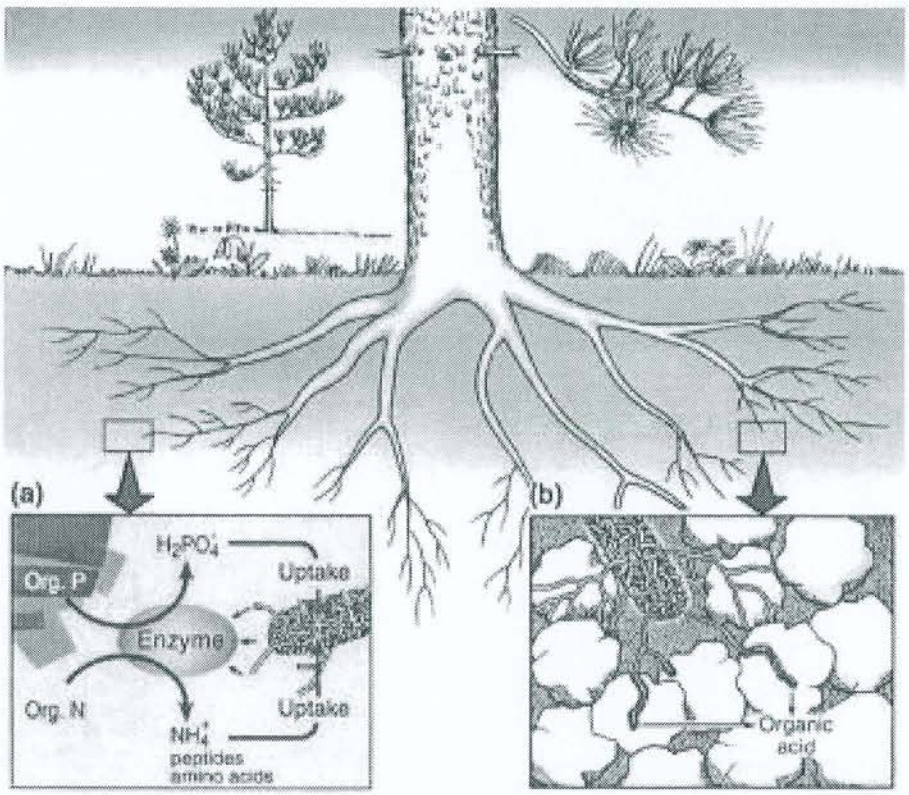


Figure 8. Mobilisation des éléments nutritifs par les champignons ectomycorhiziens.
a) Par la production d'enzymes, les champignons ectomycorhiziens peuvent utiliser les formes organiques de N et P. **b)** Par l'excrétion d'acides organiques, les champignons ectomycorhiziens peuvent mobiliser les éléments nutritifs de sources minérales. (modifié d'après Landeweert *et al.*, 2001).

précédemment, dans le cas des orchidées et des mycohétérotrophes, le transfert de carbone organique et des éléments du sol se fait de façon polarisée, du champignon vers la plante.

1.1.2.1. Les avantages pour la plante

1.1.2.1.1.Réseau mycélien

La contribution du mycélium extramatriciel de racines ectomycorhiziennes à augmenter l'exploration efficace du sol a été montré par des études en champs (Finlay & Söderström, 1989) et en microcosmes (Read, 1992, Rousseau *et al.*, 1994). La longueur des hyphes peut atteindre 504 mètres pour 1 mètre de racines (Rousseau *et al.*, 1994), voire même 2000 $m.m^{-1}$ (Read & Boyd, 1986). Le mycélium extramatriciel peut se ramifier, mais aussi s'organiser en cordons mycéliens qui sont capables de prospecter le sol sur des distances importantes (± 20 cm). Les hyphes extramatriciels sont des préleveurs très efficaces, du fait de leur rapport surface/masse élevé, et de leur capacité à pénétrer des micro-sites qui sont inaccessibles aux racines des plantes (Landeweert *et al.*, 2001). De la même façon, et bien qu'il n'existe pas de cordons mycéliens, les champignons endomycorhiziens développent un important mycélium extramatriciel (Smith & Gianinazzi–Pearson, 1988).

1.1.2.1.2. La mobilisation des éléments nutritifs par les champignons mycorhiziens

Le mycélium extramatriciel joue un rôle essentiel dans l'absorption des éléments nutritifs par les plantes. Les champignons ectomycorhiziens ont non seulement un effet quantitatif par l'augmentation de la surface d'absorption et du volume de sol exploré, mais aussi un effet qualitatif (Figure 8):

- les champignons ectomycorhiziens, en produisant des enzymes (protéases, phosphatases), sont capables d'utiliser des formes organiques d'azote (N) et de phosphore (P), qui ne sont pas accessibles aux racines nues. La mobilisation d'éléments nutritifs à partir d'acides amines, de peptides, de protéines, de chitine et d'acides nucléiques a été montré (Chalot & Brun, 1998), ainsi que le transfert de N et P à la plante hôte (Antibus *et al.*, 1997; Chalot & Brun, 1998). Les hyphes sont toutefois capables d'absorber directement les acides aminés et les peptides simples (Chalot & Brun, 1998),

- les champignons ectomycorhiziens, grâce à l'excrétion d'acides organiques, sont capables de mobiliser le potassium (K), le magnésium (Mg), le calcium (Ca) et P à partir de substrats minéraux (Wallander & Wickman, 1999; Wallander, 2000a, b). Ces éléments essentiels deviennent alors disponibles à la plante hôte *via* le partenaire fongique (Wallander, 2000a).

Toutefois, les capacités à mobiliser les éléments nutritifs qu'ils soient d'origine organique ou minérale semblent dépendre de l'espèce fongique considérée (Lapeyrie *et al.*, 1991).

1.1.2.1.3. Amélioration de la nutrition de la plante

– amélioration de la nutrition phosphatée

Les phosphates sont absorbés sous forme inorganique $H_2PO_4^-$ à partir de la solution du sol où il est présent à de très faibles concentrations (la proportion de P du sol en solution est inférieure à 1 %). Le P existe sous 2 formes dans le sol: P organique (Po) et P inorganique (Pi), cette dernière forme constituant le pool de P disponible pour les plantes.

Par les champignons endomycorhiziens

Les champignons endomycorhiziens fournissent à la plante hôte des éléments minéraux qui ont une faible mobilité dans la solution du sol, c'est en particulier le cas du phosphore. Toutefois, ces capacités dépendent de l'espèces fongique considérée. Les plantes associées ou non aux champignons endomycorhiziens absorbent la même forme labile de P (Bolan, 1991). Par contre, les plantes mycorhizées ont accès à des formes de P moins solubles, comme les phosphates de calcium (Knight *et al.*, 1989), les phosphates de fer (Bolan *et al.*, 1987), ou bien des sources de phosphates organiques comme les phytates (Tarafdar & Marschner, 1994), les ARN (Jayachandran *et al.*, 1992), ou l'AMP (Joner *et al.*, 2000). Du fait de la différence de potentiel électrochimique entre le sol et les hyphes, l'absorption de P est vraisemblablement un phénomène actif (Beever & Burns, 1980; Sanders, 1988; Smith & Smith, 1990; Garrill, 1995; Michelet & Boutry, 1995). Un transporteur à haute affinité de P a d'ailleurs été cloné chez le champignon *Glomus versiforme* et caractérisé (Harrison & Van Buuren, 1996). Des mesures d'influx réalisées sur des racines mycorhizées ou non, ont montré que les champignons peuvent contribuer à hauteur de 70 à 80 % du P absorbé (Sanders & Tinker, 1973; Li *et al.*, 1991). Afin de maintenir une concentration intracellulaire en P faible, les champignons synthétisent des polyphosphates à courte chaîne qui seront stockés dans les vacuoles (Smith & Gianninazzi-Pearson, 1988). Les mécanismes de translocation des vacuoles dans le champignon impliqueraient soit des flux cytoplasmiques soit des tubules (Smith & Read, 1997). Au niveau des arbuscules (comme cela est généralement admis), l'hydrolyse des polyphosphates permettrait le transfert de phosphate inorganique vers l'apoplasme (Smith & Gianninazzi-Pearson, 1988). Cet efflux peut avoir lieu grâce aux pompes à protons qui génèrent un gradient électrochimique qui active des co-transporteurs à protons (Michelet & Boutry, 1995).

Par les champignons ectomycorhiziens

La mobilisation de Po à partir de litière (substrat organique naturel) et son transfert à la plante hôte ont été mis en évidence chez le champignon ectomycorhizien *P. involutus* (Perez-Moreno & Read, 2000). D'autre part, Wallander (2000) a montré une dégradation de l'apatite (substrat minéral) *in vivo* par des champignons ectomycorhiziens associés à un partenaire végétal. Cette dégradation, due à l'excrétion d'acide oxalique par les champignons, conduit à la libération de P utilisable par l'association symbiotique (Wallander, 2000). L'utilisation de systèmes de culture à deux compartiments a permis de montrer que les hyphes sont capables de prélever et de transférer le P à la plante, et de stimuler ainsi sa croissance (Brandes *et al.*, 1998; Jentschke *et al.*, 2001).

Le statut phosphaté du mycélium du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* contrôle en partie l'absorption du P: celle-ci étant rapide pour un mycélium à faible concentration intracellulaire en P, mais faible lorsque la concentration en P est forte (Cairney & Smith, 1992). Comme dans le cas des champignons endomycorhiziens, l'absorption est vraisemblablement active, mettant en jeu un co-transport de protons (Beever & Burns, 1980; Sanders, 1988; Smith & Smith, 1990; Garrill, 1995; Michelet & Boutry, 1995). L'absorption est immédiatement suivie par la synthèse de grande quantités de polyphosphates (Orlovich *et al.*, 1989) qui sont stockés dans les vacuoles du champignon, et mobilisables en cas de carence en phosphore (Martin *et al.*, 1985). Les mécanismes de translocation sont de deux types: un transport apoplasmique de type "mass flow" dans les hyphes centraux, et un transport symplasmique par mouvement des vésicules, assuré par les tubules (Duddridge *et al.*, 1988; Rees *et al.*, 1994). De nombreux champignons ectomycorhiziens peuvent former des rhizomorphes dans lesquels se différencient des hyphes centraux de 6 à 20 µm de diamètre sans cytoplasme, entourés d'hyphes avec un cytoplasme dense et des parois cellulaires fines (Duddridge, 1980; Duddridge *et al.*, 1988). Par contre, les mécanismes permettant la libération de P dans le réseau de Hartig sont encore mal connus.

– amélioration de la nutrition azotée

Par les champignons endomycorhiziens

L'acquisition de l'azote par les endomycorhizes est peu documentée (Marschner, 1995). Les deux sources d'azote inorganique disponibles pour les endomycorhizes sont les nitrates et l'ammonium. Lorsque l'N est fourni sous forme d'NH_4^+, la biomasse végétale, la densité des hyphes ainsi que le transport de ^{15}N au travers des hyphes vers les plantes endomycorhizées sont plus faibles que lorsque des NO_3^- sont fournies à la plante mycorhizée, et ce quel que soit le statut azoté de la plante (Hawkins & George, 2001).

Par les champignons ectomycorhiziens

Dans les forêts boréales et tempérées, l'azote (N) est l'élément limitant la productivité (Tamm, 1991; Ellenberg, 1988). Le transfert d'N au travers du réseau mycélien a été mis en évidence par l'utilisation de systèmes à double compartiment (Brandes *et al.*, 1998; Jentschke *et al.*, 2001a, b). En règle générale, l'ammonium (NH_4^+) est plus rapidement absorbé que le nitrate (NO_3^-) par les ectomycorhizes, comme pour les racines non-mycorhizées (Botton & Chalot, 1995). L'ammonium peut entrer dans le cytoplasme du champignon soit de manière passive soit de manière active par l'intermédiaire d'un co-transporteur à protons (Garrill, 1995). L'étude de l'absorption d'ammonium chez le champignon ectomycorhizien *P. involutus* a montré qu'elle a lieu grâce à un symport proton-dépendant (Javelle *et al.*, 1999). L'absorption d'ammonium est généralement accrue dans les ectomycorhizes (Rygiewicz *et al.*, 1984a; France & Reid, 1979), alors que les résultats concernant l'absorption des nitrates sont plus controversés (France & Reid, 1979; Rygiewicz *et al.*, 1984a, b). Certains champignons ectomycorhiziens sont capables de réduire efficacement les nitrates en ammonium, par l'intermédiaire de la nitrate et de la nitrite réductase (Botton & Chalot, 1999). Un grand nombre d'espèces fongiques est capable de produire des protéases extracellulaires (Cohen, 1980). Ces protéases permettent à la symbiose mycorhizienne d'assimiler des protéines après les avoir dégradées en peptides et acides aminés, et de transférer l'azote au partenaire végétal (Abuzinadah & Read, 1986a, b; Abuzinadah *et al.*, 1986; Chalot & Brun, 1998). En effet, les acides aminés peuvent être transportés au travers de la membrane plasmique du champignon par la mise en jeu de transporteurs (Botton & Chalot, 1999). Plusieurs modèles d'assimilation de l'azote ont été proposés chez les ectomycorhizes: dans les ectomycorhizes impliquant le hêtre, l'assimilation de l'ammonium est réalisée par l'intermédiaire de la glutamine synthétase (GS) dans le champignon et de la glutamate synthase (GOGAT) dans les racines (Martin *et al.*, 1986; Rudawska *et al.*, 1994; Turnbull *et al.*, 1996). Ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour les ectomycorhizes impliquant l'épicéa. Dans cette association, l'ammonium est incorporé pour 1/3 par l'intermédiaire de la glutamate déshydrogénase à NADP (GDH–NADP) et pour 2/3 par l'intermédiaire de la GS (Chalot *et al.*, 1991). Un troisième cas est représenté par les mycorhizes de *Pisolithus tinctorius* et *P. involtus* pour lesquelles la voie GS/GOGAT du champignon est impliquée dans l'assimilation de l'ammonium. Dans le mycélium, l'azote absorbé se retrouve essentiellement sous forme de glutamine, de glutamate et d'alanine (Martin *et al.*, 1986; Finlay *et al.*, 1988; Chalot *et al.*, 1990). Les concentrations en N inorganique (ammonium et nitrate) mesurées dans la sève du xylème sont généralement faibles (<1 % N total) chez l'épicéa et le hêtre (Gessler *et al.*, 1998), ce qui indique que ce sont certainement des formes organiques (acides aminés) qui sont transférées. En particulier la glutamine (et l'alanine dans certains systèmes) est probablement la forme préférentiellement transférée à la plante hôte au niveau de l'interface symbiotique (Smith & Read, 1997).

– autres éléments minéraux

L'absorption de manganèse est généralement réduite lorsque les plantes sont mycorhizées, probablement à cause d'une modification de la microfaune rhizosphérique (Marschner, 1995). Par contre, l'absorption d'autres éléments comme le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) est accrue chez les plantes associées aux champignons endomycorhiziens (Marschner, 1995). Les champignons ectomycorhiziens sont également capables de prélever le potassium et le magnésium à partir de la solution du sol mais aussi à partir de roches (Wallander & Wickman, 1999). Le transfert de magnésium et de calcium au travers des hyphes de champignons ectomycorhiziens a été récemment mis en évidence (Jentschke *et al.*, 2000). Les champignons ectomycorhiziens sont capables, au contraire des champignons endomycorhiziens, de produire et d'excréter des acides organiques. Ces acides organiques ainsi que les sidérophores contribueraient à accroître l'altération du mica dans le sol (Leyval & Berthelin, 1991). Certains champignons ectomycorhiziens sont capables de relarguer des quantités importantes d'acide oxalique qui dissolvent les phosphates de calcium. Par la production de sidérophores et d'acide oxalique, certains champignons ectomycorhiziens jouent un rôle dans l'adaptation de leur plante hôte aux sols calcaires (Lapeyrie, 1990).

1.1.2.1.4. Résistance vis-à-vis des pathogènes

De nombreuses études ont montré que la présence d'une symbiose endomycorhizienne établie peut réduire les effets de nombreux pathogènes (Dehne, 1982; Read, 1999). Cependant, les mécanismes cellulaires, moléculaires ou physiologiques qui sous-tendent cet effet bénéfique ne sont pas connus. Le symbiote mycorhizien serait non seulement capable de réduire la propagation du pathogène dans les racines, mais aussi de protéger ses propres structures: les hyphes du pathogène seraient incapables de pénétrer des cellules contenant des arbuscules (Cordier *et al.*, 1996).

En 1973, Marx suggérait que le manteau fongique enveloppant les racines ectomycorhizées pût jouer le rôle d'une barrière physique à la pénétration des pathogènes, mais des travaux récents attribuent des propriétés antibiotiques aux champignons ectomycorhiziens (Duchesne *et al.*, 1988a, b; Kope *et al.*, 1991). Toutefois, ces propriétés n'ont pas encore été testées dans les conditions naturelles. Les champignons ectomycorhiziens peuvent également produire des composés phénoliques qui peuvent réduire les effets de nombreux champignons pathogènes (Kope & Fortin, 1990). La production d'acide oxalique par les champignons ectomycorhiziens peut également supprimer les effets nuisibles de pathogènes (Duchesne *et al.*, 1989).

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

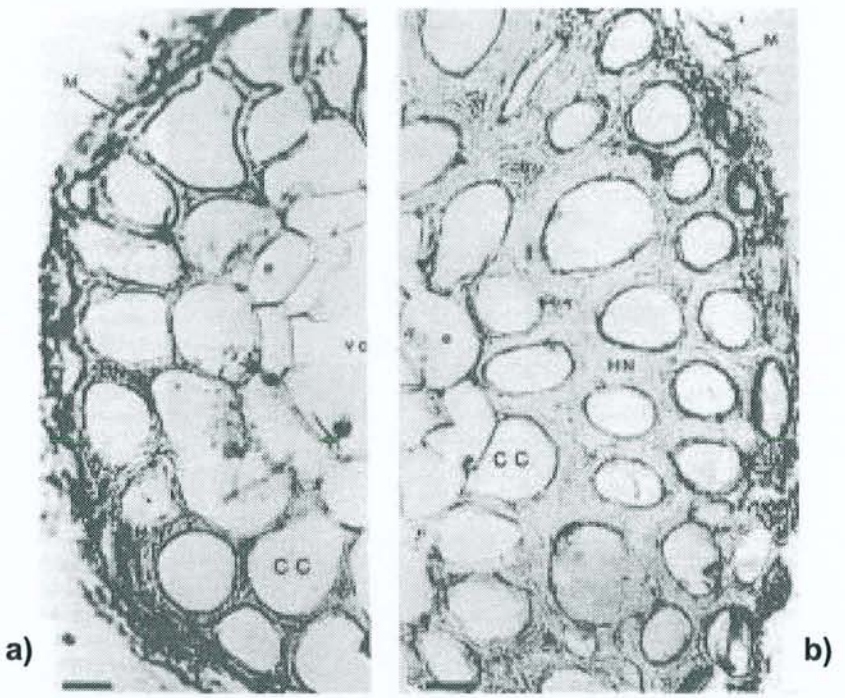


Figure 9. Coupes transversales de mycorhizes formées entre *Pinus pinaster* et *Hebeloma cylindrosporum* observées en microscopie optique.
a) Association avec le monocaryon h1 sauvage d'*H. cylindrosporum*, on note le réseau de Hartig unisérié. **b)** Association avec un monocaryon h1 muté surproduisant de l'AIA, on note dans ce cas le développement du réseau de Hartig constitué de plusieurs couches de cellules fongiques. CC: cellule corticale, HN: réseau de Hartig, VC: vaisseaux conducteurs. Trait = 13 µm (d'après Gea *et al.*, 1994).

1.1.2.1.5. La production de phytohormones

Les champignons ectomycorhiziens sont capables de produire une large gamme de phytohormones (Beyrle, 1995). L'auxine a été particulièrement étudiée. Slankis (1973) proposait l'hypothèse selon laquelle la formation de l'ectomycorhize est régulée par la production d'auxine par le champignon. Cette production a depuis été démontrée (Ek *et al.*, 1983; Frankenberger & Poth, 1987). Afin d'étudier le rôle de l'auxine dans la régulation de la symbiose, la production de souches de champignons mutantes surproduisant de l'auxine a été entreprise chez *Hebeloma cylindrosporum* (Durand *et al.*, 1992). Gay *et al.* (1992) ont montré que cette surproduction d'AIA entraîne la formation d'un réseau de Hartig plus développé, constitué de plusieurs couches de cellules fongiques, qui pénètre jusqu'à l'endoderme; alors que les mycorhizes de la souche sauvage possèdent un réseau de Hartig normalement constitué d'une seule couche de cellules fongiques ne franchissant jamais l'endoderme (Gea *et al.*, 1994) (Figure 9). L'auxine pourrait réguler la mise en place du réseau de Hartig lors de l'établissement de la symbiose mycorhizienne.

1.1.2.1.6. Amélioration du statut hydrique de la plante

Dès 1935, Cromer a émis l'hypothèse selon laquelle la mycorhization augmenterait la résistance à la sécheresse du pin en protégeant les racines du dessèchement, mais aussi en favorisant l'absorption d'eau à de faibles potentiels hydriques. Cependant, la mycorhization n'aurait que peu d'effets sur la survie des plantes soumises à une longue période de sécheresse (Goss, 1960). Grâce à la mise en place de rhizomorphes et d'un réseau extramatriciel important, les champignons ectomycorhiziens vont pouvoir augmenter la fourniture en eau de leur plante hôte (Brownlee *et al.*, 1983). Les rhizomorphes sont très bien adaptés au transport rapide de l'eau vers la plante (Lamhamedi & Fortin, 1991). D'autre part, une corrélation a pu être établie entre le potentiel hydrique de la plante, celui du xylème, la résistance du système racinaire, et la croissance et le diamètre des rhizomorphes (Lamhamedi *et al.*, 1992).

Une tolérance accrue à la sécheresse a également été observée pour les plantes endomycorhizées. Dans ce cas, une amélioration du statut phosphaté des plantes serait probablement à l'origine de cet effet, bien que le statut hydrique de la plante hôte soit différent entre des plants inoculés ou non (Augé & Stodola, 1990). Les changements dans le statut hydrique de la plante pourraient être la conséquence indirecte de modifications hormonales et structurales au niveau de la plante (Marschner, 1995). L'augmentation d'absorption d'eau par les plants endomycorhizées est plus probablement une conséquence indirecte du changement de la structure du sol (augmentation de la conductivité hydraulique insaturée) par les hyphes extraradiculaires (Fitter, 1985; Davies *et al.*, 1992).

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

1.1.2.1.7. Augmentation de la photosynthèse

La colonisation par des champignons ectomycorhiziens (Nylund & Wallander, 1989; Rousseau & Reid, 1990, Conjeaud *et al.*, 1996) et endomycorhiziens (Johnson, 1984; Brown & Bethlenfalvay, 1988; Fay *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1998) permet d'accroître les capacités photosynthétiques de la plante hôte. Cette augmentation compenserait les 5-10 % de carbone total assimilé dans les endomycorhizes (Snellgrove *et al.*, 1982) et les 10-20 % dans les ectomycorhizes (Finlay & Söderström, 1992).

1.1.2.2. Les bénéfices pour le champignon

Ho & Trappe (1973) ont réalisé les premières expériences qui ont montré, grâce au suivi de $^{14}CO_2$ incorporé dans les photosynthétats, que de faibles quantités de photosynthétats marqués se retrouvaient après quelques semaines dans les hyphes et les spores des champignons endomycorhiziens. Plus récemment, il a été calculé que les racines mycorhizées de plantes ligneuses et herbacées reçoivent environ 4 à 20% de photosynthétats en plus par rapport aux racines non mycorhizées (Eissenstat *et al.*, 1993). Toutefois, les différentes espèces de champignons semblent utiliser différentes proportions des photosynthétats totaux (Pearson & Jakobsen, 1993). Alors que le site de transfert de C est inconnu dans les mycorhizes de type Paris (Smith & Smith, 1996), il semble que, dans les mycorhizes de type Arum, ce soit l'interface entre les hyphes intercellulaires et les cellules corticales racinaires, plutôt que les arbuscules, qui constitue le site de transfert de C (Mosse & Hepper, 1975; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1995). La nature des molécules organiques carbonées transférées n'est pas connue avec certitude. Du saccharose serait exporté des cellules racinaires, puis des invertases racinaires ou fongiques pourraient l'hydrolyser dans l'apoplaste en glucose et fructose, qui pourrait être absorbé et utilisé par le champignon. Les expériences de Shachar-Hill *et al.* (1995) ont montré que le glucose est la forme majeure de C absorbé par le champignon et qu'il est immédiatement converti en tréhalose.

Contrairement aux champignons endomycorhiziens, de nombreux champignons ectomycorhiziens ont été isolés en culture pure. Dès 1894, Franck émit l'hypothèse selon laquelle la principale ressource carbonée des champignons ectomycorhiziens serait l'hôte chlorophyllien. Les expériences de Melin & Nilsson (1957) ont montré le transfert direct et rapide des produits de la photosynthèse au partenaire ectomycorhizien. Les photoassimilats sont transportés sous forme de saccharose dans la plupart des plantes (Ziegler, 1975; Giaquinta, 1983) qui serait transféré dans l'apoplasme puis clivé en glucose et en fructose par des invertases végétales liées aux parois (Taber & Taber, 1987; Salzer & Hager, 1991; Schaeffer *et al.* ,1995). Le glucose serait ensuite préférentiellement absorbé par le champignon (Chen & Hampp, 1993; Hampp *et al.*, 1995) grâce à un transporteur d'hexose. A ce niveau, il semble qu'un transport actif soit mis en jeu afin de maintenir un flux net en direction du partenaire fongique (Smith & Read,

1997). De tels transporteurs ont été identifiés chez les mycorhizes VA (Harrison, 1996) et chez les champignons ectomycorhiziens (Nehls, 1998) pour lesquels il a été montré que l'expression des gènes correspondants est régulée par l'établissement de la symbiose mycorhizienne. Une fois dans les cellules fongiques, le glucose est converti en tréhalose et le fructose en mannitol. Les études réalisées sur l'activité respiratoire de la part mycélienne dans l'ectomycorhize ont permis de montrer qu'environ 30 % de la respiration totale était due au mycélium mycorhizien (Söderström & Read, 1987). Les cellules racinaires mycorhizées semblent avoir une respiration accrue de par le besoin en énergie pour le transfert des solutés comme cela a été montré pour des racines colonisées par un champignon endomycorhizien (Cox & Sanders, 1974; Smith *et al.*, 1985).

Les champignons mycorhiziens sont également capables de dégrader des structures organiques complexes comme la lignine (Abuzinadah & Read, 1986a; Haselwandter *et al.*, 1990; Jennings, 1995) ou d'assimiler le CO_2 par l'intermédiaire de carboxylases (Wingler *et al.*, 1996).

1.2. Les métaux lourds

1.2.1 Généralités

1.2.1.1. Définition

La classification périodique des éléments chimiques selon Mendeleïev regroupe des métaux et des non-métaux. Chacun de ces deux groupes présente des propriétés physiques et chimiques différentes. Les métaux ont aujourd'hui tendance à être classés en fonction de leur potentialité à établir des liaisons thermodynamiques stables avec un ligand organique (Nieboer & Richardson, 1980). A l'exception du béryllium et de l'aluminium, la plupart des métaux sont à l'état ionique des acides faibles de Lewis (Lewis, 1923). Pearson a proposé en 1968 une classification des accepteurs de paires d'électrons (acides de Lewis) en trois catégories:

- les accepteurs "durs" sont regroupés dans la classe A. On y trouve les alcalins, les alcalino-terreux, les lanthanides et les actinides. Les accepteurs de cette classe forment des liaisons ioniques avec leurs ligands organiques. On y trouve les ions: Na^+, Ca^{2+}, K^+, Mg^{2+},

- les accepteurs "mous" sont regroupés dans la classe B. Les accepteurs de cette classe forment des complexes essentiellement covalents avec leurs ligands. On y trouve les ions Hg^{2+}, Pd^{2+}, Pt^{2+}, Cd^{2+}, Sn^{2+} et Bi^{2+},

- les accepteurs "intermédiaires" parmi lesquels on trouve la plupart des métaux ayant des effets toxiques (Pb^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} et Ni^{2+}), et dont la réactivité avec les molécules cibles organiques est extrêmement polymorphe.

Cette classification se réfère dans chaque cas à un ion spécifique, de telle sorte que si le métal existe dans plus d'un état d'oxydation, chaque forme ionique doit être traitée séparément. Dans ces cas, l'ion ayant la plus forte charge possède les caractéristiques de la classe A (ou au moins de faibles propriétés de la classe B), alors que dans l'état d'oxydation le plus faible, l'inverse est vrai. Bien que ce schéma de classification ne soit pas absolu (de par la présence du groupe des accepteurs "intermédiaires"), et que certains auteurs auraient tendance à placer le même ion métallique dans des classes différentes, il est en général accepté (Nieboer & Richardson, 1980).

L'appellation "métal lourd", qui est couramment utilisée pour désigner les micro-polluants minéraux des différents horizons (sols, eaux, sédiments) de masse volumique supérieure à 5 g/ml ou bien de masse atomique élevée (> 100), et qui peuvent former des sulfures (Adriano, 1986; Crine, 1993) a été très critiquée. En effet, elle apparaît impropre, car elle est souvent appliquée, indistinctement, tout aussi bien à des métaux n'ayant pas nécessairement ces propriétés qu'à des éléments non métalliques (arsenic, sélénium,...). D'autre part, le terme "polluant" n'est pas non plus satisfaisant car certains de ces éléments sont des oligo-éléments (Cu, Zn, Ni, Co,...) essentiels à la vie en faibles teneurs; alors que d'autres métaux dits "lourds" (Pb, Hg,...), même à faible teneur n'ont aucune fonction biologique essentielle connue (McGrath *et al.*, 1995). Le terme d'"élément trace" a également été proposé afin de regrouper les vrais métaux lourds et les éléments qui s'en rapprochent physiquement et chimiquement (Fergusson, 1990). Cependant, ce terme a des significations différentes selon les disciplines scientifiques. En pédologie, un élément est dit "trace" lorsque sa concentration est inférieure à 1 ‰ en moyenne dans la croûte terrestre. De ce fait, le carbone et l'azote sont des éléments traces dans la croûte terrestre, et le fer, le manganèse et l'aluminium sont des éléments majeurs. En biologie, un élément est dit "trace" lorsque sa concentration est inférieure à 0,1 ‰ dans les êtres vivants. Donc, le carbone et l'azote sont des éléments majeurs chez les animaux et les plantes, et le fer, le manganèse et l'aluminium sont des éléments traces dans les êtres vivants.

Toutefois, le terme "métal lourd" est fortement établi dans la littérature en biologie et regroupe à la fois les vrais métaux lourds, les métaux de faible masse atomique (Cr, Co, Ni, Cu) ainsi que certains métalloïdes (Se, As). C'est pourquoi dans la suite de ce mémoire, nous utiliserons le terme "métal lourd" au sens large pour désigner l'ensemble de ces différents éléments.

1.2.1.2. La notion d'éléments essentiels

La notion d'élément minéral essentiel a été proposée par Arnon & Stout (1939). Pour qu'un élément soit considéré comme essentiel, il faut qu'il remplisse trois conditions:

- en l'absence de l'élément, une plante donnée ne peut réaliser son cycle de vie,
- un autre élément ne peut remplacer la fonction d'un élément essentiel,

Tableau 2. Eléments minéraux essentiels chez les plantes supérieures et inférieures (modifié d'après Marschner, 1995).

Classification	*Elément*	*Plantes supérieures*	*Plantes inférieures*
Macroélément	N, P, S, K, Mg, Ca	+	+ (sauf Ca pour les champignons)
Microélément	Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl, Ni	+	+ (sauf B pour les champignons)
Microélément et	Na, Si, Co	±	±
élément "bénéfique"	I, V	-	±

Tableau 3. Contenu des roches en métaux.
Les teneurs totales en métaux dans les sols sont exprimées en mg/kg (modifié d'après Kabata-Pendias & Pendias, 1992).

Elément	*Roches magmatiques*			*Roches sédimentaires*		
	Roches basiques	Roches intermédiaires	Roches acides	Roches sédimentaires argileuses et sableuses	Grès	Carbonates
Cd	0,13-0,22	0,13	0,09-0,20	0,22-0,30	0,05	0,035
Co	35-50	1-10	1-7	11-20	0,3-10	0,1-3
Cr	170-200	15-50	4-25	60-100	20-40	5-16
Cu	60-120	15-80	10.30	40	5-30	2-10
Hg	0,0x	0,0x	0,08	0,18-0,40	0,04-0,10	0,04-0,05
Mn	1200-2000	500-1200	350-600	500-850	100-500	200-1000
Mo	1-1,5	0,6-1	1-2	0,7-2,6	0,2-0,8	0,16-0,40
Ni	130-160	5-55	5-15	50-70	5-20	7-20
Pb	3-8	12-15	15-24	18-25	5-10	3-10
V	200-250	30-100	40-90	100-130	10.60	10.45
Zn	80-120	40-100	40-60	80-120	15-30	10.25

- l'élément essentiel est impliqué directement dans le métabolisme de l'organisme, en tant que co-facteur d'enzyme par exemple, ou bien parce qu'il est nécessaire dans une réaction enzymatique.

Selon cette définition stricte, les éléments minéraux qui compensent les effets toxiques d'autres éléments ou qui remplacent des éléments minéraux dans certaines de leurs fonctions ne sont pas des éléments essentiels, mais plutôt bénéfiques. Les éléments essentiels et non essentiels peuvent devenir toxiques dès que leur concentration dans l'organisme dépasse une valeur seuil (Gough *et al.*, 1979), variable en fonction de la nature de l'élément et du tissus de l'organisme considéré. Selon l'importance de l'élément dans les besoins de la croissance, on distingue les macro-éléments et les micro-éléments.

Il est très difficile de généraliser le caractère essentiel des éléments minéraux pour la croissance des plantes, surtout lorsque l'on compare les plantes supérieures et inférieures (Marschner, 1995). Les éléments essentiels et bénéfiques chez les végétaux sont regroupés dans le tableau 2. Chez l'homme et les animaux, les éléments essentiels sont: As, Cl, Cu, Co, Cr, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se, Sn, V et Zn. Depuis 1970, plusieurs équipes ont mis en évidence le caractère indispensable de Si et Li chez les animaux et en particulier chez l'homme (Neuzil, 1990).

Les progrès croissants de la chimie analytique, et en particulier dans le domaine de la purification des composés chimiques, ont permis de dresser une première liste d'éléments essentiels qui évolue depuis le milieu du XIX^{ème} siècle, et qui devra inclure d'ici quelques années des éléments qui ne sont essentiels qu'en de très faibles concentrations.

1.2.1.3. Origine naturelle et anthropique des métaux lourds

A la différence des molécules de synthèse produites par l'homme, les métaux sont présents de façon naturelle et normale dans la croûte terrestre, combinés avec d'autres éléments pour former des composés chimiques stables. Le fond géochimique défini la teneur naturelle ou originelle en métaux trouvée dans le sol en l'absence de tout processus d'apport ou d'exportation vers ou hors d'un site considéré. Cette teneur dépend de la teneur dans la roche qui est à l'origine du sol, mais également des processus qui sont intervenus lors de la formation du sol, qui ont pu lessiver ou plus généralement concentrer le métal en question. Le tableau 3 reprend les principales données concernant le contenu en métaux dans différents types de roches. D'une manière générale parmi les roches sédimentaires, les roches argileuses ou les schistes sont les plus riches en métaux; pour les roches magmatiques, la richesse augmente en général lorsqu'on passe des roches acides aux roches basiques et ultrabasiques, mais les choses deviennent plus compliquées dès que l'on fait intervenir le métamorphisme ou le volcanisme (Robert, 1996). Une gamme de valeurs de concentrations en métaux couramment observées dans les sols en France a été répertoriée par Baize (1997) et est rapportée dans le tableau 4. Un sol peut être considéré comme pollué dès qu'il contient des concentrations en métaux supérieures aux valeurs couramment observées, indiquées dans le tableau 4. Cependant, la composition chimique initiale

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

Tableau 4. Gamme de valeurs "ordinaires" en métaux et d'anomalies naturelles mesurées en France.
Les teneurs totales en métaux dans les sols sont exprimées en mg/kg de terre fine (< 2 mm) (modifié, d'après Baize, 1997).

Métal	*Gamme de valeurs couramment observées dans les sols "ordinaires"*	*Gamme de valeurs observées dans le cas d'anomalies naturelles modérées*	*Gamme de valeurs observées dans le cas de fortes anomalies naturelles*
As	1 à 20	30 à 60	60 à 230
Cd	0,05 à 0,45	0,7 à 2	2 à 7
Cr	10 à 90	90 à 150	150 à 534
Co	2 à 23	23 à 90	105 à 148
Cu	2 à 20	20 à 62	-
Hg	0,02 à 0,2	0,2 à 0,45	-
Ni	2 à 60	60 à 130	130 à 480
Pb	9 à 50	60 à 90	100 à 3000
Se	0,1 à 0,7	0,8 à 2	2 à 4,5
Tl	0,1 à 1,7	2,5 à 4,4	7 à 55
Zn	10 à 100	100 à 250	250 à 3800

Tableau 5. Classification des pollutions anthropiques.
(modifié, d'après Bourrelier & Berthelin, 1998).

Origine	*Type*	*Pollution localisée*	*Pollution de proximité*	*Pollution à grande distance*
Industries	sites anciens	déchets	voie atmosphérique et aquatique	
	sites actuels	exceptionnellement déchets	voie atmosphérique, exceptionnellement aquatique	
Consommation	transport, vie urbaine, tourisme	déchets	voie atmosphérique et aquatique	voie atmosphérique (transport)
Mines		déchets et voie aquatique		
Agriculture		épandage, intrants et voie aquatique		

de la roche à partir de laquelle s'est formé le sol influe sa composition en métaux, ainsi il n'est pas toujours aisé de faire la part entre une contamination d'origine anthropique et un fond géochimique naturel.

Les métaux sont utilisés dans l'économie mondiale, et l'extraction et l'utilisation de matière première comme les combustibles fossiles ou les engrais interviennent comme source de contamination. Il est préférable d'employer le terme "contamination" quand il s'agit de désigner l'accroissement notable de la concentration d'un élément dans l'environnement, au-delà des valeurs auxquelles on le rencontre le plus fréquemment (Alloway, 1995). Le terme "pollution" quant à lui, désigne l'accumulation d'un composé lié à une activité anthropique et en quantité telle, que sa présence peut devenir un danger pour les organismes vivants ou compromettre l'usage qui est fait de l'environnement. Toutefois, le comité technique ISO/TC 190 s'est refusé à définir ces deux mots dans la norme ISO 11074-1 (AFNOR, 1997) sous le prétexte que ces mots étaient employés sans cohérence par divers experts d'un pays à l'autre et à l'intérieur d'un même pays.

Le développement intensif de:

- l'agriculture et de l'utilisation massive des engrais, des pesticides et de l'épandage de boues d'épuration,
- l'industrie et le rejet de poussières contenues dans les fumées émises, ou bien le rejet d'effluents liquides ou gazeux,
- l'urbanisation et les décharges de déchets urbains bruts, l'augmentation de la circulation automobile et de la combustion de sources d'énergie fossile,

ont conduit à une augmentation de la pollution par les métaux lourds. Il convient généralement de distinguer entre les pollutions locales, les pollutions de proximité et les pollutions à grande distance (Bourrelier & Berthelin, 1998). Les principales sources de pollution anthropiques sont récapitulées dans le tableau 5.

1.2.1.4. Sources et transport de métaux lourds dans l'environnement

1.2.1.4.1. Contaminations localisées et de proximité

Ce type de contaminations se produit, de façon intense, à des distances inférieures au kilomètre à partir des sources. Il s'agit essentiellement des sites des anciennes mines et usines désaffectées et de certaines décharges municipales, mais aussi des sites concernés par les pollutions de proximité souvent d'origine atmosphérique ou apportées par les eaux superficielles.

La contamination des sols situés à proximité de ces sites peut provenir des déchets, des envols de poussières (de par le stockage massif de déchets supposés inertes), et exceptionnellement des effluents liquides ou gazeux (souvent dus à des activités anciennes).

Tableau 6. Principales activités industrielles à l'origine des pollutions. (modifié, d'après Bourrelier & Berthelin, 1998).

Activités	*%*
Industrie des métaux ferreux	19,5
Industrie chimique, parachimique, pharmaceutique	16,9
Traitement et élimination des déchets	15,6
Autres	14,5
Industrie du pétrole et du gaz naturel	12,9
Cokéfaction et usines à gaz	12,0
Industrie des métaux non ferreux	6,0

Tableau 7. Nature des polluants présents dans les sites pollués. (modifié, d'après Bourrelier & Berthelin, 1998).

Polluants	*%*
Hydrocarbures	49
Plomb	20
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	19
Solvants halogénés	15
Chrome	15
Zinc	15
Cyanure	12
Cuivre	11
Arsenic	10
Nickel	8
Polychlorobiphénylés (ou terphényls)	7
Solvants non halogénés	7
Cadmium	7
Mercure	6

L'ADEME (Agence De l'Eau et de la Maîtrise de l'Energie) a établi à partir de la bibliographie une liste des principales activités industrielles à l'origine de pollutions résumée dans le tableau 6.

La métallurgie des métaux non ferreux et ferreux est à l'origine de l'existence des sites les plus nombreux et les plus pollués. Depuis 1994, le recensement de tous ces sites est obligatoire, et en 1996, la Direction de la Protection des Pollutions et des Risques du Ministère de l'Environnement recensait 896 sites pollués par une activité industrielle passée ou présente. Le tableau 7 indique le type des pollutions rencontrées lors de l'inventaire et le pourcentage du nombre de sites concernés pour chaque type. Parmi les métaux, le Pb, le Cr, le Zn et le Cu sont ceux qui sont rencontrés le plus fréquemment en abondance. Les données disponibles en ce qui concerne les sites pollués de nos voisins étrangers proviennent d'inventaires qui considèrent les sols suspectés et donc potentiellement mais pas toujours effectivement pollués (Tableau 8). La majorité de ces sites est affectée par des polluants organiques et minéraux.

– les sites de proximité d'activités industrielles et urbaines

Déchets de proximité

Les principales sources de contamination sont les suivantes:

- les déchets collectés ou sauvages: décharges de déchets urbains bruts et de déchets supposés inertes, contaminations accidentelles (accidents de transports, incendies),
- contamination en provenance des stations d'épuration des circuits d'eau pluviale, des eaux d'inondations...; pollution par voie hydrique à proximité des infrastructures de transport,
- dragage des sédiments des canaux et des ports.

La chasse est également une source importante de plombs de chasse dans les sols, les marais,...

Pollution par voie atmosphérique

La dispersion des métaux par cette voie peut intervenir sous la forme de fumées et d'envolements. Les activités supposées à l'origine de pollutions par voie atmosphérique sont: les usines d'incinération, les hauts-fourneaux, la combustion de charbon ou de pétrole. Depuis les années 1970, des filtres ont été mis au point afin de réduire les quantités de poussières présentes dans les fumées émises par ces activités industrielles.

Les envolements peuvent se produire à partir des stockages de matières telles que scories et concentrés ou des ateliers. La lutte contre ces envolements passe par des traitements de fixation par arrosage, obturation des ouvertures des ateliers,...

Tableau 8. Sites pollués recensés par différents pays.
La définition peut correspondre à des sites potentiellement ou effectivement pollués.
(modifié d'après Bourrelier & Berthelin, 1998).

Pays	*Année*	*Sites suspectés*	*Sites pollués*
Allemagne	1995	170 000	
Danemark	1996	11 000	3 332
Finlande	1996	10 400	
		25 000 avec PME	650
France	1996	200 000 à 250 000	896
Irlande	1993		< 1 000
Norvège	1996		2 452
Suède	1995	10 000	
Pays-Bas	1990		111 000

La pollution liée à la circulation automobile due à des retombées de Pb sous forme de tétraéthyle (essence) et de Cd (pneus) affecte une zone d'une vingtaine de mètres de part et d'autre de la chaussée. D'autre part, les eaux de ruissellement des chaussées urbaines et autoroutières sont également très chargées en polluants (Cathelain *et al.*, 1981).

– les sites miniers

Au niveau des zones de mines, les concentrations en métaux sont très importantes. Les risques principaux résultent de l'érosion et de la présence de sulfures (pyrites,...), qui sont les formes de minerais les plus exploitées. Lorsque ces composés exposés à l'air et à la pluie s'oxydent, il y a formation d'acide sulfurique dont l'effet acidifiant permet le transport à l'état dissous des métaux présents. De tels sites sont abondants en Europe Centrale et de l'Est.

1.2.1.4.2. Contamination liée aux pratiques agricoles

La contribution de l'agriculture à la contamination des sols en métaux lourds doit être considérée avec attention car:

- ce type d'activité concerne une grande superficie de notre territoire,
- la contamination éventuelle des sols agricoles est à la source d'une possible contamination de la chaîne alimentaire.

L'utilisation de matières fertilisantes peut accroître la richesse des sols en métaux. Les matières fertilisantes comprennent:

- les engrais,
- les amendements minéraux, dont les plus fréquemment employés sont utilisés pour lutter contre l'acidité anthropique et naturelle des sols et sont à base de carbonate de calcium. Les scories de déphosphoration ont également été utilisées dans les sols comme source de phosphore et de chaux. Les gisements de minerais phosphatés sont très souvent riches en métaux lourds, et beaucoup de ces métaux vont accompagner l'anion phosphate lors des étapes de sa concentration dans l'engrais qui sera ensuite commercialisé. C'est en particulier le cas du Cd.
- les amendements organiques d'origine agricole (fumiers, résidus de culture,...), qui participent de manière significative à la pollution métallique diffuse des sols en raison de leur emploi très fréquent en agriculture. C'est vrai, en particulier, pour le fumier de ferme et le lisier de porc (Coppenet, 1981; Arzul & Maguer, 1990),
- les amendements organiques d'origine urbaine, comme l'emploi des boues résiduaires en raison de leur teneur non négligeable en azote et phosphore. Cependant l'utilisation

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

de ces boues est freinée à cause de leur richesse en métaux lourds qui provient de leur accumulation lors du processus d'épuration de l'eau dans les stations. Les composts d'ordures ménagères sont également de moins en moins utilisés pour les amendements en raison de la forte hétérogénéité des déchets de consommation qui les composent, alors que les déchets verts occupent une place d'importance croissante.

- les produits phytosanitaires dont l'épandage concerne essentiellement les cultures d'arbres fruitiers et de vigne. Le Cu est le métal lourd qui a été le plus abondamment utilisé pour les traitements phytosanitaires, en particulier tous les vignobles ont reçu des traitements à base de bouillie bordelaise (sulfate de Cu et chaux). En général le Cu appliqué demeure fortement immobilisé en surface, même dans les sols à faible charge en colloïdes argileux comme ceux des Graves du Médoc (Delas, 1963). Cependant, le Cu peut perturber le fonctionnement de la microflore des sols de vigne (Chaussod, 1996).

1.2.1.4.3. Contaminations à grande distance

Le transport des polluants et la contamination à grande distance se produisent par deux voies prépondérantes: l'atmosphère (Nriagu & Pacyna, 1988) et les hydrosystèmes (Bourrelier & Berthelin, 1998). Ces contaminations concernent:

- les émissions industrielles de particules dans l'air ainsi que les rejets de polluants dans l'eau des rivières,

- les émissions urbaines, en particulier les particules émises par la circulation automobile et la combustion des substances fossiles. De plus, les études menées par Cathelain *et al.* (1981) ont montré que les eaux de ruissellement des chaussées urbaines et autoroutières étaient chargées en polluants, ainsi que les eaux de ruissellement des toits (généralement en Zn dans le cas de Paris).

Les sols apparaissent comme les récepteurs privilégiés des pollutions. Les métaux y existent sous forme liée aux particules de terre, dans la phase gazeuse et dans la phase aqueuse qui constituent autant de sources possibles à partir desquelles a lieu la pénétration dans les organismes.

1.2.1.5. Absorption des métaux lourds par les plantes et les champignons

1.2.1.5.1. Définitions

Les risques associés aux sols pollués, phytotoxicité et contamination de la chaîne alimentaire, sont étroitement liés à la biodisponibilité des métaux lourds. La phytodisponibilité peut être définie comme la quantité d'un élément donné qui peut être transférée dans la plante

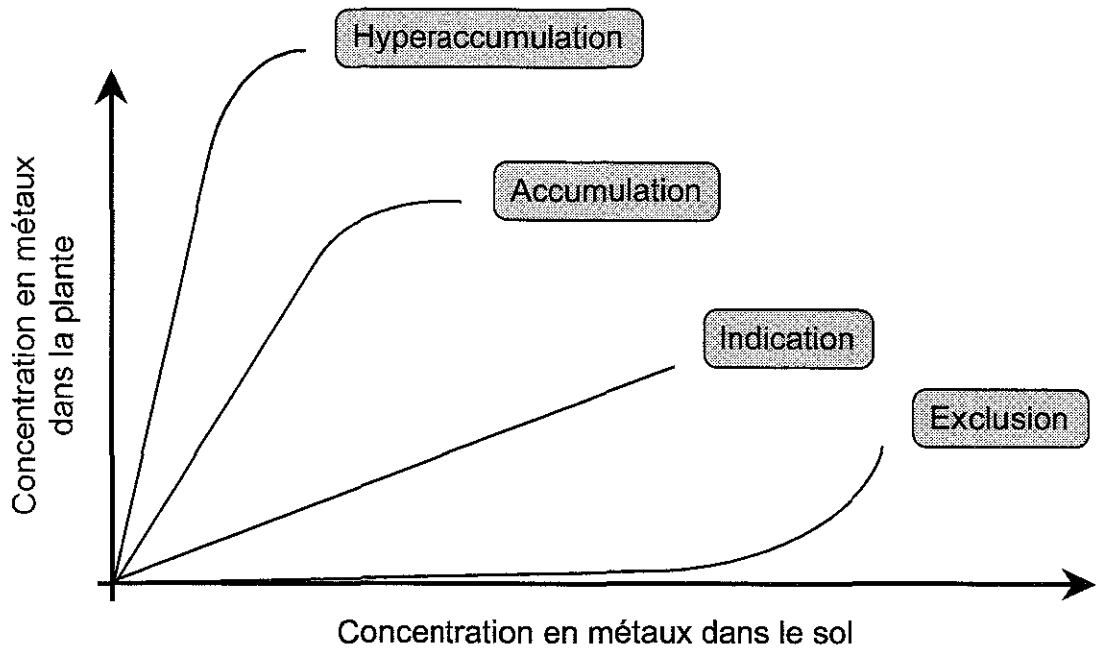


Figure 10. Les différentes réponses des plantes à l'accroissement de la concentration des métaux dans le sol (modifié d'après Baker, 1981).

Tableau 9. Concentrations en Cd, Cu, et Zn dans des plantes hyperaccumulatrices, des plantes indigènes et dans des carpophores récoltés sur sols pollués.
Références: a: Baker & Walker, 1990; b: Brown *et al.*, 1994; c: Pichtel *et al.*, 2000; d: Pichtel & Salt, 1998; e: Blaudez *et al.*, 2000c, non publié.

Métaux	*Concentrations en métaux (mg.kg^{-1} MS)*		
	Plantes hyperaccumulatrices	*Plantes issues de sites pollués*	*Carpophores*
Cd	*Thlaspi caerulescens*[a]	*Achillea millefolium*[c]	*Suillus luteus*[e]
	1800	10,6	13,2
Cu	*Ipomoea alpina*[a]	*Festuca ovina*[d]	*Lepista nuda*[e]
	12300	11,1	205,3
Zn	*T. caerulenscens*[b]	*Agrostis capillaris*[d]	*Rhizopogon roseolus*[e]
	51600	117.3	467

durant son développement. Dans un sol, la quantité phytodisponible d'un métal lourd donné, n'est pas la quantité totale de l'élément mais un ensemble d'ions qui ont la capacité à s'échanger avec les ions en solution (Morel, 1997). La phytodisponibilité est donc contrôlée par de nombreux facteurs liés au sol, à la plante, et aux conditions climatiques.

Le prélèvement des métaux est contrôlé par la demande des plantes, c'est-à-dire par leurs besoins et leur aptitude à prélever ou à exclure les éléments toxiques de leurs tissus. Les plantes diffèrent en fonction de leur capacité à absorber les métaux lourds et des différences considérables s'observent entre espèces. Les plantes peuvent être classées en quatre groupes en fonction des facteurs de transfert sol-plante des métaux lourds (teneur dans les tissus/teneur dans le sol) (Figure 10):

- les indicatrices,
- les "excluantes",
- les accumulatrices,
- les hyperaccumulatrices qui peuvent présenter des teneurs en métaux lourds supérieures à 1 %.

La concentration en métaux dans les plantes hyperaccumulatrices est généralement 50 à 100 fois plus élevée que dans les autres plantes et que dans les carpophores de champignons (Tableau 9). Les champignons accumulent au moins autant de Cd, de Cu et de Zn que des plantes issues de sols pollués qui n'ont pas le caractère d'hyperaccumulatrice.

La concentration des métaux dans les fructifications des champignons dépend de l'espèce considérée (Kalac & Svoboda, 2000). La composition du substrat est également un facteur important, mais il existe de grandes différences dans l'absorption des métaux pris isolément. Le Cd, le Hg et le Cu sont accumulés dans les fructifications, les niveaux de Zn et Mn sont comparables dans les fructifications et le substrat, alors que les concentrations en Pb et Fe sont plus faibles dans les fructifications que dans le substrat. Les facteurs de concentrations sont de 50-300 et 30-500 pour le Cd et Hg respectivement, alors qu'ils ne sont que de 10^{-1}-10^{-2} pour le Pb (Gast *et al.*, 1988; Seeger, 1982; Tyler, 1982). Le genre *Agaricus* semble capable d'accumuler le Cd car sa concentration peut atteindre 100-300 $mg.kg^{-1}$ (Kalac & Svoboda, 2000).

1.2.1.5.2. Les mécanismes d'absorption des métaux

La connaissance des mécanismes d'absorption des métaux essentiels et non essentiels a bénéficié des progrès énormes apportés par la complémentation fonctionnelle de souches de levure déficientes et un certain nombre d'ADNc codant des transporteurs de micro-éléments ont pu être clonés (Figure 11) (Clemens, 2001).

La protéine COPT1 d'*Arabidopsis thaliana*, capable de complémenter une souche mutée de *S. cerevisiae*, est supposée être un transporteur de Cu (Kampfenkel *et al.*, 1995). Toutefois,

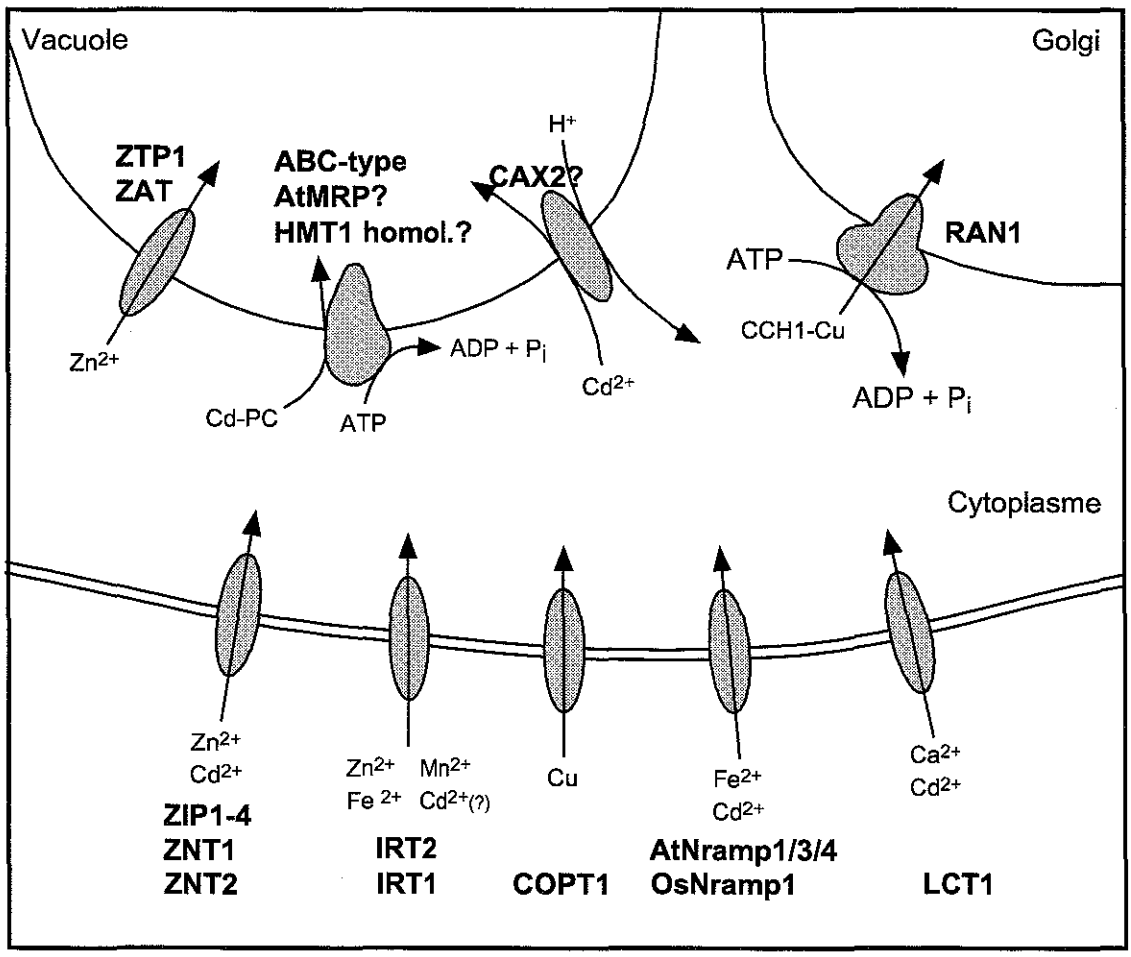


Figure 11. Transporteurs de métaux identifiés à ce jour chez les plantes.
(modifié d'après Clemens, 2001).

son ARNm n'a pas été détecté dans les tissus racinaires de la plante, et le transporteur de Cu à l'interface soil/racine reste à identifier.

– la famille ZIP

Un groupe de transporteurs appartenant à la famille ZIP (ZRT, *I*RT related *P*rotein) est impliqué dans l'absorption de Fe^{2+} et de Zn^{2+} (Fox & Guerinot, 1998). Le premier transporteur identifié est IRT1 d'*A. thaliana* (Eide *et al.*, 1996). Sa transcription est induite en conditions de carence en fer des racines d'*Arabidopsis*, ce qui en fait un bon candidat pour l'absorption de Fe^{2+} à partir de la solution du sol. Des études complémentaires ont montré que IRT1 est capable de transporter de nombreux cations parmi lesquels Mn^{2+}, Zn^{2+} et probablement Cd^{2+} (Korshunova *et al.*, 1999). Un deuxième transporteur de fer, IRT2, a été identifié chez *A. thaliana* (Vert *et al.*, 2001). Contrairement à IRT1, IRT2 ne transporte pas les cations Mn^{2+} et Cd^{2+}. Son expression a été détectée dans les racines d' *A. thaliana*, et est induite en conditions de carence en fer.

Les homologies de séquence avec IRT1 ont permis d'identifier ZRT1 et ZRT2 chez *S. cerevisiae*. Ces deux protéines sont des transporteurs de Zn^{2+} à forte et à faible affinité, respectivement (Zhao & Eide, 1996a, b). A partir de ces deux transporteurs isolés chez la levure, des souches double mutantes ont été générées, ce qui a permi le clonage par complémentation fonctionnelle de transporteurs de Zn^{2+} de plantes. Ainsi, les transporteurs ZIP1-3 d'*Arabidopsis* ont pu être isolés (Grotz *et al.*, 1998; Guerinot & Eide, 1999). *ZIP1* et *ZIP3* sont principalement exprimés au niveau des racines et sont induits en conditions de carence en Zn, ce qui suggère un rôle de ces transporteurs dans l'absorption du Zn de la solution du sol. A partir de la séquence génomique, un quatrième gène, *ZIP4*, a été identifié. Le taux de transcrits de *ZIP4* est élevé dans les partie aériennes et racinaires de plants carencés en Zn. Deux gènes impliqués dans l'absorption du Fe chez la tomate ont été isolés, LeIRT1 et LeIRT2 (Eckhardt *et al.*, 2001). Ces deux transporteurs sont capables de transporter différents cations parmi lesquels Cd^{2+}, Zn^{2+} et Ni^{2+}.

Les études concernant l'absorption de Zn chez deux espèces de *Thlaspi*, une hyperaccumulatrice (*T. caerulescens*), l'autre non (*T. arvense*), ont montré que les constantes d'affinité (K_m) n'étaient pas significativement différentes, mais que les vitesses maximales d'absorption (V_{max}) variaient d'un facteur 4,5. Ceci suggère que l'absorption de Zn est contrôlée par la régulation du nombre de transporteurs actifs au niveau de la membrane (Lasat *et al.*, 1996). Un transporteur de Zn (ZNT1) a été cloné chez *T. caerulescens* par complémentation fonctionnelle du double mutant de *S. cerevisiae*. ZNT1 est homologue à ZIP4 chez *Arabidopsis* (Pence *et al.*, 2000). Les analyses de type Northern révèlent un taux de transcrits élevé dans toutes les parties de *T. caerulescens*, en présence ou non de Zn dans le milieu de culture. Par comparaison avec le gène *ZIP4* d'Arabidopsis, il apparaît que l'expression de *ZNT1* quel que soit le statut en Zn peut en partie expliquer la capacité de *T. caerulescens* à accumuler du Zn. Assunção *et al.* (2001) ont cloné deux autres transporteurs chez *T. caerulescens*, ZNT2 qui est

homologue à ZNT1, et dont la fonction putative est de transporter le Zn; et ZTP1 qui est principalement exprimé dans les feuilles, mais aussi dans les racines, et qui serait impliqué dans la compartimentation interne du Zn, comme l'est son homologue ZAT chez *A. thaliana* (Van der Zaal *et al.*, 1999).

Plus récemment, un troisième transporteur de Zn, ZRT3, a été identifié chez *S. cerevisiae* (MacDiarmid *et al.*, 2000). ZRT3 serait impliqué dans la mobilisation du Zn stocké dans la vacuole, démontrant ainsi que les membres de la famille ZIP ne seraient pas uniquement impliqués dans l'absorption des ions métalliques (MacDiarmid *et al.*, 2000).

– la famille Nramp

Une autre famille de protéines apparaît comme étant importante dans l'absorption des métaux par les plantes, les transporteurs Nramp (*N*atural *r*esistance *a*ssociated *m*acrophage *p*roteins). Nramp1 a été identifié chez la souris (Vidal *et al.*, 1993), et depuis des séquences homologues ont été identifiée chez les bactéries, les champignons et les plantes. *S. cerevisiae* exprime deux protéines de la famille Nramp, SMF1 et SMF2 (Supek *et al.*, 1996) dont la fonction de transport du Mn^{2+} (Supek *et al.*, 1996), du Cu^{2+}, Co^{2+} et Cd^{2+} (Liu *et al.*, 1997), et plus récemment du Fe^{2+} (Chen *et al.*, 1999) a été démontré. La protéine BSD2 a été identifiée chez *S. cerevisiae*, et elle exerce un contrôle négatif sur les deux systèmes de transport SMF1 et SMF2 (Liu *et al.*, 1997). Une hypothèse serait que cette protéine BSD2 ait un rôle sensitif du contenu intracellulaire en métaux. En présence de Mn, BSD2 facilite le transit de SMF1 et SMF2 en direction de la vacuole où ces transporteurs seront dégradés. Cependant, en conditions limitantes en Mn, SMF1 est localisé à la surface cellulaire alors que SMF2 est localisé à la surface de vésicules intracellulaires (Portnoy *et al.*, 2000). Une troisième protéine SMF, SMF3 a été identifiée chez *S. cerevisiae*. SMF3 n'est pas régulée par BSD2, et n'est pas dégradée dans la vacuole comme les deux premières. SMF3 est localisée dans la membrane des vacuoles quelles que soient les conditions en Mn, et serait impliquée dans le transport des métaux de la vacuole vers le cytoplasme (Portnoy *et al.*, 2000).

Récemment, des transporteurs de cette famille ont été caractérisés chez le riz et chez *Arabidopsis*. Ils peuvent être répartis en deux classes définies à partir des comparaisons de séquence: AtNramp1 et OsNramp1-3 d'une part; AtNramp2-5 et OsNramp2 appartenant à l'autre classe (Curie *et al.*, 2000; Thiomine *et al.*, 2000). AtNramp1 complémente le double mutant de levure *fet3 fet4*, et est surexprimé en conditions limitantes en Fe. Il apparaît donc jouer une rôle dans l'homéostasie du Fe (Curie *et al.*, 2000). Les deux transporteurs AtNramp3 et AtNramp4 sont également induits en conditions de carence en fer (Thiomine *et al.*, 2000). L'analyse de AtNramp3 a montré que cette protéine est également impliquée dans l'absorption de Cd^{2+}.

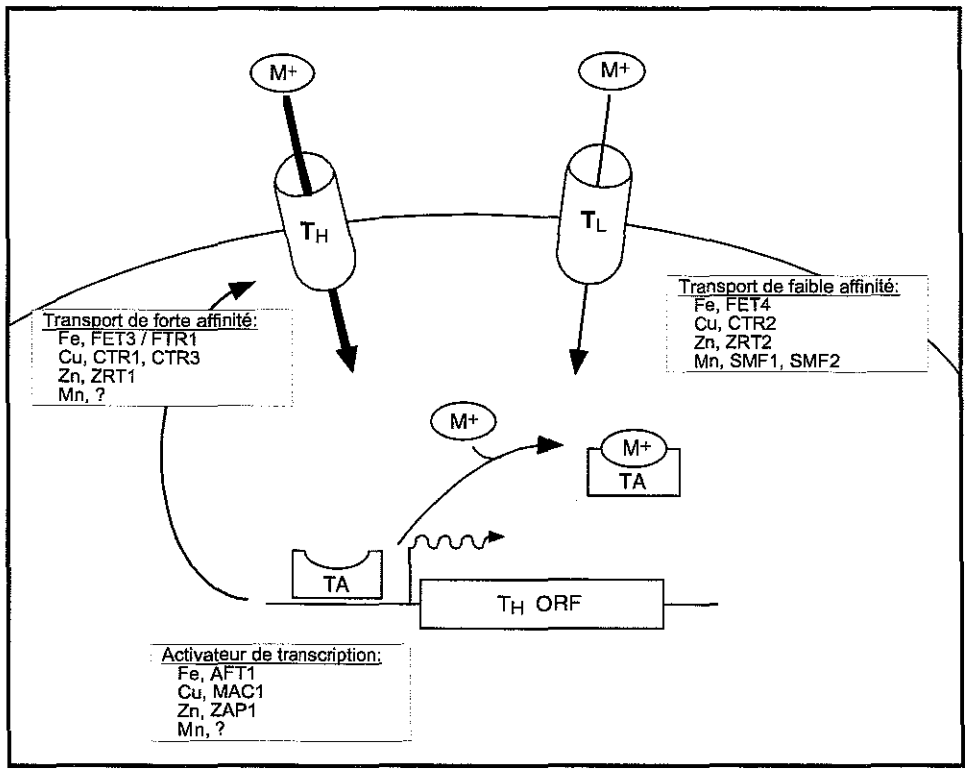


Figure 12. Modèle de régulation du transport des métaux dans la levure *S. cerevisiae*. (modifié d'après Radisky & Kaplan, 1999).

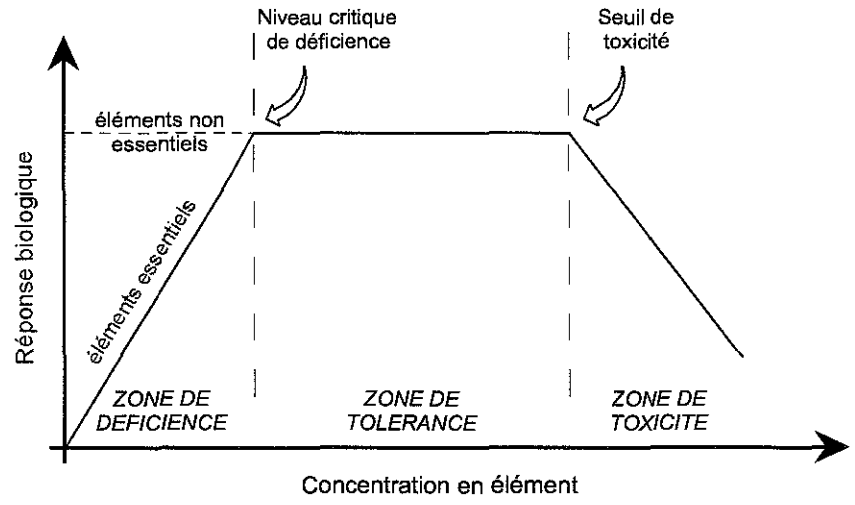


Figure 13. Courbe générale de la réponse "dose-effet biologique" pour illustrer les effets du changement des concentrations disponibles des éléments dans le sol sur la performance de la plante.

– absorption des métaux toxiques: Pb^{2+} et Cd^{2+}

Aucune fonction biologique n'est connue à ce jour en ce qui concerne les métaux toxiques que sont le plomb (Pb) et le cadmium (Cd), à l'exception chez les diatomées marines de l'anhydrase carbonique à Cd (Lane & Morel, 2000). De ce fait, il est peu probable d'identifier des transporteurs spécifiques de ces cations. Ces métaux sont vraisemblablement capables d'emprunter des transporteurs à large spécificité. En effet, il a été démontré qu'une carence en Fe conduit à une absorption accrue d'autres ions métalliques (Cohen *et al.*, 1998). Les protéines IRT1, ZNT1 et AtNramp3 peuvent transporter les ions Cd^{2+} (Korshunova *et al.*, 1999; Pence *et al.*, 2000, Thomine *et al.*, 2000). Le criblage, par expression hétérologue chez la levure, des ADNc codant des transporteurs de cations putatifs et l'étude de leurs effets sur la croissance des cellules en présence de Cd^{2+} a permi de montrer que la protéine LCT1 du blé confère aux levures une sensibilité accrue vis-à-vis du Cd^{2+} (Clemens *et al.*, 1998). Des études complémentaires ont montré que l'expression de LCT1 chez *S. cerevisiae* conduit à l'augmentation de l'absorption du Cd^{2+} et du Ca^{2+} (Clemens *et al.*, 1998).

Le premier exemple d'un transporteur de plante probablement impliqué dans l'absorption de Pb^{2+} a été décrit par Arazi *et al.* (1999). En surexprimant NtCBP4 (calmodulin-binding cyclic nucleotide-gated channel) localisée dans la membrane plasmique des plants de tabac, les auteurs ont pu montrer une sensibilité au Pb accrue, corrélée à une augmentation de l'accumulation de Pb dans les cellules.

Il apparaît que de nombreuses voies d'absorption existent pour la plupart des métaux. Il ressort des études menées chez la levure, que pour chaque métal essentiel il existe au moins deux systèmes de transport relativement spécifiques: des transporteurs de forte affinité spécifiques de leur cible et étroitement régulés en fonction des besoins en métal de la cellule, et des transporteurs de faible affinité qui répondent moins aux besoins en métaux et qui sont moins sélectifs quant aux métaux transportés. Ce double système d'absorption permet le maintien de l'homéostasie en métaux dans des conditions de carence ou d'excès de métal (Radisky & Kaplan, 1999). Les transporteurs identifiés chez la levure sont replacés sur la figure 12, et leur mode de régulation décrit. Les transports intracellulaires seront discutés au paragraphe 1.2.3.4.

1.2.1.6. Toxicité des métaux à l'échelle de l'organisme

1.2.1.6.1. La phytotoxicité

Les courbes dose/réponse des plantes aux métaux lourds sont de deux types (Figure 13). Pour les oligo-éléments, elles se présentent sous la forme classique en "cloche", qui identifie trois domaines de concentration dans les tissus, déficience, tolérance et toxicité. Pour les métaux pour lesquels aucune fonction physiologique n'a été démontrée, seules la tolérance et la toxicité sont observées. La présence dans les tissus de métaux non essentiels (Cd, Pb,...) est donc

Tableau 10. Identifications des dangers des métaux lourds pour la santé animale et humaine (modifié d'après Bourrelier & Berthelin, 1998).
H : Homme ; A : Animal ; * seulement pour la voie respiratoire.

	Toxicité d'organe	*Toxicité de reproduction*	*Mutagenèse*	*Cancérogenèse animale*	*Cancérogenèse humaine*	*Immunotoxicité*	*Biomarqueurs*
Pb	Neurotox. (H, A) Néphrotox. (H, A) Hématox. (H, A) Tox. Cardiovasc. (H, A) Ostéotox. (H)	Fertilité (H)	Clastogène	Reins Poumons Prostate Cerveau Surrénales	Possible (groupe 2)		Plombémie Pb phanères Protoporphyrine-Zn sanguine
Cd	Néphrotox. (H, A) Tox. Cardiovasc. (A) Ostéotox. (H, A)	Spermatogenèse (H)	Mutagène Aberrations chromosomiques		Cancérogène* (groupe 1)		Cadmiémie Cd urinaire β microglobuline urinaire
Ni	Néphrotox. (H, A) Tox. Respiratoire (H, A) Tox. cutanée	Embryotox. (A) Tératogenèse (A)	Mutagène Aberrations chromosomiques	Poumons Sarcomes Méningiomes Mésothéliomes	Cancérogène* (groupe 1)	Allergies cutanées	Ni plasmatique Ni urinaire
Cr	Lésions cutanées (H) Hépatotox. (A)	Fertilité (A)	Clastogène (Cr VI) Mutagène (Cr VI)	Bronches	Cancérogène* (groupe 1)	Allergies respiratoires	Cr sanguin Cr urinaire
Zn	Neurotox. (H) ? Cardiotox. (H) ?	Due à carence en Zn	non	non	non	Due à carence en Zn	Zincémie Zn leucocytaire Métallothionéine érythrocytaire
Hg et MeHg	Neurotox. (H, A) Néphrotox. (A, H ?)	MeHg fertilité Tératogenèse Anomalies du développement	Clastogène Aberrations chromosomiques Anti-mitotique	Reins Poumons Prostate	non		Mercurémie Hg phanères Hg urinaire

Clastogène: se dit d'un agent physique ou chimique susceptible de rompre un chromosome en plusieurs segments.
Tératogenèse: formation et développement embryonnaires d'anomalies conduisant à des monstruosités.

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

tolérée tant que le seuil de toxicité n'est pas atteint. A de très faibles concentrations dans le milieu, une stimulation de la croissance des plantes peut même être observée, mais sans que les mécanismes en cause soient identifiés (Bollard, 1983; Costa *et al.*, 1994; Echevarria *et al.*, 1995).

Quand la concentration d'un métal lourd quelconque dans les tissus atteint le seuil de toxicité, les fonctions physiologiques de la plante sont affectées et la croissance du végétal est ralentie. La chlorose et la nécrose, dues le plus souvent à une carence en fer par l'excès de métal, accompagnées d'une chute de rendement, sont les symptômes majeurs d'une toxicité due aux métaux. Des désordres du métabolisme peuvent se manifester avant même l'apparition de symptômes visuels, comme une réduction de la photosynthèse, l'activation des enzymes de stress. Ces effets des métaux lourds au niveau cellulaire seront exposés plus en détail dans la paragraphe 1.2.2.

1.2.1.6.2. La toxicité animale et humaine

Les connaissances sur les risques pour l'homme liés à la pollution des sols par les métaux sont fragmentaires. Le tableau 10 présente les différents types d'effets possibles sur l'homme et l'animal. Selon les métaux, la toxicité peut porter sur différents organes, sur la reproduction ou être du type cancérogène. Toutefois, ces effets toxiques dépendent étroitement de l'espèce considérée, de la voie et des niveaux d'exposition. Plusieurs éléments sont classés comme cancérogènes pour l'homme par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) (groupe 1: Cd, As, Ni, Cr) ou comme cancérogènes possibles pour l'homme (groupe 2: Pb).

Pour repérer l'importance relative des effets nocifs des métaux lourds dans les différents milieux et dans différents pays, y compris ceux qui appartiennent au tiers-monde, les principales données sont résumées dans le tableau 11. Les sources sont de plusieurs catégories: les émissions d'usines et de mines, la production agricole et la consommation. Le milieu aquatique est le milieu le plus souvent contaminé; l'air et le sol le sont pour le Pb et les contaminations multiples; et le sol pour le Cd. Ceci confirme que les sols ne sont pas des sources de contaminations aiguës pour les populations. La voie alimentaire est prépondérante dans les expositions: eau (As), poisson (Hg, métaux multiples), riz (Cd). La voie respiratoire est citée, mais il s'agit d'expositions professionnelles, en dehors du cas du Pb où elle est peut-être supposée intervenir. Les conséquences ne sont pas souvent identifiées de façon précise, en particulier lorsqu'il s'agit de la santé des populations. Les atteintes observées sur les écosystèmes concernent des zones à forte densité de populations multiples (zones industrielles vastes en Pologne et ancienne URSS, voisinages d'usines dans d'autres pays) et des zones marines souvent fermées (méditerranée, golfe Persique, baltique, antarctique).

En ce qui concerne les effets sur la santé, on peut mettre au premier rang:

- pour le Hg: la catastrophe de Minamata, des effets non quantifiés sur des populations dont la nourriture est à base de poisson;

Tableau 11. Catastrophes et menaces par contamination (modifié d'après Bourrelier & Berthelin, 1998).

	Contamination				*Conséquences*
Elément	*Localisation*	*Source*	*Milieu contaminé*	*Exposition Voie*	*Circonstances*
Hg	Japon Minamata	usine synthèse acétaldéhyde	Marin	alim./poisson	1953-70: plusieurs milliers de victimes
	Canada (indiens)	papeteries	Aquatique	alim./poisson	troubles, impact social
	Finlande	papeteries	Aquatique	alim./poisson	?
	Brésil Amazonie	production d'or	Aquatique	alim./poisson	récent. écosystèmes, victimes probables
	Tanzanie	production d'or	Aquatique	alim./poisson	
	Chine	?	Aquatique	alim.	victimes
	Pays nordiques	pollution diffuse	Aquatique		?
	Afrique du Sud	traitement des déchets	Professionnel	Respiration	récent. 99 décès
	Tous pays	amalgames dentaires			controversés
Pb	Tous pays développés grandes villes	essence, peintures canalisations	air, sol	Divers	Plombémie de nombreux enfants (millions), effet sur le développement du cerveau
	Australie	fonderies	air, sol	Divers	
	Serbie Kosovska	fonderies			
	Pays en développement (Inde, Tunisie, Sénégal)	fonderies	air	Respiration	Intoxication professionnelle
Cd	Japon Fuchu	usine métallurgique	Eau	Alimentation (riz)	Maladie itaï-itaï, une centaine de décès
	Pays divers		Sol	Alimentation	Malaise, troubles ?
	Tasmanie	déchets, engrais, phosphates ?		Alimentation	Malaise, troubles ?
As	Inde Calcutta	usine insecticides	Eau	Alimentation/eau	?
	Bengali	gisements naturels et agriculture	Eau	Alimentation/eau	
	Bangladesh	agriculture	Eau	Alimentation/eau	>100000 sérieusement intoxiqués
	USA		Eau	Alimentation/eau	intoxications chroniques ?
	Taïwan		Eau	Alimentation/eau	intoxications chroniques ?
	Japon		Eau	Alimentation/eau	intoxications chroniques ?
	Mexique		Eau	Alimentation/eau	intoxications chroniques ?
	France Salsigne		Eau	alimentation/eau	?

- pour le Pb: les effets sur les enfants en zone urbaine ou fortement contaminées;
- pour le Cd: des contaminations alimentaires au Japon et sans doute dans d'autres pays;
- pour l'As: la contamination de l'eau en Inde et au Bangladesh.

Tous ces accidents correspondent à une contamination du milieu aquatique ou du milieu urbain. Les autres cas correspondent plutôt à des risques ou des effets encore non caractérisés, voire controversés.

1.2.1.6.3. Toxicité pour les micro-organismes du sol

Les risques engendrés par les métaux dans les sols sont de trois ordres:

- des risques pour les organismes du sol intervenant dans le maintien de la fertilité du sol,
- une diminution de la biodiversité des organismes du sol (même ceux dont l'utilité n'est pas connue aujourd'hui),
- des risques de transfert, voire de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire "sauvage" (oiseaux, petits rongeurs,...).

L'impact des métaux lourds a été étudié sur les organismes symbiotiques fixateurs d'azote atmosphérique que sont les Rhizobia (McGrath *et al.*, 1995; Chaudri *et al.*, 2000; Simon, 2000). Les travaux de Chaudri *et al.* (2000) ont montré que la toxicité du Zn, qui est supérieure à celle du Cu, se traduit par une réduction du nombre de Rhizobia, et donc par conséquent par une diminution de rendement des pois associés. D'autre part, Simon (2000) a montré qu'en présence de Ni, les nodules ont perdu leur efficacité à fixer l'azote atmosphérique *via* la leghémoglobine, qui n'est plus active.

Des champignons appartenant aux principaux groupes taxonomiques sont présents sur des sites pollués et capables de croître normalement (Gadd, 1993; Roane & Pepper, 2000). En règle générale, les métaux toxiques affectent les populations fongiques en réduisant la diversité et l'abondance des espèces, et en exerçant une pression de sélection visant à favoriser les populations tolérantes (Babich & Stotzky, 1985; Duxbury, 1985, 1986; McGrath *et al.*, 1995; Roane & Pepper, 2000). Dans de telles situations, certains micro-organismes vont pouvoir profiter d'une sensibilité supérieure vis-à-vis des métaux de certains de leurs compétiteurs et ainsi proliférer (Duxbury, 1986). Cependant, la relation entre la diversité des espèces microbiennes et un stress métallique n'est pas aussi simple, et peut se rattacher à deux modèles (Giller *et al.*, 1998) (Figure 14):

- les effets d'un stress de plus en plus intense conduit à une diminution de la diversité microbienne (1);

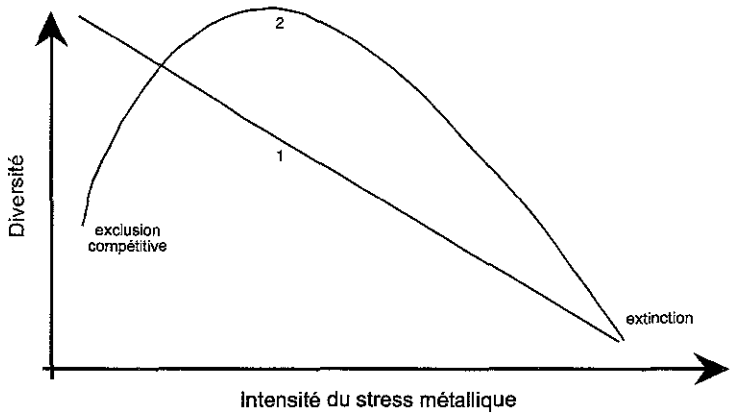


Figure 14. Deux modèles hypothétiques des effets d'un stress métallique sur la diversité (et par conséquent la fonction) d'une communauté de micro-organismes, ou d'une population d'espèces microbiennes (modifié d'après Giller *et al.*, 1998).

Tableau 12. Effets d'une pollution métallique sur la présence de fructifications d'espèces communes de champignons.
L'abondance est exprimée en nombre de parcelles où l'on trouve une espèce donnée, les parcelles sont divisées en trois classes selon leur contenu métallique (modifié d'après Rühling *et al.*, 1984).

Espèces	*Présence (nombre de parcelles)*		
	<600[a] *(n=18)*	*600-4000*[a] *(n=17)*	*>4000*[a] *(n=17)*
augmentant avec la pollution			
Laccaria laccata	9	8	16
diminuant avec la pollution			
Cortinarius flexipes	13	4	5
Lactarius rufus	7	2	2
Mycena epipterygia	14	10	1
Tricholoma portentosum	11	6	4
Russula foetens	14	8	3
non affectées par la pollution			
Amanita muscaria	15	11	16
Collybia cookei	3	5	4
Tricholoma imbricatum	6	3	5

[a]: Quantité de Cu dans la phase organique du sol (µg/g matière organique)

- lorsque le stress est modéré il se peut que des espèces bien adaptées dominent, ce qui se traduit par une faible diversité. Par contre lorsque l'intensité du stress augmente ces espèces pourraient perdre leurs avantages et d'autres pourraient proliférer (Austin & Smith, 1989), jusqu'à ce que l'intensité du stress soit trop importante et conduise à l'extinction des organismes et à une diminution de leur diversité (2).

La production de carpophores ainsi que le nombre et la composition en espèces sont fortement affectés par l'accumulation de métaux dans les sols (Rühling *et al.*, 1984). Le tableau 12 illustre l'effet d'une pollution métallique (Cu et Zn) sur la présence de carpophores d'espèces communes de champignons mycorhiziens. Alors que certaines espèces sont de moins en moins présentes lorsque le degré de pollution augmente, d'autres ne sont pas affectées voire sont de plus en plus présentes. Une réduction générale du nombre de champignons a souvent été remarquée dans les sols pollués au Cu, Cd, Pb, As et Zn (Babich & Stotzky, 1985). Dans des sols pollués par de la poussière de Cd, les Basidiomycètes les plus communs étaient *Strobilurus tenacellus*, *Mycena ammoniaca*, *Auriscalpium vulgare* et *Armillaria lutea* (Turnau, 1991).

Cependant, les effets des métaux toxiques sur les micro-organismes dans les habitats naturels varient avec le métal considéré, les organismes présents et les facteurs environnementaux (Gadd, 1993).

1.2.2. Toxicité des métaux lourds au niveau cellulaire

La toxicité des métaux est principalement due à leur forte capacité de coordination (Ochiai, 1987). Les effets toxiques regroupent le blocage de groupes fonctionnels de molécules biologiques importantes; le déplacement et/ou le remplacement d'ions essentiels dans les biomolécules; le changement conformationnel, la dénaturation et l'inactivation d'enzymes et la disruption des membranes cellulaires et organellaires (Ochiai, 1987). Une condition préalable à la toxicité d'un métal est le contact entre ce métal et les composantes cellulaires (Gadd & White, 1989). Il apparaît donc clairement que la membrane cellulaire est le site d'action initial pour un métal toxique.

Les mécanismes indirects de la toxicité des métaux peuvent impliquer les radicaux libres qui prennent part à des réactions en chaîne conduisant à la destruction de macromolécules biologiques. Toutefois, les organismes aérobies possèdent un équipement enzymatique pour contrecarrer ces effets telles les superoxydes dismutases qui éliminent les radicaux superoxydes produits par le métabolisme normal de la cellule. Les cibles majeures des cellules sont les membranes au niveau desquelles la peroxydation des lipides, par laquelle les chaînes alkyles des lipides sont converties en radicaux peroxyalkyles et en acides gras hydroperoxydes, est initiée (Mehlhorn, 1986). Dans les systèmes animaux, certains ions métalliques (tels que Hg^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}) induisent une toxicité *via* les radicaux libres résultants de leur réaction avec les groupements thiols ou les enzymes qui protègent normalement de ces espèces réactives de

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

l'oxygène (Mehlhorn, 1986). Cependant peu de travaux ont été réalisés sur cet aspect avec les champignons, excepté pour le Cu et *S. cerevisiae* (Greco *et al.*, 1990).

1.2.2.1. L'altération des membranes cellulaires

Un important effet des métaux au niveau cellulaire est l'altération de la perméabilité de la membrane plasmique, conduisant à une fuite d'ions (principalement K^+) ou d'autres solutés (Vangronsveld & Clijsters, 1994). Deux principaux mécanismes sont généralement proposés pour être à l'origine des modifications induites au niveau de la membrane: des interactions avec les groupements thiols des constituants de la membrane et un effet direct ou indirect *via* les radicaux libres sur la peroxydation des lipides.

1.2.2.1.1. Interaction avec les groupements thiols

Les métaux ont une forte affinité pour les groupements thiols et carboxyles, cette affinité dépendant des propriétés physico-chimiques du cation considéré. Chez l'algue verte *Chlorella*, la capacité des métaux à induire une fuite de potassium est fortement corrélée à la force de la liaison qui s'établit entre le métal et le groupement thiol (De Filippis, 1979). Chez les plantes supérieures, les ATPases plasmalemmiques impliquées dans la perméabilité membranaire sont très sensibles aux métaux qui vont pouvoir réagir avec les groupements thiols (Kennedy & Gonsalves, 1989). Lindberg & Wingstrand (1985) ont démontré *in vitro* que le Cd inhibe de façon compétitive les ATPases magnésium-dépendante en formant un complexe avec l'ATP, privant ainsi l'enzyme de son substrat. L'inhibition de ces ATPases peut affecter l'efflux d'ions H^+, ainsi que le potentiel transmembranaire comme cela a été démontré chez le maïs (Kennedy & Gonsalves, 1989).

1.2.2.1.2. Peroxydation des lipides

La production de radicaux libres réactifs est à l'origine de la peroxydation des lipides qui va modifier le fonctionnement des biomembranes. Les radicaux peuvent être définis comme des espèces ayant un ou plusieurs électrons non-appariés, ils peuvent être petits et diffusibles (radicaux "libres") ou gros et donc plutôt immobiles dans les constituants cellulaires comme les membranes par exemple. Dans les conditions naturelles, les radicaux libres de l'oxygène représentent la plus grande proportion des radicaux libres formés dans les cellules aérobies. La réduction de l'oxygène en eau par le transfert d'un seul ou plusieurs électrons est à l'origine de ces radicaux. Ces formes dérivent de l'oxygène (O_2) par réduction électronique univalente (l'anion superoxyde $O_2^{-\cdot}$), divalente (peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée H_2O_2), ou trivalente (radical hydroxyle $OH^{\cdot}$). Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent être extrêmement toxiques pour la cellule puisqu'elles peuvent s'attaquer aux acides aminés, aux protéines, aux sucres, aux acides nucléiques et aux lipides. Au niveau des membranes biologiques, la

peroxydation des lipides est une réaction très destructrice qui induit une transition dans la phase lipidique et augmente la perméabilité membranaire (Pauls & Thompson, 1981) conduisant à une désorganisation cellulaire. Le radical libre hydroxyle ($OH^{\cdot}$) peut initier le processus de peroxydation membranaire: les acides gras insaturés des membranes sont transformés en produits comportant des radicaux et des groupements hydroperoxydes qui, à leur tour, vont favoriser les réactions en chaîne des radicaux libres avec d'autres constituants cellulaires (Kappus, 1985). Ces dommages cellulaires causés par les radicaux réactifs de l'oxygène sont regroupés sous le terme de "stress oxydatif" (Sies, 1985).

Dans les conditions naturelles, les espèces réactives de l'oxygène sont générées à un faible taux. Cependant, les cellules disposent d'un système efficace de protection antioxydatif qui consiste en des réactions enzymatiques et non enzymatiques. Ces réactions seront détaillées dans le paragraphe des mécanismes de défense (1.2.3.8.).

Les métaux peuvent induire une peroxydation des lipides membranaires et un stress oxydatif directement ou indirectement. Les effets indirects des dommages aux membranes proviennent très souvent de l'interaction des métaux avec les réactions rédox. Certains métaux comme le fer et le Cu peuvent interagir avec les réactions rédox ou bien générer des radicaux libres réactifs tels $O_2^{\cdot-}$ (Kumar *et al.*, 1978), H_2O_2 (Freedman *et al.*, 1989), l'oxygène singulet $O_2^{\cdot}$ (Ding & Chan, 1984), et les radicaux libres lipidiques (Chan *et al.*, 1982). Par conséquent, la toxicité de ces métaux peut être attribuée à une production accrue de radicaux libres dans les cellules conduisant à un stress oxydatif (Vangronsveld & Clijsters, 1994). Cette formation de radicaux libres peut être amplifiée par une déplétion en thiols tel le glutathion. Certains métaux peuvent former des complexes stables avec le glutathion, perturbant ainsi l'interconversion des formes oxydées et réduites. Cette complexation conduisant à un affaiblissement du système de défense cellulaire contre les radicaux libres (Christie & Costa, 1984).

Toutefois, la désintégration des membranes biologiques par peroxydation des lipides n'est pas spécifique de la toxicité des métaux, mais est un processus général qui peut être la conséquence d'autres facteurs de stress comme la pollution atmosphérique (Chia *et al.*, 1984; Elstner, 1984) et les herbicides (Schmidt & Kunert, 1986). Cependant, l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique est considérée comme le premier effet toxique des métaux au niveau cellulaire.

1.2.2.2. L'inhibition de la photosynthèse

De nombreuses enzymes sont inhibées par les métaux. La forte affinité des métaux pour les groupements thiols est supposée être un des principaux mécanismes de l'inhibition enzymatique. Parmi les processus métaboliques de la cellule, la photosynthèse est probablement celui qui est le plus sensible aux métaux.

1.2.2.2.1. Inhibition de la biosynthèse des chlorophylles

L'inhibition de la biosynthèse des chlorophylles a été décrite chez les plantes supérieures (Baszynsky *et al.*, 1980; Stobart *et al.*, 1985; Prassad & Prassad, 1987; Somashekaraiah *et al.*, 1992; Rama Devi & Prasad, 1998; Ghorbanli *et al.*, 1999) ainsi que chez les algues (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

Ces études montrent que deux enzymes de cette voie de synthèse sont sensibles aux métaux, il s'agit de l'acide δ-aminolaevulinique (ALA)-déshydratase (EC 4.2.1.24) et de la protochlorophyllide réductase. L'inhibition de l'ALA-déshydratase par le Hg et le Pb est la conséquence de l'interaction de ces métaux avec les groupements fonctionnels thiols de cette enzyme (Prassad & Prassad, 1987). D'autre part, cette enzyme contient du Zn comme cofacteur métallique essentiel à son activité; par conséquent les métaux qui auront une action soit au niveau de l'absorption de Zn, ou bien qui se substitueront au Zn au niveau de son site de fixation, pourront entraîner une diminution de l'activité de l'enzyme et une réduction du contenu en chlorophylle de l'organisme (Vangronsveld & Clijsters, 1994). L'inhibition de la protochlorophyllide réductase de l'orge par le Cd est due à son interaction avec les groupements thiols de l'enzyme qui sont impliqués dans la formation des complexes enzyme-substrat-NADPH (Stobart *et al.*, 1985).

1.2.2.2.2. Inhibition du transport d'électrons photosynthétique et de la photophosphorylation

De nombreux résultats disponibles sont issus d'expériences *in vitro*, concernant les effets des métaux sur des chloroplastes isolés (Clijsters & Van Assche, 1985). Tous les métaux étudiés sont des inhibiteurs potentiels du photosystème II, le photosystème I est quant à lui moins sensible aux métaux. Au moins deux sites sensibles aux métaux ont été identifiés dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques: l'enzyme responsable de la photolyse de l'eau, et la NADPH-oxydoréductase. D'autre part, la photophosphorylation non cyclique est très sensible au Cu et au Cd par exemple.

Par contre, les données issues d'expériences *in vivo*, concernant les effets des métaux sur des plantes entières, sont plus rares. Toutefois, l'activité du photosystème II est inhibée par de nombreux métaux lourds (Vangronsveld & Clijsters, 1994), avec en dénominateur commun l'enzyme de photolyse de l'eau, qui a été identifiée comme site d'action. L'ion manganèse est essentiel pour une activité efficace de cette enzyme, et une substitution partielle de ce manganèse par des métaux lourds serait à l'origine de l'inhibition de la photolyse de l'eau. Aucune inhibition du transport d'électrons du photosystème I n'a été rapportée chez les plantes supérieures. Par contre chez les algues vertes, la diminution de la capacité photosynthétique est due à la fois à une inhibition de l'enzyme de la photolyse de l'eau, mais aussi de la NADPH-oxydoréductase (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

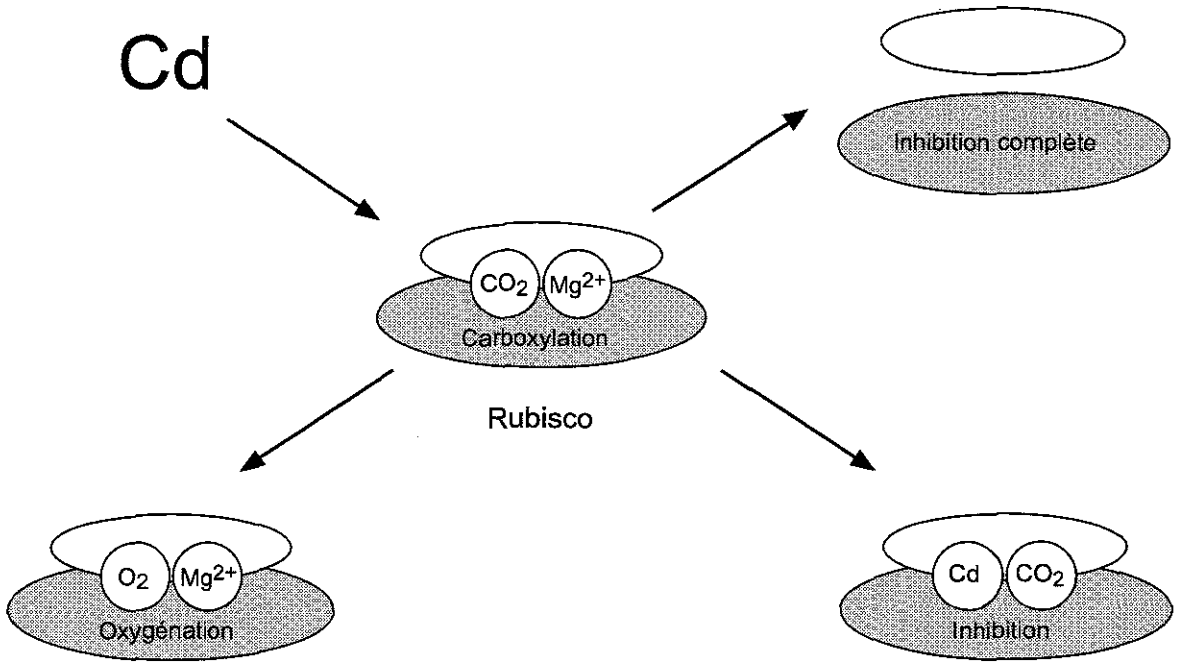


Figure 15. Influence du Cd sur l'activité Rubisco des plantes en C3.
(modifié d'après Siedlecka *et al.*, 1998).

L'inhibition du transport d'électrons a pour conséquence la réduction de la production d'ATP photosynthétique (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

1.2.2.2.3. Inhibition de la fixation du CO_2

De nombreuses études ont montré une inhibition de la fixation de CO_2 due aux métaux lourds (Vangronsveld & Clijsters, 1994, Di Cagno *et al.*, 1999; Ghorbanli *et al.*, 1999). Le premier effet négatif sur la photosynthèse qui a été proposé était la fermeture des stomates induite par les métaux lourds. L'inhibition de la transpiration par différents métaux a été largement étudiée (Poschenrieder *et al.*, 1989), mais elle ne se situe pas nécessairement au niveau stomatique. La fermeture des stomates induite par les métaux peut être indirectement responsable d'une diminution de la fixation du CO_2. Cependant, les métaux peuvent agir directement sur plusieurs enzymes du cycle de Calvin.

Weigel (1985a, b) a montré que le Cd inhibe la photosynthèse en interagissant à différents endroits du cycle de Calvin, et non pas en interagissant avec les réactions photochimiques qui ont lieu au niveau de la membrane du thylakoïde. Le Cd inhibe plus particulièrement les trois enzymes suivantes: la phosphoribulokinase (EC 2.7.1.18), la glycéraldéhyde-3-phosphate kinase (EC 1.2.1.13) et la ribulose-5-phosphate kinase (EC 2.7.1.19).

La majorité des effets des métaux sur les enzymes liées au cycle de Calvin portent sur une enzyme clé, la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase ou RubisCo (EC 4.1.1.39). Les cations divalents Mg^{2+} jouent un rôle majeur dans l'activation de la RubisCo. La fixation du magnésium dans le complexe enzyme-CO_2-métal est très facilement réversible, et des cations de type Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} peuvent se substituer au magnésium, en ayant pour conséquence une inhibition de l'activité carboxylase de l'enzyme (Figure 15). Toutefois, le Zn est le seul cation à être présent en concentration comparable à celle du magnésium au niveau des chloroplastes. Il apparaît donc que la substitution du magnésium au niveau de la RubisCo des plantes supérieures ne soit possible que par le Zn (Van Assche & Clijsters, 1990). Le Cd, le Cu, le Pb et à un degré moindre le Zn peuvent inhiber l'activité de la RubisCo en interagissant avec les deux groupements thiols des cystéines 172 et 456, essentiels pour l'activité de l'enzyme et situés dans son site actif (Stiborova *et al.*, 1988). En particulier le Cd se fixerait de manière irréversible sur les groupements thiols impliqués dans la stabilisation de la structure quaternaire de l'enzyme. Cette modification résulterait en une dissociation irréversible, et par conséquent en une perte de l'activité de l'enzyme (Siedlecka *et al.*, 1998). Le Cd peut également induire le remplacement de la fonction de carboxylation de la RubisCo par une fonction d'oxygénation (Siedlecka *et al.*, 1998) (Figure 15). Il se pourrait également que les métaux n'interagissent pas directement avec l'enzyme, mais plutôt que la synthèse protéique *de novo* soit inhibée, ce qui conduirait à une déficience en enzyme. Mais les données sur ce point sont encore contradictoires (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

1.2.2.3. Effet inhibiteur sur certaines enzymes

On peut distinguer deux mécanismes majeurs à l'origine de l'inhibition de certaines enzymes par les métaux:

- l'interaction des métaux avec les groupements fonctionnels des enzymes, par exemple l'interaction avec les groupements thiols impliqués dans l'activité catalytique et/ou l'intégrité structurale des enzymes,
- l'induction d'une déficience en métaux nécessaires en tant que co-facteurs enzymatiques, et la substitution par le métal toxique du métal essentiel dans le complexe enzymatique.

Pour que les métaux interagissent avec les enzymes *in vivo*, plusieurs conditions doivent être remplies (Vangronsveld & Clijsters, 1994):

- le métal considéré doit s'accumuler sous une forme active permettant l'interaction avec l'enzyme, et à une concentration inhibitrice dans le même compartiment cellulaire que celui où est localisée l'enzyme,
- l'affinité du métal pour les groupements thiols doit être forte, surtout si cette interaction est à l'origine du mécanisme d'inhibition,
- la concentration en métal doit être comparable à celle du métal actif lorsque l'inhibition de l'enzyme est due à une substitution ou à une compétition pour le même site de fixation.

1.2.2.4. Interaction des métaux avec les acides nucléiques

La plupart des résultats concernant les interactions des métaux avec les acides nucléiques et leur métabolisme porte sur les bactéries et les animaux. Peu de données sont disponibles en ce qui concerne les plantes supérieures et les champignons.

En général, les métaux peuvent interagir directement ou indirectement avec les acides nucléiques. Les nombreux centres nucléophiles des acides nucléiques sont des sites de fixation privilégiés pour les ions métalliques. Les métaux peuvent induire des appariements entre les deux brins de l'ADN, provoquer des cassures de l'ADN simple brin, ainsi que la formation de complexes avec l'ADN (Vangronsveld & Clijsters, 1994). Des réactions similaires peuvent avoir lieu entre les métaux et les ARN, qui se traduisent par l'altération de leurs fonctions spécifiques. Le Cd, le nickel (Ni) et le chrome peuvent induire une dépurination de l'ADN qui peut avoir des effets mutagènes (Schaaper *et al.*, 1987). Les radicaux libres de l'oxygène générés par les métaux peuvent également induire des cassures dans les brins d'ADN, ainsi que leur dégradation (Halliwell & Gutteridge, 1984).

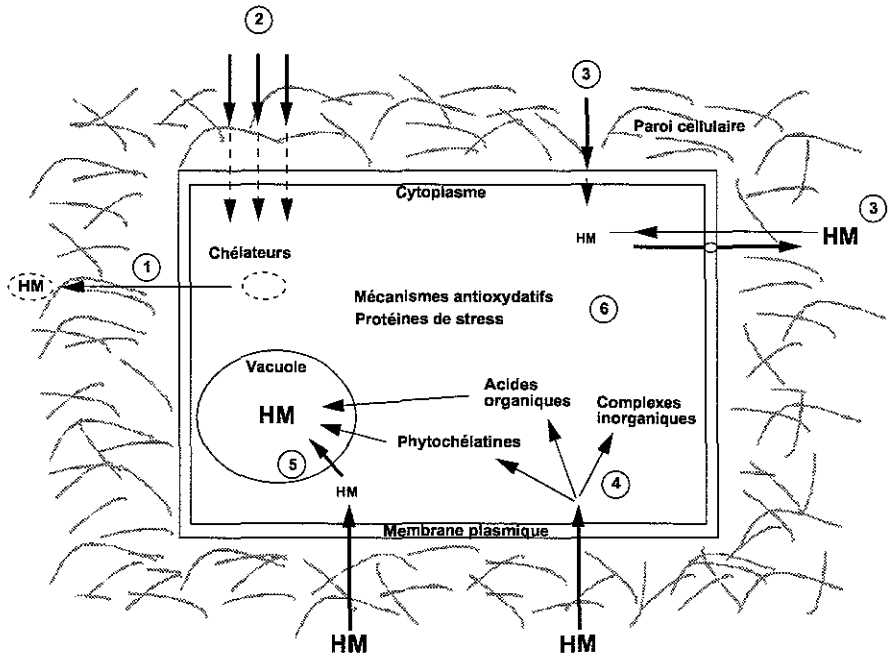


Figure 16. Mécanismes de la tolérance aux métaux lourds chez les plantes (modifié d'après Marschner, 1995).
(1) Complexation et précipitation extracellulaire. (2) Fixation aux parois cellulaires. (3) Transport des métaux. (4) Chélation dans le cytoplasme. (5) Compartimentation vacuolaire. (6) Systèmes de détoxication antioxydatifs et impliquant les protéines de stress.

Les métaux peuvent également agir sur le fonctionnement d'enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et ainsi conduire indirectement à une altération de l'information génétique en influant sur la fidélité de la réplication.

Il a été montré que l'activité d'enzymes hydrolytiques comme les ribonucléases et les désoxyribonucléases augmentent lorsque du Cd est apporté à de jeunes pousses de soja. Ces effets sont considérés comme les symptômes de la sénescence accélérée due au Cd (Lee *et al.*, 1976).

1.2.3. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds

La survie d'organismes en présence de métaux toxiques dépend principalement de leurs propriétés biochimiques et structurales intrinsèques, ainsi que de leur adaptation physiologique et/ou génétique (Gadd, 1993). Cette survie n'est possible, en effet, que par la mise en jeu de mécanismes de tolérance aux métaux lourds, dont les principaux, connus chez les plantes et les champignons, sont présentés dans la figure 16. Après avoir défini les termes de résistance et de tolérance, nous détaillerons ces différents mécanismes.

1.2.3.1. Résistance et tolérance

Les termes arbitraires de "tolérance" et "résistance" sont utilisés de façon interchangeable et sans claire distinction dans la littérature, et sont souvent basés sur les capacités d'un organisme à croître sur un milieu de culture contenant une concentration donnée en métal (Gadd, 1992a, b). Le terme de "résistance" peut être défini comme la capacité d'un organisme à survivre aux effets toxiques des métaux par la mise en œuvre d'un mécanisme de détoxication en réponse directe à l'espèce métallique concernée (synthèse de métallothionéines par exemple) (Gadd, 1993). La "tolérance" à un métal peut être définie comme la capacité d'un organisme à survivre à la toxicité des métaux par le moyen de propriétés intrinsèques et/ou de la modification de la toxicité par des paramètres environnementaux (possession de parois cellulaires pigmentées imperméables,...) (Gadd, 1993). De tels mécanismes sont aussi appelés des "mécanismes gratuits de résistance" (Gadd & Griffiths, 1978). Cependant, la distinction est toujours difficile à faire en raison de l'implication de mécanismes biologiques et physico-chimiques directs et indirects pour la survie de l'organisme (Gadd, 1993).

1.2.3.2. Complexation et précipitation extracellulaire

De nombreux composés extracellulaires peuvent se complexer ou précipiter avec les métaux lourds. Le mécanisme essentiel par lequel les plantes sont capables de tolérer les métaux et de supporter des stress nutritionnels se situe au niveau de l'interface sol-plante et implique l'excrétion d'acides organiques (López-Bucio *et al.*, 2000). Les exsudats racinaires contiennent des composés jouant un rôle important dans la solubilisation des nutriments (par exemple, les

acides organiques, les composés phénoliques), dans la restriction de l'absorption de métaux toxiques par les racines (par exemple, le citrate, le malate, l'oxalate) et dans le tropisme de micro-organismes favorables (par exemple, les composés phénoliques, les acides organiques et les sucres). Souvent, l'excrétion de ces molécules organiques augmente en réponse à un stress provenant du sol (Herrera-Estrella *et al.*, 1999). Hue *et al.* (1986) ont montré que les acides dicarboxyliques (oxalate, succinate) ont une capacité de détoxication de l'Al supérieure aux acides monocarboxyliques (pyruvate, glycolate). Le rôle des acides organiques en tant qu'agents de détoxication a été passé en revue par Jones (1998).

L'excrétion d'acides organiques par des plantes résistantes à l'Al en réponse à un stress Al est bien établie (Delhaize *et al.*, 1993; Miyasaka *et al.*, 1991; Pellet *et al.*, 1995). L'aluminium induit la production d'acide oxalique (Ma *et al.*, 1997a; Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000), d'acide malique (Pellet *et al.*, 1997) et d'acide citrique (Pellet *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997b). Le rôle du malate dans la tolérance à l'Al serait d'inhiber le blocage des canaux calciques au niveau de la membrane plasmique (Huang *et al.*, 1996). L'acide citrique s'est révélé être un bon chélateur de l'Al, il diminuerait ainsi sa toxicité (Jones & Darrah, 1994). Des productions différentes d'acide oxalique ont été observées chez différentes espèces de champignons ectomycorhiziens et pour une même espèce entre différentes souches (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000). Toutefois, la relation entre la production d'acide oxalique et la tolérance à l'Al reste à démontrer.

Plus généralement, les acides organiques pourraient jouer un rôle dans la tolérance vis-à-vis des métaux lourds, comme cela a été suggéré pour le citrate et le Zn (Godbold *et al.*, 1984) et pour le malate et le Ni (Yang *et al.*, 1997). Le Cd augmente la production d'oxalate par les racines de pins quel que soit leur statut mycorhizien ou l'espèce fongique considérée (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000). L'oxalate pourrait aussi chélater le Cu en formant des cristaux de Cu-oxalate comme cela a été démontré pour des champignons saprophytes (Dutton & Evans, 1996).

Comme nous le verrons par la suite, certains composés de la paroi cellulaire, comme les mélanines, peuvent exister sous forme extracellulaire. Nous détaillerons ces composés dans le paragraphe suivant. Certaines levures sont capables de produire de l'hydrogène sulfuré (H_2S) qui va provoquer la précipitation des métaux sous forme de sulfides insolubles autour des parois cellulaires (Gadd, 1993).

1.2.3.3. La fixation aux parois cellulaires

Les parois cellulaires sont le premier site d'interaction avec les espèces métalliques. Cette association des espèces métalliques aux parois fongiques peut être mise en œuvre par échange ionique, adsorption, complexation, précipitation et cristallisation (Mullen *et al.*, 1992). Ces interactions physico-chimiques entre les métaux et la biomasse microbienne porte le nom de "biosorption" (Gadd, 1993). La paroi des cellules fongiques joue donc un rôle de protection et agit telle une barrière contrôlant l'absorption des solutés (essentiels et/ou toxiques) dans la cellule (Ono *et al.*, 1988), et modifie indirectement la composition ionique intracellulaire en

interagissant avec l'état hydrique de la cellule (Peberdy, 1990). Les parois fongiques sont essentiellement composées de polysaccharides (certains d'entre eux associés à des protéines), de lipides, de mélanines, de chitine. Il apparaît donc que la biosorption des métaux sur les parois cellulaires fongiques est un phénomène complexe faisant appel à différents composants et différents mécanismes (Gadd, 1993). De nombreux sites peuvent être impliqués dans la séquestration des métaux comme les groupes carboxyles, amines, hydroxyles, phosphates et thiols, mais leur importance relative est souvent difficile à résoudre (Strandberg *et al.*, 1981).

La biosorption indépendante du métabolisme est souvent rapide et non affectée par la température dans une gamme allant de 4 à 30°C (Gadd, 1993). Chez le champignon *Rhizopus arrhizus*, la biosorption est dépendante du rayon ionique (Tobin *et al.*, 1984). Un pH extracellulaire bas diminue souvent la biosorption de certains ions comme, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+} (Gadd, 1993). D'autres anions et cations peuvent avoir le même effet en piégeant les métaux dans la solution, ou bien en entrant en compétition pour les sites de fixation au niveau des parois (Tobin *et al.*, 1987, 1988, Gadd, 1990). La concentration en biomasse fongique peut également modifier la biosorption. En règle générale, pour une concentration donnée en métal, l'absorption (exprimée en unités de masse sèche ou en quantité de cellules) est d'autant plus grande que la densité en cellules est plus faible (Junghans & Straube, 1991).

Les chitines et les chitosanes, qui sont des composés de la paroi cellulaire des champignons, ont été très étudiées en ce qui concerne leur capacité à fixer les métaux (Gadd, 1993). Les chitines sont des polymères de N-acétyl-D-glucosamine; les chitosanes sont des molécules désacétylées (Volesky, 1990). Le contenu en chitines/chitosanes des parois fongiques est différent selon l'espèce considérée, il est de 2,6 % chez *Neurospora crassa*, et de 53 % chez *R. nigricans*, et ce contenu peut évoluer avec la croissance du champignon (Volesky, 1990). C'est la paroi cellulaire de *R. arrhizus*, et en particulier la chitine et le chitosan, qui est responsable de la fixation du Zn et du Cu (Zhou, 1999).

Les mélanines sont des pigments fongiques importants puisqu'elles participent à la survie de nombreuses espèces en réponse aux stress environnementaux (Bell & Wheeler, 1986). Ces pigments sont localisés dans et/ou à l'extérieur des parois des cellules. Les mélanines extracellulaires sont synthétisées à l'extérieur des cellules par la sécrétion de phénol-oxydases qui oxydent les composés phénoliques ou bien par la sécrétion de phénols qui seront ensuite oxydés (Bell & Wheeler, 1986). Les composés phénoliques et les mélanines possèdent de nombreux sites potentiels de fixation des métaux (Gadd, 1993). Il existe chez les champignons une grande variété des types de mélanines, certaines proviennent de la tyrosine (3,4–dihydroxyphenylalanine (DOPA)-mélanines); d'autres du γ-glutaminyl-3,4-dihydroxybenzène (GDHB) ou du catéchol. De nombreux métaux peuvent induire ou accélérer la production de mélanines chez les champignons, et les champignons mélanisés ont alors de fortes capacités d'adsorption des métaux qui se retrouvent pratiquement tous localisés dans la paroi cellulaire (Mowll & Gadd, 1984). Toutefois, alors que le Cu est un inducteur d'isoformes

de phénol-oxydases (laccase) chez *Pleurotus ostreatus*, le Zn n'a pas d'effet significatif (Palmieri *et al.*, 2000).

1.2.3.4. Transport des métaux

1.2.3.4.1. Influx réduit

Plusieurs études ont montré une corrélation entre une absorption réduite de Cu et la tolérance au Cu (pour revue Gadd, 1986). Des souches de levures résistantes aux métaux montrent une absorption diminuée de Cu, Cd et Li (Asensio *et al.*, 1976; Ross & Walsh, 1981; Joho *et al.*, 1983; Gadd *et al.*, 1984). Cependant, ce phénomène de tolérance accrue due à une absorption réduite de métaux, n'est pas une caractéristique universelle (Trevors *et al.*, 1986). Certaines souches de levure résistantes au Cd peuvent accumuler des quantités considérables de Cd probablement grâce à des mécanismes de séquestration très efficaces (Trevors *et al.*, 1986).

Les études de la tolérance au Cu chez *Silene vulgaris* ont montré que cette tolérance était en partie due à une réduction de l'influx de Cu dans les plantes tolérantes (De Vos *et al.*, 1992). Un travail similaire concernant la tolérance au Cd de cette même plante, a conduit à la même conclusion (De Knecht *et al.*, 1992). D'autre part, la réduction de l'influx de l'As par la suppression du système d'absorption de phosphate/arsenate (As est un analogue de P) est le mécanisme par lequel *Holcus lanatus* tolère l'As (Meharg & Macnair, 1990, 1992).

Cette réduction d'influx de cations métalliques pourrait être la conséquence de systèmes efficaces de séquestration extracellulaire et/ou membranaire comme cela a été décrit précédemment.

1.2.3.4.2. Efflux

Un autre mécanisme de tolérance au niveau de la membrane plasmique consiste en l'efflux de cations métalliques vers le milieu extérieur. Il a été récemment montré que le gène *CAD2* de la levure confère une résistance au Cd. CAD2 serait impliquée dans le contrôle de la quantité de Cd intracellulaire par l'intermédiaire d'un système d'efflux de Cd (Shiraishi *et al.*, 2000). Puisque pour certains cultivars de blé résistant à l'Al, l'inhibition de leur métabolisme conduit à une augmentation du contenu racinaire en Al, l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme actif d'efflux au niveau de la membrane plasmique a été émise (Lindberg, 1990; Taylor, 1991). Cet efflux impliquerait une ATPase à Al^{3+}. Cependant, le gradient électrochimique d'Al^{3+} au travers de la membrane plasmique est si important que l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP ne serait pas suffisante pour permettre un efflux d'Al^{3+}. D'autre part, l'existence d'un transporteur dont l'affinité pour l'Al^{3+} serait très forte (K_m d'environ 10^{-10} M), est peu vraisemblable (Kochian, 1995). Un tel mécanisme d'efflux semble donc peu vraisemblable.

Récemment, les travaux de Weissman *et al.* (2000) ont montré que *Candida albicans* possède un transporteur membranaire, CaCRP1, pompe ATPase de type P, qui permet l'efflux de Cu,.

1.2.3.5. Chélation des métaux

Les protéines complexant les métaux jouent un rôle très important dans la régulation de la concentration intracellulaire en métaux essentiels et potentiellement toxiques.

1.2.3.5.1. Métallothionéines et phytochélatines

La super-famille de protéines appelée "métallothionéines" peut fixer les métaux à des groupes thiols cystéines (Hamer, 1986). Le terme de métallothionéine est apparu en 1957 pour décrire une protéine isolée du cortex rénal de cheval et qui contenait de grande quantités de soufre et de Cd (Margoshes & Vallee, 1957). Des protéines de structure similaire ont ensuite été décrites chez d'autres organismes (plantes, champignons, animaux), ces protéines étant capables de s'associer à plusieurs ions métalliques, le plus souvent Zn^{2+} et Cu^{2+} (ou Cd^{2+} dans le cas d'un stress au Cd) (Kägi & Kojima, 1987). Les métallothionéines sont capables de séquestrer les quantités excessives de certains ions métalliques présentes dans les cellules. Cependant, la fonction précise de ces molécules reste le sujet de nombreuses discussions (Karin, 1985; Bremner, 1987; Kägi & Schäffer, 1988; Robinson *et al.*, 1993, Palmiter, 1998). Les métallothionéines sont des polypeptides de faible masse moléculaire (6000-7000 Da), sans acides aminés aromatiques et histidine, avec une forte teneur en métaux, en cystéine et en séquences C-X-C (où X est un acide aminé autre que Cys) regroupées pour former des clusters métaux-thiols. Toutes les cystéines sont sous forme réduite et liées aux métaux par des liaisons thiols, ce qui confère des propriétés spectroscopiques caractéristiques des complexes métal-thiol à ces polypeptides (Kägi & Schäffer, 1988). Sur la base de leur structure, une subdivision en trois classes a été proposée (Rauser, 1990):

- Classe I: elle regoupe les polypeptides de tous les phylum dont la structure primaire (emplacement des Cys) est similaire à celle de la métallothionéine du cortex rénal de cheval.

- Classe II: elle regroupe les polypeptides pour lesquels la distribution des résidus Cys ne correspond pas à celle des polypeptides de la classe I.

- Classe III: elle regroupe les polypeptides atypiques qui possèdent des liaisons thiols-métaux, ils ne résultent pas de la transcription et de la traduction d'un gène, mais sont produits par une réaction enzymatique. Ces polypeptides ont d'abord été appelé "cadystines", et sont actuellement regroupés sous le nom de "phytochélatines".

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

La classe I comprend les métallothionéines de la plupart des vertébrés, ainsi que quelques métallothionéines fongiques comme celles de *Neurospora crassa* et *d'Agaricus bisporus* (Lerch & Beltramini, 1983; Munger & Lerch, 1985). Les métallothionéines de classe II sont représentées chez *S. cerevisiae* (Steffens, 1990). Les algues, les plantes et certains champignons comme *Schizosaccharomyces pombe* et *Candida glabrata* présentent des métallothionéines de classe III (Rauser, 1990).

– les métallothionéines

Les métallothionéines sont de petits polypeptides riches en cystéine qui peuvent complexer des métaux essentiels (tels le Cu et le Zn), et des métaux non essentiels (le Cd par exemple). La résistance au Cu chez *S. cerevisiae* peut intervenir par l'induction d'une protéine riche en cystéine de 6573 Da, appelée Cu-métallothionéine (Cu-MT) (Gadd, 1993). Cette protéine est normalement impliquée dans le maintien de faibles concentrations intracellulaires en Cu et prévient ainsi toute transcription inutile du gène *CUP1* (Wright *et al.*, 1988). Bien que la métallothionéine de levure puisse séquestrer le Cd et le Zn *in vitro*, sa transcription n'est pas induite par ces ions et elle ne protège pas la cellule contre leurs actions délétères (Butt *et al.*, 1984; Winge *et al.*, 1985). Alors que *S. cerevisiae* ne contient qu'une copie du gène de Cu-MT (*CUP1*) sur le chromosome VIII (Fogel & Welch, 1982; Karin *et al.*, 1984), les souches résistantes au Cu de *S. cerevisiae* contiennent 2 à 14 (voire plus) copies du gène *CUP1*, répétées au hasard qui confèrent à la levure la capacité de croître sur un milieu contenant plus de 2mM de Cu (Fogel *et al.*, 1983; Karin *et al.*, 1984). Par contre, les souches sensibles au Cu ne sont pas capables de pousser à des concentrations en Cu supérieures ou égales à 0,15 mM (Butt & Ecker, 1987). La résistance au Cu chez *S. cerevisiae* est donc dépendante de l'amplification du locus *CUP1*. Cependant la Cu-MT n'est pas directement impliquée dans l'absorption des ions Cu^{2+} chez *S. cerevisiae* (Lin & Kosman, 1990). Un excès de Cu induit la transcription du gène Cu–MT par l'intermédiaire d'une protéine régulatrice agissant en *trans*, codée par le locus *ACE1* (Thiele, 1988; Fürst *et al.*, 1988), connu également sous le nom de locus *CUP2* (Welch *et al.*, 1989). *ACE1* est exprimé constitutivement, c'est un changement de conformation de l'extrémité N-terminale de sa protéine en présence de Cu qui va lui permettre de se fixer sur une séquence activatrice du promoteur du gène *CUP1* (Fürst *et al.*, 1988).

La résistance au Cd chez *S. cerevisiae* peut intervenir par l'induction d'une protéine riche en cystéine de 9 kDa, appelée Cd-métallothionéine (Cd-MT) (Gadd, 1993). Cette protéine possède une forte similarité quant à sa composition en acides aminés avec la Cu-MT (Inouhe *et al.*, 1989). La Cd-MT des souches résistantes de *S. cerevisiae* au Cd est codée par le gène *CUP1*. La transcription de ce gène intervient même en absence d'ions métalliques, et est accrue par l'addition de Cd ou de Cu (Tohoyama *et al.*, 1992).

Des analyses génétiques des gènes régulés par les métaux ont été réalisées chez d'autres champignons, comme chez *Neurospora crassa* où le gène codant la Cu-MT a été cloné (Munger

et al., 1985, 1987). Des mutants d'*Aspergillus nidulans* résistants au Cu et au Cd ainsi que des mutants de *N. crassa* résistants au Cd ont été obtenus, caractérisés, mais les mécanismes de résistance n'ont pas encore été élucidés.

Chez *A. thaliana*, deux Cu-MT induites par le Cu ont été isolées en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre des protéines de fusion produites chez *E. coli* (Murphy *et al.*, 1997). De plus, il a été trouvé dans les germes de blé, une métallothionéine E_c (pour Early Cys labelled) qui régule l'homéostasie du Zn durant les premières étapes de la germination (Lane *et al.*, 1987). C'est à l'heure actuelle la seule protéine de plante qui peut être qualifiée sans équivoque de métallothionéine. A l'heure actuelle, plus de 50 "métallothionéine-like" de plantes ont été isolés d'autres espèces (Rauser, 1999). Des hypothèses spéculatives ont été émises quant à l'existence d'une classe de métallothionéines parmi les protéines des plantes supérieures pour inactiver les métaux toxiques (Robinson *et al.*, 1993). La présence de métallothionéines *sensus stricto* chez les plantes supérieures reste très controversée (Zenk, 1996; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). De plus, leur rôle dans la détoxication du Cd serait d'une importance moindre comparé à celui des phytochélatines et des protéines de stress (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). Par exemple chez *Datura innoxia*, 80 % du Cd sont associés aux phytochélatines, alors que 15 % le sont à des protéines "métallothionéines-like" (Prasad, 1995). D'autre part, Howden *et al.* (1995b) ont pu montrer que le gène *CAD1* d'*Arabidopsis* - probablement le gène de la phytochélatine synthase - confèrerait à cette plante la résistance au Cd.

– *les phytochélatines*

Généralités: phytochélatines et iso-phytochélatines

Les premières phytochélatines ont été isolées chez le champignon *Schizosaccharomyces pombe* exposé à un stress Cd (Murasugi *et al.*, 1981; Kondo *et al.*, 1985). Elles portaient alors le nom de cadystines, traduisant la présence à la fois de Cd et de cystéine dans le complexe formé. Toutefois, c'est le nom de phytochélatines qui sera adopté suite aux études de Grill *et al.* (1985) sur la plante *Rauvolfia serpentina*. Plus de 200 espèces végétales répondent à la présence de métaux lourds en synthétisant des phytochélatines, c'est par exemple le cas des bryophytes, des ptéridophytes, des spermaphytes, mais aussi des phytophytes (Gekeler *et al.*, 1988; 1989). Les phytochélatines sont capables de former des complexes avec le Cd, mais aussi avec d'autres métaux comme le Pb, le Zn, le Sb, le Ni, le Hg (Grill *et al.*, 1987), mais aussi plus récemment l'Ag, le Cu (Maitani *et al.*, 1996) et l'As (Schmöger *et al.*, 2000). Le Cd reste le plus fort inducteur de la formation des phytochélatines *in vivo*. Cependant, d'autres études ont montré que des métaux tels que le Ni, le Te, le W et le Se n'induisent pas la synthèse de phytochélatines, ce qui laisse entrevoir des difficultés d'analyse lorsque l'induction des phytochélatines est faible (Zenk, 1996).

Tableau 13. Différentes familles de phytochélatines.

Nom	*Formule*	*Isolement*	*Références*
Phytochélatine (PC)	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$	Levure	Murasugi *et al.*, 1981
	n = 2 à 11	Spermaphytes	Grill *et al.*, 1985
		Phytophytes	Gekeler *et al.*, 1988
		Bryophytes, Ptéridophytes	Gekeler *et al.*, 1989
Homo-PC (β-Alanine)	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$	Phaseolacées	Grill *et al.*, 1986
Iso-PC (β-Ala)	n = 2 à 7		
Hydroxyméthyl-PC (sérine)	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$	Poacées	Klapheck *et al.*, 1992
Iso-PC (Ser)	n = 2 à 4		
Iso-PC (Glutamate)	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$	Maïs	Meuwly *et al.*, 1993
Iso-PC (Glu)	n = 2 à 3		
Desglycine-PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$	Maïs	Bernhard & Kägi, 1987
DesGly-PC	n = 2 à 4	Levures	Mehra & Winge, 1988
			Barbas *et al.*, 1992
		Autres plantes supérieures	Meuwly *et al.*, 1995
			Kubota *et al.*, 1995

La structure générale de ces peptides est la suivante:

$$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly};\ n = 2 - 11$$

La synthèse de phytochélatines "classiques" est un mécanisme de détoxication du Cd répandu chez les plantes supérieures (Gekeler *et al.*, 1989). L'utilisation des phytochélatines (PC) en tant que bio-marqueurs d'une toxicité au Cd a été proposée (Keltjens & Van Beusichem, 1998). Cependant, il existe des composés similaires mais non identiques aux phytochélatines, ce sont les iso-phytochélatines (iso-PC) (Zenk, 1996). Les iso-PC diffèrent des PC par l'acide aminé C–terminal (Gly) qui peut être soit remplacé par la β-alanine, le glutamate ou la sérine, ou bien absent sans être remplacé (desGly-PC). Les formules générales des différentes phytochélatines sont résumées dans le tableau 13.

Toutes les iso-PC, ainsi que les desGly-PC, sont impliquées dans la détoxication des métaux lourds. La synthèse de PC et/ou d'iso-PC dépend de la disponibilité en glutathion (GSH) et/ou en molécules de GSH modifiées en C-terminal (Zenk, 1996). Dans ces conditions, des PC et des iso-PC peuvent coexister chez une même plante. Les désGly-PC peuvent être issues de la dégradation des PC par l'intermédiaire de carboxypeptidases capables de relarguer les résidus Gly (Kubota *et al.*, 1995). Il est à noter que Imai *et al.* (1996) ont montré chez *S. pombe* la production de PC en absence de toute toxicité métallique, mais en présence de carboxypeptidase et de fortes concentrations en GSH.

La biosynthèse des phytochélatines

La structure des phytochélatines rappelle celle du glutathion (γ-Glu-Cys-Gly). En fait, les PC peuvent être considérée comme des polymères linéaires de la portion (γ-Glu-Cys) du glutathion (Grill *et al.*, 1989). Du fait de la répétition des liaisons γ-Glu, les PC ne peuvent être considérées comme le produit d'expression d'un gène, mais comme le résultat d'une réaction enzymatique (Steffens, 1990).

Les PC sont synthétisées par la phytochélatine synthase (γ-Glutamyl-Cystéine dipeptidyl transpeptidase) (E.C. 2.3.2.15) selon la réaction:

$$\gamma\text{-Glu-Cys-Gly} + (\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly} \rightarrow (\gamma\text{-Glu-Cys})_{n+1}\text{-Gly} + \text{Gly}$$

Cette réaction est strictement dépendante de la présence de métaux. La formation du complexe stable PC-métal déplace la réaction dans le sens direct et évite ainsi la perte de métaux toxiques. L'enzyme est autorégulée car le produit de la réaction - PC - chélate le métal activateur de la PC synthase et termine ainsi la réaction enzymatique (Zenk, 1996). La synthèse des PC représente un véritable puits vis-à-vis du glutathion intracellulaire, et la diminution de la concentration en glutathion (GSH) dans le cytoplasme est compensée par l'induction des enzymes impliquées dans la synthèse du glutathion (Rüegsegger *et al.*, 1990; Rüegsegger & Brunold, 1992). Les études cinétiques utilisant des suspensions cellulaires de *Rauvolfia* exposées au Cd ont montré que, dès l'ajout du métal, la concentration en GSH diminue: la

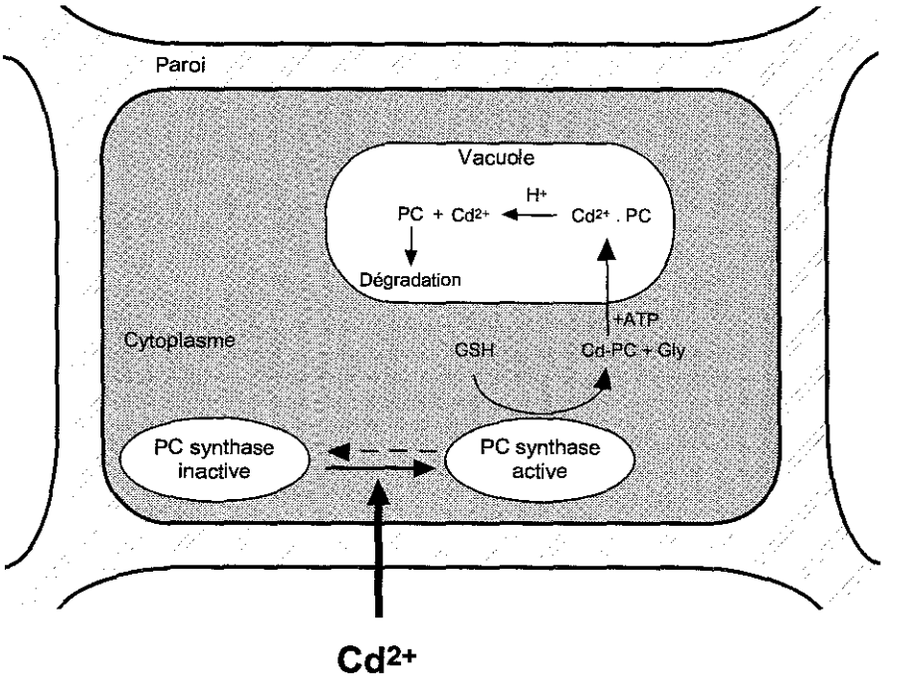


Figure 17. Biosynthèse et turnover des complexes métaux-phytochélatines. (modifié d'après Zenk, 1996).

Bibliothèque Universitaire
Polytechnique des Sciences
Rue du Jardin Botanique

synthèse des PC n'est pas décalée par rapport à l'application du stress (Grill *et al.*, 1987). Ceci prouve la nature constitutive de l'enzyme de synthèse des PC (Zenk, 1996).

La phytochélatine synthase est activée par différents ions métalliques selon l'ordre d'efficacité suivant:
$Cd^{2+} > Ag^{+} > Pb^{2+} > Cu^{+} > Hg^{2+} > Zn^{2+} > Sn^{2+} > Au^{3+} > As^{5-} > In^{3+} > Tl^{3+} > Ge^{4+} > Bi^{3+} > Ga^{3+}$.
Trente neuf autres éléments du tableau périodique n'activent pas cette enzyme (Zenk, 1996). Toutefois, la fixation du métal sur la phytochélatine synthase n'est pas en soi responsable de l'activation de l'enzyme (Vatamaniuk *et al.*, 2000). La présence de la phytochélatine synthase chez plusieurs plantes supérieures a été confirmée à de nombreuses reprises (Klapheck *et al.*, 1995; de Knecht *et al.*, 1995). Récemment, le gène codant la phytochélatine synthase a été isolé chez le blé (Ta*PCS1*), *S. pombe*, *Caenorhabditis elegans* et chez *A. thaliana* (At*PCS1*) (Clemens *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999).

Le turnover des phytochélatines

La vacuole est le site majeur d'accumulation temporaire des complexes PC-métaux (Vögeli-Lange & Wagner, 1990). La vacuole est le site de stockage ultime pour les métaux toxiques, initialement au moins sous formes de complexes avec les phytochélatines. Ces complexes sont transportés de façon active à travers la membrane du tonoplaste (Salt & Rauser, 1995). Ce transport utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP. Toutefois, ces complexes ne sont pas simplement déposés dans la vacuole, mais y subissent un rapide turnover (Grill *et al.*, 1988a). Dans les conditions de pH acide de la vacuole, il est vraisemblable que les métaux soient libérés des complexes et que les molécules de PC soient dégradées, ce qui permet à la cellule de récupérer des cystéines sous forme réduite. Les acides aminés résultants de cette dégradation sont alors redirigés vers le cytoplasme. La figure 17 illustre la biosynthèse et le turnover des phytochélatines.

La fonction des phytochélatines

En 1990, Steffens faisait remarquer que la formation des phytochélatines en réponse à un stress aux métaux lourds était l'une des réponses réellement adaptatives rencontrée chez les plantes. Les phytochélatines sont apparemment les composés naturels les plus simples impliqués dans la détoxication et l'homéostasie des métaux (Grill *et al.*, 1985).

- Détoxication

Leur rôle principal est de séquestrer l'excès de métaux en formant des complexes. Les phytochélatines et les iso-phytochélatines possèdent des propriétés idéales de chélation des métaux. La première démonstration convainquante de la fonction des PC chez les plantes supérieures est venue des travaux de Steffens (1986). Des expériences *in vitro* ont montré que

des enzymes végétales sensibles aux métaux tolèrent 10 à 1000 fois mieux une quantité de Cd sous forme de complexe que sous forme libre (Kneer & Zenk, 1992). De plus les phytochélatines peuvent réactiver des enzymes inhibées par les métaux, et cela jusqu'à 1000 fois mieux que d'autres agents chélateurs comme le glutathion ou le citrate, ce qui illustre encore l'important potentiel de séquestration des phytochélatines. Récemment, Howden *et al.* (1995a) ont réussi à isoler des mutants d'*A. thaliana* sensibles au Cd (*cad1*). Ces mutants sont incapables de former des complexes PC-Cd, et le degré de sensibilité est corrélé à la quantité de PC synthétisée par chaque mutant. Dans les mutants, la synthèse de GSH est normale, par contre ils ne possèdent pas d'activité phytochélatine synthase. D'autres mutants ont été identifiés (*cad2*), également incapables de former des complexes PC-Cd et pour lesquels la synthèse de GSH est anormale (Howden *et al.*, 1995b). Le gène *cad1* est vraisemblablement le gène de structure codant la phytochélatine synthase, et chez *A. thaliana* ce serait la seule voie de synthèse des PC.

- Homéostasie

Les phytochélatines régulent la disponibilité des ions métalliques dans les cellules. Des ions métalliques comme le Cu^{2+} et le Zn^{2+} sont essentiels pour le métabolisme des plantes en tant que cofacteurs d'enzymes ou éléments de structures. Les phytochélatines jouent alors un rôle double: d'une part, elles doivent complexer les métaux pour les inactiver et les conduire vers les vacuoles en vue de leur stockage; d'autre part, elles doivent transférer l'ion métallique essentiel vers les apoenzymes nouvellement synthétisées (Thumann *et al.*, 1991) qui nécessitent le Cu^{2+} ou le Zn^{2+} pour leur activité catalytique ou vers leurs structures en interaction avec les acides nucléiques, comme les structures en doigts de Zn.

1.2.3.5.2. Les acides organiques et les acides aminés

De par la grande réactivité des ions métalliques avec S, N et O, les acides carboxyliques et les acides aminés représentent des ligands potentiels.

Citrate, malate et oxalate ont été impliqués dans de nombreux processus y compris une tolérance différentielle aux métaux, le transport des métaux à travers le xylème et la séquestration vacuolaire des métaux (Rauser, 1999). Le citrate, par exemple, est supposé être un ligand majeur du Cd à de faibles concentrations en Cd (Wagner, 1993). Il est capable de former des complexes avec le Ni chez les plantes hyperaccumulatrices de Ni (Sagner *et al.*, 1998), et est supposé contribuer à l'accumulation et à la tolérance vis-à-vis du Zn (Godbold *et al.*, 1984). De la même façon, le malate a été proposé comme étant un chélateur cytosolique de Zn chez les plantes tolérantes au Zn (Mathys, 1977). Cependant, mise à part l'exception de la tolérance à l'Al (Delhaize & Ryan, 1995), les démonstrations claires de l'implication des acides organiques dans la tolérance aux métaux chez les plantes sont difficiles à obtenir.

L'exemple connu à ce jour de modifications dans le contenu en acides aminés ou en acides organiques induites par une exposition aux métaux est la réponse histidine (Krämer *et al.*,

1996). La comparaison de deux plantes exposées au Ni, l'une hyperaccumulatrice de Ni *Alyssum lesbiacum*, et l'autre non *A. montanum*, montre une augmentation du contenu en acides aminés dans le xylème d'*A. lesbiacum*, qui ne se retrouve pas chez *A. montanum*. Cette augmentation est principalement due à l'augmentation très forte du taux d'histidine qui corrèle bien celle du Ni *in vivo*. D'autre part, le Ni est complexé à l'histidine dans les tissus d'*A. lesbiacum*. Cependant, la réponse histidine ne serait pas un mécanisme général de tolérance au Ni chez les plantes, puisque l'exposition au Ni de la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi goesingense* ne se traduit pas par une réponse histidine (Persans *et al.*, 1999).

1.2.3.5.3. Les chaperones et le trafic intracellulaire des métaux

Avec l'identification récente de Cu-chaperones, et de transporteurs de Cu chez *S. cerevisiae*, le trafic intracellulaire des métaux est en train d'être élucidé (O'Halloran & Culotta, 2000). Ces Cu-chaperones sont en compétition pour le Cu avec d'autres agents chélateurs (ou d'autres processus de séquestration des métaux) aux très faibles concentrations cytoplasmiques en Cu (Culotta *et al.*, 1997; Clemens, 2001). La Cu-chaperone de *S. cerevisiae*, yCCS codée par le gène *LYS7*, joue un rôle essentiel dans l'activation de la superoxyde dismutase à cofacteur Cu/Zn en permettant l'insertion du Cu dans le site actif de cette protéine mais aussi de nombreuses autres protéines nécessitant du Cu pour être actives. Deux autres Cu-chaperones sont connues chez *S. cerevisiae*: COX17 délivre le Cu au complexe cytochrome *c* oxydase (Glerum *et al.*, 1996), et ATX1 est impliquée dans le transfert de Cu vers les vésicules post-golgiennes via l'interaction avec CCC2, une pompe ATPase de type P à Cu localisée dans la membrane de ces vésicules post-golgiennes (Fu *et al.*, 1995; Pufahl *et al.*, 1997).

Des protéines présentant des homologies avec ATX1 (CCH) et CCC2 (RAN1) ont été identifiées chez *A. thaliana* (Figure 11) (Himelblau *et al.*, 1998; Hirayama *et al.*, 1999). Ceci suggère qu'il existe un trafic de Cu dans les cellules végétales qui serait similaire à celui décrit chez la levure (Himelblau & Amasino, 2000; Woeste & Kieber, 2000).

D'autres protéines chélatrices spécifiques impliquées dans le trafic intracellulaire d'ions métalliques essentiels attendent d'être identifiées chez les plantes. De plus, il reste à élucider chez les plantes mais aussi chez les autres organismes, les mécanismes similaires mis en jeux pour les autres ions métalliques essentiels comme Zn^{2+}.

1.2.3.6. Compartimentation vacuolaire

La compartimentation vacuolaire joue un rôle très significatif dans les mécanismes de tolérance et de détoxication du Cd en évitant la libre circulation de Cd dans le cytoplasme et en les concentrant dans un espace réduit (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999).

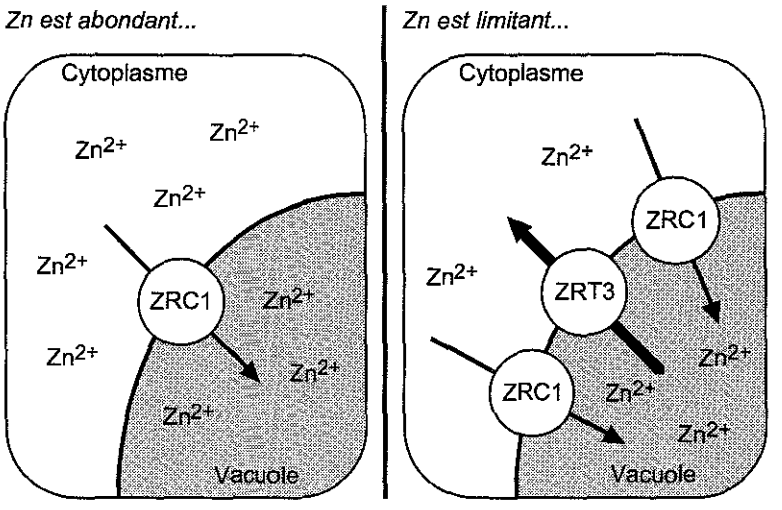


Figure 18. Modèle de fonctionnement du transporteur ZRC1 de la levure *S. cerevisiae*. (modifié d'après Miyabe *et al.*, 2001).

1.2.3.6.1. Les transporteurs de type ABC

La présence de Cd stimule la synthèse de PC, qui vont former des complexes PC-Cd de faible masse moléculaire (LMW) et de forte masse moléculaire (HMW) (Rauser, 1995). Généralement, les complexes LMW sont formés dans le cytoplasme puis transportés dans la vacuole où ces complexes peuvent piéger davantage de Cd et incorporer des ions S^{2-} (soufre acide-labile) pour former des complexes HMW, qui représentent la forme majeure de stockage du Cd. L'incorporation de soufre dans ces complexes augmente la capacité de piégeage des molécules et leur stabilité (Speiser *et al.*, 1992). Ces complexes HMW semblent jouer un rôle décisif dans la détoxication du Cd (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). Le gène *HMT1* de *S. pombe* code une protéine de la famille des transporteurs membranaires de type ABC (ATP-binding cassette) localisée dans la membrane vacuolaire (Ortiz *et al.*, 1992). HMT1 ne transporte pas le Cd seul, et le transport des PC et des complexes PC-Cd ne nécessite pas le gradient de protons établi de part et d'autre de la membrane de la vacuole par une ATPase à protons (Ortiz *et al.*, 1995). Une activité de transport similaire a été mise à jour dans les cellules racinaires de l'avoine, où les PC et les complexes PC-Cd sont transportés dans les vésicules du tonoplaste (Salt & Rauser, 1995).

La séquestration de PC dans la vacuole a été observée chez les plantes, mais aucun transporteur homologue à HMT1 n'a été identifié (Clemens, 2001).

Chez *S. cerevisiae*, le transporteur de type ABC, YCF1, est impliqué dans la tolérance au Cd. Il présente des homologies avec les protéines de la famille des MRP (multi-drug resistance-associated protein) chez l'homme. YCF1 fonctionne comme une pompe à glutathion *S*-conjugué, son substrat est le complexe $(GSH)_2$-Cd (Li *et al.*, 1996; 1997). Des séquences nucléotidiques homologues aux protéines de la famille MRP ont été identifiées chez *A. thaliana* (Lu *et al.*, 1997, 1998; Tommasini *et al.*, 1998), et l'absence apparente d'homologues à HMT1 chez les plantes fait des AtMRPs des candidats potentiels pour le transport des complexes PC-Cd au travers de la membrane des tonoplastes (Figure 11) (Rea *et al.*, 1998).

1.2.3.6.2. Les facilitateurs de diffusion cationique

Cette famille de transporteurs de métaux a d'abord été identifiée chez les bactéries (Nies, 1992), et a maintenant été identifiée chez la levure, les animaux et les plantes (Paulsen & Saier, 1997; van der Zaal *et al.*, 1999). Les principaux substrats de ces transporteurs sont le Zn et le Cd. Chez *S. cerevisiae*, les protéines COT1 et ZRC1 confèrent la tolérance au cobalt et au zinc/cadmium, respectivement lorsqu'elles sont surexprimées (Kamizono *et al.*, 1989; Conklin *et al.*, 1992). Ces deux protéines sont localisées dans la membrane vacuolaire, indiquant leur implication dans les phénomènes de séquestration (Li & Kaplan, 1998). La figure 18 illustre le rôle des protéines ZRC1 et ZRT3 (qui appartient à la famille des ZIP transporteurs) dans le maintien de l'homéostasie en Zn chez *S. cerevisiae*.

Un transporteur de cette famille a été étudié chez *A. thaliana*, et deux autres séquences homologues sont présentes dans le génome sous les numéros d'accession AL353032 et AC004561. Van der Zaal *et al.* (1999) ont démontré l'implication de la protéine ZAT dans la séquestration du Zn chez *A. thaliana*, mais sa localisation (dans la membrane de la vacuole) reste encore à déterminer.

1.2.3.6.3. Autres transporteurs vacuolaires

Comme nous l'avons dit précédemment, davantage de Cd est incorporé dans les complexes PC-Cd lors de la formation des complexes HMW dans la vacuole. Ce Cd supplémentaire est supposé rejoindre la vacuole par l'intermédiaire d'un transport direct des ions Cd^{2+} (Rauser, 1995). Une voie possible est constituée par l'activité antiport Cd^{2+}/H^+ dépendante d'un gradient de protons détectée à la fois au niveau de la membrane des vacuoles chez la levure, mais aussi de la membrane des tonoplastes chez l'avoine (Figure 11) (Salt & Wagner, 1993; Ortiz *et al.*, 1995). Salt & Wagner (1993) ont suggéré que d'un point de vue moléculaire, le même transporteur pourrait être impliqué dans cet antiport Cd^{2+}/H^+ et dans l'antiport Ca^{2+}/H^+.

1.2.3.7. Transformation des métaux

Les champignons, ainsi que d'autres organismes, peuvent effectuer des transformations chimiques des métaux par oxydation, réduction, méthylation et désacétylation, mais contrairement aux bactéries, peu de choses sont connues (Gadd, 1993). Des transformations enzymatiques de métaux peuvent être impliquées dans la survie des organismes car les produits de la transformation sont moins toxiques et/ou plus volatiles que les métaux d'origine (Gadd, 1993). Bien que la réduction de Hg^{2+} en Hg^0 soit un système de résistance bactérien bien caractérisé, il n'y a que peu de données concernant un processus analogue chez la levure et les champignons filamenteux (Gadd, 1993). Les champignons sont capables d'effectuer d'autres réductions, comme celle de Ag^+ en Ag^0 qui est déposé dans et autour des cellules (Kierans *et al.*, 1991), de Cu^{2+} en Cu^+ par l'intermédiaire d'une Cu-réductase pariétale chez *Debaryomyces hansenii* (Wakatsuki *et al.*, 1991a, b).

La méthylation du Hg et d'autres métaux peut être catalysée par de nombreux champignons, et peut être considérée comme un mécanisme de détoxication puisque les espèces méthylées sont souvent plus volatiles et peuvent être relarguées dans l'environnement (Gadd, 1993). La méthylation du Hg^{2+} implique la méthylcobalamine (vitamine B12) (Gadd, 1993). La biométhylation de l'As par le transfert du groupement CH_3 de la S-adénosylméthionine a été rapportée (Thayer, 1984, 1989; Andreae, 1986). La biométhylation de Se semble se dérouler selon un mécanisme analogue à celui de l'As (Gadd, 1993). Certains champignons sont capables de produire du diméthyl-telluride volatile à partir de sels de tellurium (Gadd, 1993). A part ces

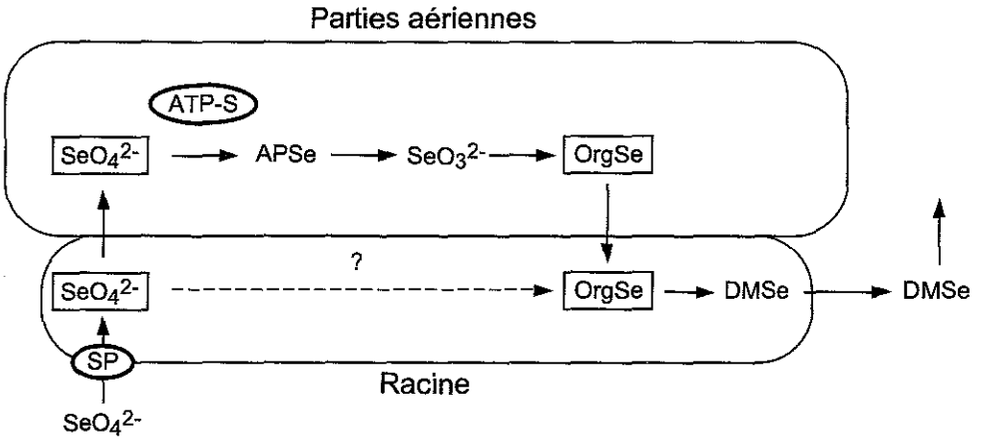


Figure 19. Modèle du flux de sélénium dans la moutarde indienne *Brassica juncea*.
Les formes encadrées correspondent à celles qui s'accumulent dans les plantes (modifié d'après Pilon-Smits *et al.*, 1999).

Tableau 14. Systèmes antioxydatifs chez les plantes.

Système antioxydatif	*Composés / Enzymes*
Non-enzymatique	
	GSH (glutathion)
	Acide ascorbique (vitamine C)
	α-tocophérol (vitamine E)
	β-carotène
	Flavonoïdes
	Hydroquinones
Enzymatique	
	Superoxyde dismutase
	Peroxydase
	Catalase
Enzymes "auxiliaires"	
	Glutathion réductase à NADPH
	Enzymes synthétisant du NADPH

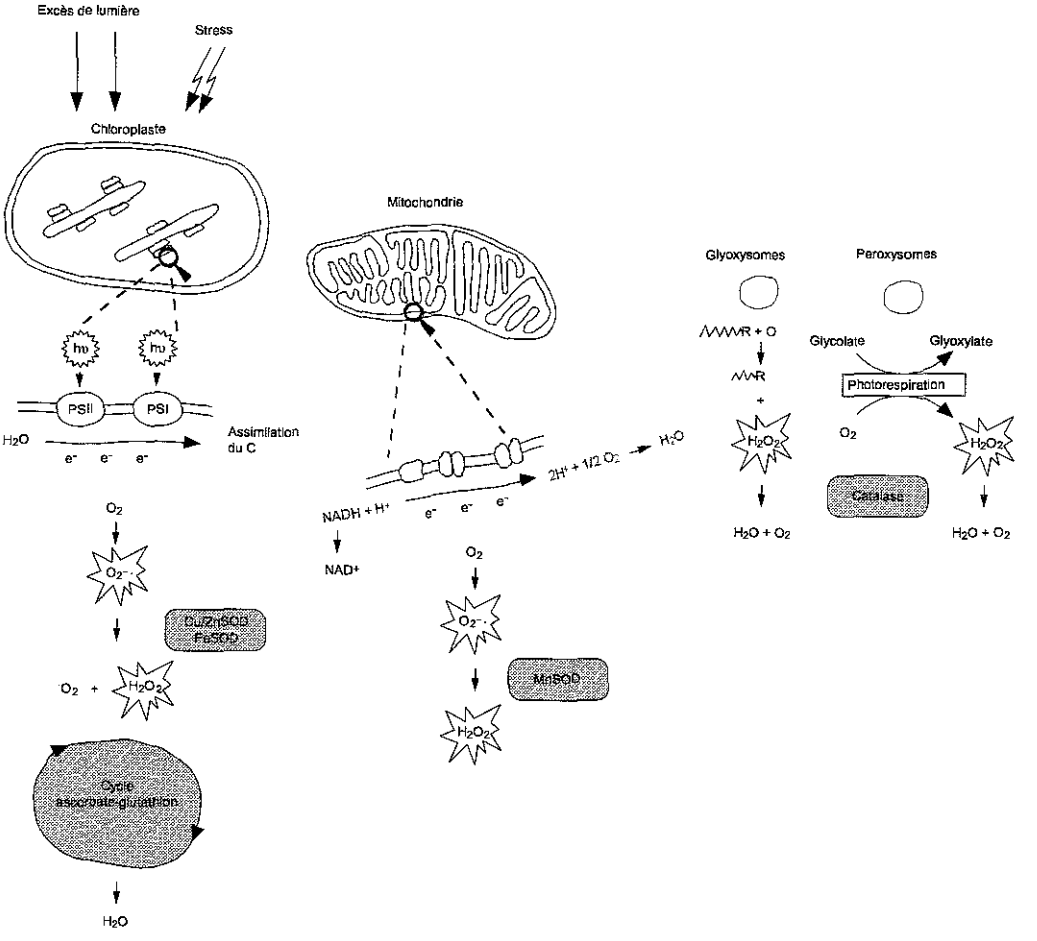


Figure 20. Schéma de la production et de l'élimination des espèces réactives de l'oxygène dans une cellule de plante (modifié d'après Van Breusegem *et al.*, 1998).
Les chaînes de transport des électrons des mitochondries et des chloroplastes sont les principaux sites de production des espèces réactives de l'oxygène. Dans les peroxysomes, l'H_2O_2 est produit principalement lors de la photorespiration. La dégradation des acides gras lors du cycle du glyoxylate dans les glyoxysomes produit également de l'H_2O_2. PS: photosystème; SOD: superoxyde dismutase; ∧∧∧∧R: β-acide gras.

Tableau 15. Trois groupes d'enzymes induites par des concentrations phytotoxiques de métaux lourds.

Les enzymes qui métabolisent les espèces réactives de l'oxygène

Peroxydases (POD), EC 1.11.1.7 et 11

Superoxyde dismutases (SOD), EC 1.15.1.1

Catalases (CAT), EC 1.11.1.6

Les enzymes impliquées dans la voie ascorbate-glutathion (voie Halliwell-Asada)

Ascorbate peroxydase (APOD), EC 1.11.1.11

Monodéshydroascorbate réductase (MDHAR), EC 1.6.5.4

Déshydroascorbate réductase (DHAR), EC 1.8.5.1

Glutathion réductase (GR), EC 1.6.4.2

Les enzymes qui réduisent le NAD(P) $^{+}$

Enzyme malique (ME), EC 1.1.1.40

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), EC 1.1.1.49

Isocitrate déshydrogénase (ICDH), EC 1.1.1.42

Glutamate déshydrogénase (GDH), EC 1.4.1.2

Malate déshydrogénase (MDH), EC 1.1.1.37

quatre exemples, il n'y a pas de données détaillées concernant l'implication des champignons dans la méthylation d'autres métaux.

De même chez les plantes, les données concernant la biotransformation des métaux sont rares. En ce qui concerne l'arsenic, il est incorporé dans divers diméthylarsinylribosides et certains lipides chez des microalgues marines (Francesconi & Edmonds, 1994). L'hypothèse de sa volatilisation a été émise également, et il serait vraisemblablement biotransformé par les plantes (Salt *et al.*, 1998). Certaines bactéries et certains animaux sont capables de réduire Cr(VI) en Cr(III) afin de détoxiquer le Cr, mais peu de données sont disponibles en ce qui concerne les plantes (Dushenkov *et al.*, 1995). L'élément le mieux étudié est sans doute le sélénium (Se) pour lequel un mécanisme de volatilisation a été décrit chez la moutarde indienne (*Brassica juncea*) (Pilon-Smits, 1999). Le sélénate (SeO_4^{2-}) est absorbé par l'intermédiaire d'un transporteur de sulfate et rapidement transféré vers les parties aériennes *via* le xylème (Figure 19). La réduction du sélénate par l'ATP sulfurylase, qui est l'étape limitante, a lieu essentiellement dans les parties aériennes. Ensuite, le sélénite obtenu est converti en forme organique de Se qui est transportée vers les racines où il est volatilisé en diméthylséléniде.

1.2.3.8. Système de détoxication antioxydatif

La production de radicaux libres induite directement ou indirectement par les métaux, peut causer de sérieux dégâts à différents composants cellulaires. La figure 20 illustre les voies de production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène dans une cellule végétale. Les cellules sont équipées de systèmes antioxydatifs efficaces composés à la fois de mécanismes non enzymatiques et enzymatiques (Tableau 14). Des molécules comme le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C), l'α-tocophérol (vitamine E), les hydroquinones, le β-carotène et les flavonoïdes ont des rôles de réducteurs et d'éliminateurs de radicaux. Alors que le glutathion, les vitamines C, E et les hydroquinones peuvent réagir directement ou par l'intermédiaire d'une catalyse enzymatique avec $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, ou $OH^{\cdot}$, les carotènes et les flavonoïdes peuvent interagir directement avec l'oxygène singulet ($O_2^{\cdot}$).

Les mécanismes enzymatiques, quant à eux, font intervenir des enzymes réparties en 3 grands groupes (Tableau 15). Le premier groupe d'enzymes induites par des concentrations phytotoxiques en métaux lourds regroupe les enzymes peroxydases, superoxyde dismutases (SODs) et catalases. Les capacités de ces enzymes varient avec l'augmentation de la quantité de métaux dans les cellules, et peuvent dès lors éliminer efficacement les formes réactives de l'oxygène (Vangronsveld & Clijsters, 1994). Ces enzymes participent aux réactions ci-dessous:

- SOD: $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- Peroxydases: $H_2O_2 + R(OH)_2 \rightarrow 2H_2O + RO_2$
- Catalases: $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

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

Tableau 16. Régulation des péroxydases par les métaux lourds dans divers organes de plantes supérieures.

Régulation	*Métal*	*Plante*	*Organe*	*Référence*
Stimulation	Cd	*Phaseolus vulgaris*	Feuilles	Van Assche *et al.*, 1988
		Phaseolus vulgaris	Feuilles	Vangronsveld *et al.*, 1995
		Zea mays	Feuilles	Lagriffoul *et al.*, 1998
		Hordeum vulgare	Feuilles	Hegedüs *et al.*, 2001
	Cu	*Silene cucubalus*	Racines	Chen *et al.*, 2000
		Lemna minor	Frondes	Teisseire & Guy, 2000
		Oryza sativa	Feuilles	Fang & Kao, 2000
	Pb	*Lupinus luteus*	Racines	Rucinska *et al.*, 1999
	Ni	*Cajanus cajan*	Feuilles	Madhava Rao & Sresty, 2000
	Zn	*Phaseolus vulgaris*	Feuilles	Van Assche *et al.*, 1988
		Cajanus cajan	Feuilles	Madhava Rao & Sresty, 2000
		Oryza sativa	Feuilles	Fang & Kao, 2000
	Hg	*Lemna minor*	Frondes	Subhadra *et al.*, 1991
		Allium cepa	Racines	Subhadra *et al.*, 1991
	Al	*Glycine max*	Racines	Cakmak & Horst, 1991
Aucune	Cd	*Zea mays*	Racines	Lagriffoul *et al.*, 1998

L'induction des peroxydases a été observée dans les feuilles et les racines de nombreuses espèces végétales après l'application de quantités toxiques en Cd, Cu, Ni, Pb, Hg, Zn et Al (Tableau 16). Différentes isoformes de peroxydases seraient impliquées dans différents processus physiologiques, en réponse au facteur de stress (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

Chez les plantes, on peut distinguer trois types de SODs: les FeSODs chloroplastiques, les MnSODs mitochondriales ou peroxysomales (del Rio *et al.*, 1983), et les Cu/ZnSODs localisées dans les chloroplastes et le cytoplasme (Scandalios, 1997). Ces métalloenzymes sont bien sûr sensibles au contenu intracellulaire en métaux essentiels (Clijsters *et al.*, 1999). Pour un cultivar de *Phaseolus vulgaris* sensible aux métaux, un excès de Cd stimule les Mn- et FeSODs, mais inhibe les Cu/ZnSODs. Au contraire, des concentrations phytotoxiques en Zn n'ont pas d'effets (Cardinaels *et al.*, 1984; Weckx & Clijsters, 1997). Suite à l'apport de Cu, une augmentation de la capacité SOD a été mise en évidence chez divers organismes (Shatzman & Kosman, 1978 chez le champignon *Dactylium dendroides*; Naiki, 1980 et Lee & Hassan, 1985 chez la levure). Toutefois, il apparaît que la régulation des SODs varie différemment selon le métal considéré, sa concentration ainsi que sa méthode d'application, mais aussi selon la plante considérée (Schikler & Caspi, 1999) et l'organe de la plante examiné. Peu de résultats sont disponibles en ce qui concerne l'induction par les métaux des catalases. Le Cu, Hg, et Pb stimulent du moins temporairement les catalases; ces enzymes pourraient avoir un rôle de protection après une intoxication par les métaux (Vangronsveld & Clijsters, 1994). Ce rôle a été récemment confirmé vis-à-vis du Cu (Weckx & Clijsters, 1996), mais pas pour le Zn (Weckx & Clijsters, 1997).

Le deuxième groupe d'enzymes considéré (Tableau 15) est impliqué dans la voie ascorbate-glutathion. Dans cette voie, les peroxydes sont pris en charge par l'ascorbate peroxydase, le substrat oxydé est recyclé par la déshydroascorbate peroxydase qui reçoit les électrons nécessaires du glutathion (GSH). La réduction du GSSG (glutathion oxydé) est catalysée par la glutathion réductase avec le NADPH en tant que donneur final d'électrons (Clijsters *et al.*, 1999). Puisque le NADPH est la source d'électrons pour cette voie, il n'est pas surprenant que plusieurs enzymes du métabolisme intermédiaire, qui réduisent le $NADP^+$ ou le NAD^+, soient induites par différents métaux. Quelques-unes de ces enzymes apparaissent dans le troisième groupe du tableau 15.

Le GSH est impliqué dans la compartimentation vacuolaire du Cd (comme nous l'avons dit précédemment dans le paragraphe 1.2.3.6.1). C'est également un donneur d'électrons, mais c'est aussi une molécule antioxidante très importante chez *S. cerevisiae*. En effet, des mutants déficients en GSH sont hypersensibles au Cd (Jamieson, 1998). Le Cd pourrait donc contribuer indirectement à un stress oxydatif en modifiant la balance redox des thiols intracellulaires. En effet, Lemaire *et al.* (1999) ont suggéré, pour la première fois, une implication possible des thiorédoxines (TRXs) dans les mécanismes de défense vis-à-vis des métaux lourds, en particulier vis-à-vis du Cd. Ils ont plus particulièrement montré que les TRXs sont capables de fixer les métaux lourds, probablement au niveau du site actif dithiol, ce qui inhibe leur activité. De plus, le

Cd inhibe toutes les enzymes des systèmes thioltransférase et thiorédoxine par son interaction avec les groupements thiols (Chrestensen *et al.*, 2000). Récemment, l'analyse de la réponse protéomique de *S. cerevisiae* à un stress Cd, a révélé que les deux systèmes cellulaires de maintien du statut redox, glutathion et thiorédoxine, étaient essentiels dans les défenses de *S. cerevisiae* contre le Cd (Vido *et al.*, 2001).

1.2.3.9. Autres mécanismes

1.2.3.9.1. Les protéines de stress

Toutes les cellules vivantes sont capables de réagir rapidement face à des conditions environnementales défavorables par la synthèse de "protéines de choc thermiques" (hsp), appelées plus généralement protéines de stress (Mager & Moradas Ferreira, 1993; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). Le spectre des hsps synthétisées est invariant. On peut distinguer plusieurs familles sur la base de leur masse moléculaire: hsp100, hsp90, hsp70, hsp60 (famille des chaperones), des petites hsps (17-30 kDa), et l'ubiquitine (petite hsp très conservée de 76 acides aminés). Cependant, la fonction exacte et le mécanisme d'action précis des petites hsps (exceptée l'ubiquitine) ne sont pas encore bien connus.

Dans de nombreuses études, la présence de Cd induit la synthèse d'un grand nombre de protéines de stress de masse moléculaire allant de 10 à 70 kDa: c'est le cas dans les racines de *Phaseolus vulgaris* (Leita *et al.*, 1991; Marchetti & Leita, 1995), dans les suspensions cellulaires de *Datura innoxia* (Delhaize *et al.*, 1989; Urwin *et al.*, 1996), chez l'orge et le maïs (Lupotto *et al.*, 1995), dans les cultures de cals de *Nicotiana plumbaginifolia* (Fenik *et al.*, 1997), et chez *Oryza sativa* (Prasad, 1997; Reddy & Prasad, 1995). De grandes quantités de hsp70 sont associées aux membranes dans les cultures cellulaires de *Lycopersicon peruvianum* en présence de Cd (Neumann *et al.*, 1994).

1.2.3.9.2. Le stress éthylène

Du fait du faible nombre de résultats disponibles sur ce sujet, la relation qui existe, au niveau moléculaire et cellulaire, entre la biosynthèse d'éthylène et le stress métallique (en particulier Cd) est impossible à appréhender exactement (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999).

La production d'éthylène induite par le Cd pourrait constituer un signal capable:

- d'accélérer le processus de lignification (Ievinsh & Romanovskaya, 1991) en augmentant l'activité des peroxydases et des phénylalanine ammonia-lyases (Gaspar *et al.*, 1978; Ecker & Davis, 1987);
- d'induire l'activité de l'ascorbate peroxydase afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène formé (Mehlhorn, 1990);

- de réguler l'expression des gènes inductibles par l'éthylène codant des métallothionéines (Whitelaw *et al.*, 1997) et/ou des protéines de défense.

Une production d'éthylène due au stress a été montré pour des plantes exposées à des concentrations toxiques en Cd (Fuhrer, 1982), en Cu ou en Zn (Gora & Clijsters, 1989). Par contre, le Cr, le Co et le Ni inhibent la production d'éthylène (Yu & Yang, 1979; Poschenrieder *et al.*, 1993). L'effet de la toxicité des métaux sur la production d'éthylène semble donc dépendre non seulement de la nature du métal considéré, mais aussi de sa concentration (Abeles *et al.*, 1992). L'augmentation de la production d'éthylène due à la toxicité des métaux serait la conséquence de l'augmentation de la peroxydation des lipides ou de l'augmentation de l'activité de l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxilic acid) synthase ou bien les deux (Abeles *et al.*, 1992). Gunsé *et al.* (2000) ont montré que la production d'éthylène était induite par l'Al, mais qu'elle n'était pas impliquée dans l'induction des mécanismes de résistance.

Cependant, des plants de tomates transgéniques exprimant l'ACC désaminase bactérienne ont la capacité d'accumuler le Cd, Co, Cu, Ni, Pb et Zn (Grichko *et al.*, 2000). L'ACC désaminase est capable de métaboliser l'ACC qui est le précurseur direct de l'éthylène chez les plantes (Abeles *et al.*, 1992). Les travaux de Grichko *et al.* (2000) montrent donc que les plantes transformées, qui présentent des taux plus faibles d'éthylène, peuvent être utiles dans les stratégies de phytoremédiation.

1.2.4. Les mycorhizes et les métaux lourds

1.2.4.1. Les mycorhizes VA

L'importance de ce type de mycorhizes varie en fonction du partenaire végétal et de l'espèce fongique (Gadd, 1993; Weissenhorn *et al.*, 1995a; Dìaz *et al.*, 1996). Shetty *et al.* (1994) ont montré que les herbacées mycorhizées pouvaient coloniser d'anciens sites de mines pollués contrairement aux non mycorhizées, suggérant ainsi que la tolérance vis-à-vis des polluants métalliques (ou d'autres effets bénéfiques) étaient conférée par la symbiose mycorhizienne. Weissenhorn *et al.* (1995b) ont montré qu'il n'existe pas de corrélation entre la concentration totale en Cd dans un sol agricole et le degré de mycorhization des racines de maïs. Ceci est en accord avec les résultats de Dìaz *et al.* (1996) qui ont montré que le pouvoir infectieux de deux espèces de *Glomus* (l'une isolée d'un site pollué, l'autre non) n'est pas affecté par la présence de Zn ou de Pb dans le sol. En présence de métaux dans le sol, c'est l'espèce provenant d'un site pollué qui est la plus efficace pour stimuler la croissance des plantes (Dìaz *et al.*, 1996). Toutefois, les travaux de Karagiannidis & Nikolaou (2000) ont montré une diminution du nombre de spores dans le sol et de la mycorhization en présence de Cd et Pb dans le sol. De même, l'application à long terme de boues contenant des concentrations croissantes en métaux entraîne une diminution à la fois de la taille mais aussi la diversité des populations de champignons formant des mycorhizes VA dans le sol (Del Val *et al.*, 1999).

Tableau 17. Principales études de la tolérance aux métaux lourds des champignons ECM en symbiose avec une plante hôte.
Références: a: Brown & Wilkins,1985; b: Jones & Hutchinson, 1986; c: Denny & Wilkins, 1987; d: Dixon, 1988; e: Dixon & Buschena, 1988; f: Jones & Hutchinson, 1988a; g: Jones & Hutchinson, 1988b; h: Colpaert & Van Assche, 1992; i: Colpaert & Van Assche, 1993; j: Galli *et al.*, 1993; k: Bucking & Heyser, 1994; l: Marschner *et al.*, 1996; m: Turnau *et al.*, 1996; n: Jentschke *et al.*, 1999; o: Hartley *et al.*, 1999; p: Hartley-Whitaker *et al.*, 2000b; q: Hartley-Whitaker *et al.*, 2000a; r: Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000; s: Van Tichelen *et al.*, 2001.

Plante hôte	*Champignon ECM*	*Métal*	*Effet constaté*
Betula sp.	*Amanita muscaria*	Zn [a]	Tolérance accrue.
	Paxillus involutus		
Betula papyrifera	*Laccaria proxima*	Ni [b]	Tolérance accrue, dépendante de l'espèce fongique.
	Lactarius hibbardae	Cu	*S. flavidum* permet une meilleure croissance en présence de Ni.
	Lactarius rufus		
	Scleroderma flavidum		
Betula pendula	*Paxillus involutus*	Zn [e]	Compatibilité entre les 2 hôtes semble être le critère déterminant pour la survie des partenaires.
Betula pubescens			
Quercus rubra	*Suillus luteus*	Cd, Zn, Pb, Ni, Cu [d,e]	Tolérance accrue à faible concentration en métaux.
Pinus banksiana			Transfert moindre de métaux vers les parties aériennes.
Picea glauca			
Betula papyrifera	*Scleroderma flavidum*	Ni [f,g]	*S. flavidum* augmente la tolérance au Ni.
	Lactarius rufus		Transfert moindre de Ni vers les parties aériennes des plantes mycorhizées.
Pinus sylvestris	*Suillus bovinus*	Zn [h, i]	Transfert moindre de Zn vers les parties aériennes.
	Telephora terrestris	Cd	Réduction de l'absorption de Cd.
	Laccaria laccata		Tolérance accrue avec les espèces possédant une forte densité d'hyphes extramatriciels.
	Suillus luteus		
	Paxillus involutus		
Picea abies	*Laccaria laccata*	Cd [j]	Taux de phytochélatines et de glutathion accrus en présence de Cd. Taux également plus élevés dans les plants NM.
			Piégeage de Cd au niveau des parois du champignon.
Pinus sylvestris	*Suillus bovinus*	Zn [k]	Tolérance dépendante de l'hôte fongique.
Picea abies	*Laccaria laccata*	Pb [l]	Tolérance dépendante de l'hôte fongique.
	Paxillus involutus		Tolérance accrue avec les espèces possédant une forte densité d'hyphes extramatriciels.
	Pisolithus tinctorius		
Pinus sylvestris	*Rhizopogon roseolus*	Al, Cd [m]	Effet filtre du manteau fongique.
Picea abies	*Laccaria bicolor*	Cd [n]	Tolérance accrue, dépendante de l'espèce fongique.
	Paxillus involutus		
Pinus sylvestris	*Paxillus involutus*	Cd, Zn [o]	Colonisation croisée des plantes réduite.
Pinus sylvestris	*Inoculum issu d'un sol naturel*	Cd, Zn [p]	Inhibition partielle de la mycorhization. Diminution de la diversité des espèces fongiques.
Pinus sylvestris	*Paxillus involutus*	Cd, Zn [q]	Effet bénéfique de la mycorhization par P. involutus.
	Suillus variegatus		Inhibition de la mycorhization dûe au Cd.
			Transfert moindre de Cd et Zn vers les parties aériennes.
Pinus sylvestris	*Suillus variegatus*	Al, Cu [r]	Sécrétion d'acides organiques (oxalate essentiellement).
	Rhizopogon roseolus		
Pinus sylvestris	*Suillus bovinus*	Cu [s]	Tolérance accrue. Mécanismes probablement divers et dépendants de l'espèce fongique.
	Thelephora terrestris		

L'effet de ce type de mycorhize sur l'absorption des métaux par les plantes n'est pas très clair. A de fortes concentrations en métaux, certains auteurs ont montré une absorption accrue des métaux par les plants mycorhizés (Gildon & Tinker, 1983; Killham & Firestone, 1983; Weissenhorn & Leyval, 1995), alors que d'autres auteurs ont trouvé des concentrations réduites en métaux dans les plantes dues à la mycorhization (Schüepp *et al.*, 1987; El-Kerbawy *et al.*, 1989; Leyval *et al.*, 1991; Weissenhorn *et al.*, 1995a; Rufyikiri *et al.*, 2000).

Les données disponibles ne permettent pas d'évaluer la contribution des champignons formant des mycorhizes VA à la tolérance des plantes hôtes vis-à-vis des métaux. Loth & Höfner (1995) attribuent l'absorption accrue de Cu, Zn et Cd dans les racines d'avoine mycorhizées à la surface d'absorption plus grande des racines, puisque la colonisation par les champignons VAM augmente la longueur des racines. Les résultats de Joner & Leyval (1997) suggèrent une immobilisation du Cd par le partenaire fongique dans le système racinaire. Ces résultats sont en accord avec ceux de Turnau *et al.* (1993a) concernant la localisation des métaux par l'utilisation de la technique de microscopie électronique EELS. Ces travaux ont montré une accumulation au niveau des hyphes intracellulaires. La production de mucilage de la part de certaines souches de champignons pourrait jouer un rôle clé dans la tolérance au Zn de leur partenaire végétal (Denny & Ridge, 1995). Cependant, le mécanisme précis de séquestration par la racine ou par le champignon dans la racine ou à l'interface n'a pas encore été étudié (Leyval *et al.*, 1997).

1.2.4.2. Les ectomycorhizes

De nombreux travaux ont été réalisés pour étudier - chez de nombreuses espèces fongiques et leurs plantes hôtes en symbiose - la sensibilité à certains métaux potentiellement toxiques. Ces études sont répertoriées dans le tableau 17. En général, les auteurs ont étudié l'effet d'un petit nombre (1-6) d'espèces fongiques sur la sensibilité aux métaux d'une seule espèce végétale (Tableau 17). Les résultats indiquent qu'il existe une variation interspécifique dans la capacité des champignons à réduire la sensibilité de la plante hôte (Hartley *et al.*, 1997). Dans la plupart des cas, les champignons mycorhiziens améliorent la tolérance de leur symbiote vis-à-vis du métal considéré (Hartley *et al.*, 1997). Cependant, l'amélioration par les ectomycorhizes de la tolérance de leur symbiote dépend, entre autres, de l'espèce fongique considérée et de la combinaison de métaux présents dans le sol. Les ectomycorhizes ne doivent donc pas être considérées comme des améliorateurs universels de la tolérance des plantes qui leurs sont associées (Godbold *et al.*, 1998). D'autre part, il a été montré que, dans certains cas, les métaux lourds sont davantage toxiques pour les champignons ectomycorhiziens que pour les plantes qui leurs sont associées (Hartley-Whitaker *et al.*, 2000b; Meharg & Cairney, 2000). Des études récentes ont montré que l'ectomycorhize serait capable d'améliorer la survie de l'hôte végétal en présence de métaux toxiques, par l'augmentation des capacités d'absorption des éléments nutritifs et de l'eau (Hartley-Whitaker *et al.*, 2000b).

Les moyens de détoxication des métaux lourds employés par les champignons ectomycorhiziens sont en partie les mêmes que ceux que nous avons vus dans le paragraphe 1.2.3. et comprennent essentiellement deux stratégies:

- l'évitement, permettant de réduire la quantité de métaux entrant dans la cellule, il consiste en la précipitation extracellulaire, une absorption réduite ou un efflux augmenté;
- la séquestration, permettant de réduire la concentration d'ions métalliques libres dans le cytoplasme de la cellule, elle implique la synthèse de molécules chélatrices, ou la compartimentation vacuolaire.

1.2.4.2.1. L'évitement

De nombreux auteurs ont montré que les espèces de champignons ectomycorhiziens produisant un mycélium dense sont capables de conférer une meilleure protection à leur symbiote (Colpaert & Van Assche, 1992, 1993; Denny & Wilkins, 1987b; Jones & Hutchinson, 1986; Marschner *et al.*, 1996). De plus, la capacité à maintenir un fort renouvellement du mycélium pourrait être importante afin d'assurer une protection à long terme du partenaire végétal (Colpaert & Van Assche, 1992, 1993). En utilisant la technique de microanalyse aux rayons X appliquée à la localisation du Zn dans les racines de *Betula* sp. mycorhizées par *P. involutus*, Denny & Wilkins (1987) ont montré de fortes concentrations en Zn au niveau des hyphes extramatriciels, localisé dans la paroi cellulaire des hyphes, mais pas dans le manteau. Récemment les travaux de Frey *et al.* (2000) sur l'association *Picea abies* – *Hebeloma crustuliniforme*, ont montré une localisation similaire du Zn.

La structure du manteau fongique, et plus particulièrement la perméabilité au niveau de l'apoplaste vis-à-vis des solutés, peut être une composante essentielle de la tolérance du partenaire végétal. Dans certaines associations ectomycorhiziennes, le manteau fongique agit en tant que barrière physique, en empêchant les métaux d'atteindre la surface racinaire. Ashford *et al.* (1988, 1989) ont montré que la structure très dense du manteau et le dépôt interhyphes de composés phénoliques ne permettent pas aux solutés d'atteindre la surface racinaire *via* l'apoplaste.

1.2.4.2.2. La séquestration

Bien que la fixation de métaux aux polyphosphates vacuolaires puisse représenter un moyen de détoxication intracellulaire chez les champignons ectomycorhiziens (Turnau *et al.*, 1993b, 1994; Väre, 1990), il semblerait que cela soit le fait d'un artéfact de préparation des échantillons (Orlovich & Ashford, 1993).

En outre, tous les autres chélateurs de métaux que nous avons vus dans le paragraphe 1.2.3.5 restent valables pour les champignons ectomycorhiziens. Peu d'études se sont encore intéressées aux métallothionéines et aux phytochélatines des champignons ectomycorhiziens (Morselt *et al.*, 1986; Galli *et al.*, 1993). Les enzymes de la voie de biosynthèse des phytochélatines et leur réponse vis-à-vis des métaux sont en cours d'étude au laboratoire (M. Courbot, Thèse d'Université). Des études ont été menées sur la synthèse des polyamines en réponse aux métaux. Gruhn & Miller (1991) ont montré que l'activité intra- et extra-cellulaire de la tyrosinase augmente chez certains champignons ectomycorhiziens cultivés en présence de Cu. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de mélanine au niveau des hyphes, limitant ainsi l'entrée de Cu et d'autres métaux dans la cellule. Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés (Zarb & Walters, 1995).

1.2.4.3. Coût de la tolérance

Les populations d'espèces végétales qui possèdent un génotype "normal" sont plus compétitives que les populations tolérantes lorsque celles-ci sont cultivées ensembles sur des sites non-pollués (Hickey & McNeilly, 1976). Ceci implique que la tolérance a un "coût" pour la plante et qu'en absence de contamination, le caractère tolérant sera perdu. Les principaux "coûts" de la tolérance seraient dus à l'augmentation des dépenses énergétiques pour permettre l'exclusion et la fixation des métaux et les processus d'adaptations enzymatiques, par exemple (Baker & Walker, 1989). D'autre part, Bradshow (1984) a montré que lorsque deux populations, une normale et l'autre tolérante, sont adjacentes, la fréquence des plantes tolérantes est faible. Or, si la présence d'un ou plusieurs gène(s) conférant la tolérance était bénéfique pour les plants "normaux", le flux de gène entre les deux populations (normale et tolérante) devrait conduire à une forte fréquence des plantes tolérantes. Ceci montre donc que la sélection se fait contre les plantes tolérantes sur les sites non-pollués, et que les gènes conférant la tolérance ne sont pas un avantage pour la plante, mais sont soit inutiles soit "coûteux" pour la plante.

Dans un certain nombre d'études (Dixon, 1988, Dixon & Buschena, 1988; Colpaert & Van Assche, 1992; Galli *et al.*, 1993; Bucking & Heyser, 1994), des plantes inoculées avec des souches de champignons ectomycorhiziens provenant de sites non-pollués ont été cultivées en présence de métaux toxiques afin d'évaluer leur sensibilité. Cependant, vu le nombre limité de souches utilisé, il était peu vraisemblable d'isoler des souches génétiquement tolérantes (Hartley *et al.*, 1997). Comme pour les plantes, les gènes de tolérance auraient un "coût" pour les champignons ectomycorhiziens, et la sélection se ferait contre les champignons tolérants sur les sites non-pollués. A moins que la tolérance ne soit la conséquence d'un processus physiologique inné (Meharg *et al.*, 1993).

Toutefois, les mécanismes par lesquels les champignons ectomycorhiziens peuvent se protéger et protéger leur partenaire symbiotique vis-à-vis de la toxicité des métaux sont encore peu connus (Hartley *et al.*, 1997).

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

1.3. La génomique

1.3.1. Avant-propos

La Biologie et la Médecine subissent actuellement une révolution basée sur la détermination toujours plus rapide de séquences d'ADN, y compris les séquences complètes d'ADN (ou génomes) d'un nombre croissant d'organismes (Fields *et al.*, 1999). Le terme "génome" a été utilisé pour la première fois par H. Winkler en 1920 et se réfère au jeu complet de gènes et de chromosomes d'un organisme (Hieter & Boguski, 1997). Le terme "génomique" a été créé récemment (1986) par Thomas Roderick dans le but de décrire la discipline scientifique qui consiste à cartographier, séquencer et analyser les génomes (McKusick, 1997). Cependant, la génomique a subi une transition ou un développement à partir de la cartographie et du séquençage des génomes (les premiers objectifs du Human Genome Project) vers l'étude approfondie de la fonction des génomes. Pour refléter ce changement, l'analyse du génome est maintenant divisée en "génomique structurale" et "génomique fonctionnelle".

La génomique structurale représente la phase initiale de l'analyse d'un génome et a une limite claire: la construction, pour un organisme donné, de cartes génétiques, physiques et de transcrits de haute résolution. L'ultime carte physique d'un organisme étant sa séquence nucléotidique complète.

La génomique fonctionnelle est une nouvelle étape de l'analyse du génome. Elle a trait au développement et à l'application d'approches expérimentales globales (à l'échelle du génome ou du système) pour établir la fonction des gènes, en utilisant les informations et les moyens fournis par la génomique structurale. Elle est caractérisée par des méthodologies à grande échelle ou à haut débit combinées à des analyses statistiques et informatiques des données (Hieter & Boguski, 1997). La génomique fonctionnelle devrait permettre d'élucider la fonction des gènes séquencés.

Le séquençage du premier organisme vivant date de 1995, il s'agissait alors de la bactérie *Haemophilus influenzae*. Depuis, de nombreux autres organismes ont été séquencés, en particulier *S. cerevisiae* en octobre 1996, et *A. thaliana* en décembre 2000. En juin 2000, une ébauche de travail en ce qui concerne le génome humain a été publiée. Le site GOLD (Genome On Line Database (http://igweb.integratedgenomics.com/GOLD) recense les projets de séquençage, et nous apprend qu'à la date de mai 2001, les séquences complètes de 51 génomes bactériens et 15 génomes eucaryotes ont été publiées, sans compter plus de 208 génomes bactériens et près de 152 génomes eucaryotes en cours de séquençage.

1.3.2. La génomique structurale: le séquençage à grande échelle

1.3.2.1. Le séquençage d'ESTs

Un moyen rapide d'établir un inventaire des gènes exprimés est l'obtention de séquences partielles d'ADNc appelées ESTs (Expressed sequence tags ou étiquettes de séquences exprimées). Dans cette approche, des clones d'ADNc choisis au hasard sont séquencés sur une longueur de 300 à 500 pb à partir de l'une ou des deux extrémités selon le programme de passage simple. Les séquences ainsi obtenues contiennent en général des erreurs et des indéterminations, mais elles sont suffisamment précises pour identifier sans ambiguïté, la plupart du temps, le gène correspondant (Bouchez & Höfte, 1998). Dans le meilleur des cas, la séquence d'une EST est fiable à 97 % (Hillier *et al.*, 1996).

Des centaines voire des milliers de séquences peuvent ainsi être générées avec un investissement financier limité. Le premier projet EST a commencé en 1991 (Adams *et al.*, 1991). Des programmes informatiques puissants, pour des comparaisons de séquences rapides avec les banques de données, sont disponibles en accès libre *via* le réseau internet (voir le paragraphe 1.3.3.1).

Du fait de la présence fréquente de structures secondaires qui bloquent l'étape de transcription inverse avec une importance variable, un ARNm peut conduire à l'obtention de différents ADNc incomplets (Hatey *et al.*, 1998). Un autre problème vient du fait que dans une cellule donnée, les différents ARNm sont présents en nombre de copies variable. Les ARNm peuvent être répartis en trois classes d'abondance:

- les messagers très abondants: une dizaine de types différents, chacun présent en milliers de copies,
- les messagers abondants: quelques centaines de types différents, chacun présent en quelques centaines de copies,
- les messagers rares: des milliers de types différents, une dizaine (voire moins) de copies par cellule. Ce groupe peut représenter jusqu'à 50 % du total des messagers.

Les populations d'ARNm apparaissent donc complexes, et la présence de nombreuses copies du même ARN occasionne la redondance des ADNc. Pour pallier ce problème de "biais d'expression", un processus de "normalisation" peut être envisagé (Soares *et al.*, 1994). Le principe de la normalisation réside dans la dénaturation puis la renaturation de la population d'ADNc, de telle façon que les espèces les plus abondantes se réassocient plus vite et peuvent être ainsi en partie éliminées. Dans la population "normalisée", le nombre de copies de chacune des espèces les plus représentées aura ainsi diminué d'un facteur 1000 à 10000 (Hatey *et al.*, 1998).

Les banques d'ESTs ont prouvé être une ressource immense pour identifier des gènes, comparer des séquences entre espèces, et ont fourni des marqueurs, pour les cartographies physiques et génétiques, et des clones pour les analyses d'expression. L'abondance relative des ESTs dans les banques préparées à partir de différents organes et à partir d'organismes dans différentes conditions physiologiques, permet d'avoir une information préliminaire quant aux profils d'expression, en ce qui concerne les transcrits les plus abondants (Bouchez & Höfte, 1998).

1.3.2.2. Le séquençage du génome

Les programmes de séquençage d'ESTs ont été couronnés de succès en ce qui concerne la découverte de nouveaux gènes. Cependant, les transcrits rares et les transcrits induits dans des conditions spécifiques (stress biotiques et abiotiques par exemple) ne sont pas toujours représentés dans les banques d'ESTs. La seule approche permettant d'avoir accès à l'ensemble des gènes est de déterminer la séquence complète du génome. D'autre part, le séquençage du génome ne livre pas des fragments de gènes incomplets (comme cela est le cas pour les ESTs), et de tels séquençages sont fiables à 99,99 % (Marra *et al.*, 1998).

Un problème majeur des séquences génomiques est de distinguer les régions codantes (exons) des séquences intergéniques non codantes et des introns. Les comparaisons avec les séquences d'EST et d'ADNc, et les similarités de séquence avec des séquences codantes connues peuvent être utilisées pour déterminer la position des introns pour de nombreux gènes. Cependant, pour les gènes qui ne présentent pas d'homologies avec les séquences présentes dans les banques de données, les séquences codantes doivent être prédites à partir de la séquence génomique. Afin de prédire le début et la fin des gènes ainsi que la position des introns avec une grande fiabilité, un certain nombre d'algorithmes ont été développés, comme GRAIL (Uberbacher & Mural, 1991) ou NetPlantGene (Hebsgaard *et al.*, 1996; Tolstrup *et al.*, 1997).

1.3.3. La génomique fonctionnelle

1.3.3.1. Identification et analyse des séquences

1.3.3.1.1.L'outil informatique

L'identification des séquences ainsi que les analyses nucléotidiques et/ou protéiques ne seraient pas possibles sans le support et le développement de l'informatique. Cet outil a permis l'essor non seulement de l'analyse des séquences, mais aussi leur accès et leur maniement *via* Internet. L'importance de cette technologie est devenu si importante que certains parlent de recherche "in silico" ("in silicio" serait plus approprié), qui permet d'obtenir de nouveaux résultats à partir d'informations déjà existantes.

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

Tableau 18. Différentes variantes du programme BLAST disponibles sur le site du NCBI.

Services BLAST	*Séquence à étudier (Q)*	*Séquence de référence (S)*	*Niveau de comparaison*	*Remarques*
BLAST nucléotidique				
blastn	ADN	ADN	ADN	Recherche de séquences identiques
MEGABLAST	ADN	ADN	ADN	Ne tient pas compte des erreurs de séquençage pour l'alignement
Spécial séquences courtes	ADN	ADN	ADN	blastn adapté
BLAST protéique				
blastp	Protéine	Protéine	Protéine	Recherche de protéines identiques
PSI- et PHI-BLAST	Protéine	Protéine	Protéine	Sensibilté accrue
Spécial séquences courtes	Protéine	Protéine	Protéine	blastp adapté
BLAST "translated"				
blastx	ADN	Protéine	Protéine	Q est traduite dans les 6 phases puis comparée
tblastn	Protéine	ADN	Protéine	S est traduite dans les 6 phases avant d'être comparée
tblastx	ADN	ADN	Protéine	Q et S sont traduites dans les 6 phases avant d'être comparées

1.3.3.1.2. Les banques de données

– les recherches de similarité

L'identification des gènes passe par la comparaison de leur séquence nucléotidique et/ou protéique avec les séquences présentes dans les banques de données telles que GenBank (maintenue au NCBI, USA; http://www.ncbi.nlm.nih.gov), EMBL (maintenue à l'EBI, UK; http://www.ebi.ac.uk) et DDBJ (maintenue au NIG, Japon; http://www.ddbj.nig.ac.jp). Ces banques de données collectent les nouvelles séquences et sont mises à jour par des échanges quotidiens. De ce fait, les informations disponibles dans les trois banques de données sont sensiblement identiques. Sur ces trois sites, la recherche d'une séquence peut se faire par mots clés, ou bien par homologie de séquence. Les séquences d'ESTs soumises à GenBank sont conservées dans une banque de données spécifique, dbEST, et sont régulièrement comparées avec les banques de données de séquences nucléotidiques et protéiques. Les résultats partiels de chaque recherche (les 15 meilleures homologies) sont inclus dans un commentaire alloué à chaque EST (Boguski *et al.*, 1993). Parmi plus de 8 millions d'entrées publiques disponibles dans la banque de données dbEST, plus de 3,5 millions sont consacrées à l'homme et 113000 à *A. thaliana*, par exemple.

Les comparaisons de séquences utilisent différents programmes d'alignement tels que FASTA (Pearson & Lipman, 1988), BLAST (Altschul *et al.*, 1994) ou Smith-Waterman (Smith & Waterman, 1981). Ces analyses fournissent une liste de séquences plus ou moins similaires, qui nécessite une interprétation manuelle. Les meilleurs résultats obtenus par l'analyse informatique doivent être validés; des critères comme la longueur et le pourcentage de similarité de ces séquences, voire les données concernant l'évolution des gènes (Eisen, 1998), sont utilisés pour estimer la pertinence des résultats. Bien que l'algorithme Smith-Waterman soit le plus sensible des trois, il est peut-être le moins utilisé car relativement lent. FASTA (http://www2.ebi.ac.uk/fasta3) possède une sensibilité comparable au précédent tout en étant plus rapide. BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) est le plus utilisé car le plus rapide et le seul qui repose sur une théorie statistique détaillée (Altschul *et al.*, 1997), mais il est peut-être le moins sensible. BLAST contient des programmes qui acceptent des soumissions nucléotidiques et des programmes qui acceptent des soumissions protéiques (Tableau 18). Des mises à jour du programme BLAST ont été réalisées et de nouvelles versions, plus sensibles, permettant des alignements discontinus sont disponibles telles que WU-BLAST ou BLAST 2.0 (Tatusova & Madden, 1999).

La "Molecular Biology Database Collection" représente une compilation des ressources en biologie moléculaire disponibles sur le réseau mondial afin de les rendre plus accessibles (Baxevanis, 2000). Celle-ci est disponible en ligne sur le site http://www.oup.co.uk/nar/Volume_28/Issue_01/html/gkd115_gml.html. D'autres plateformes d'orientation sont également disponibles sur le site d'Infobiogen

Tableau 19. Principales bases de données concernant les motifs protéiques.

Bases de données	URL	Références
PROSITE	www.expasy.ch/sprot/prosite.html	Bucher & Bairoch, 1994
BLOCKS	www.blocks.fhcrc.org/	Henikoff & Henikoff, 1994
Pfam	www.sanger.ac.uk/Software/Pfam	Sonnhammer *et al.*, 1997
PRINTS	www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.html	Attwood *et al.*, 1994
ProDom	http://protein.toulouse.inra.fr	Sonnhammer & Kahn, 1994
SWISS-PROT	www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html	Bairoch & Apweiler, 1997

(http://www.infobiogen.fr/services/deambulum/fr) ou sur le site http://www.sequenceanalysis.com/contents.html, par exemple.

– les recherches de motifs conservés

Un motif, ou un profil protéique, peut être défini comme une séquence d'acides aminés conservés qui jouent un rôle important dans la fonction de la protéine et qui sont à une certaine distance l'un de l'autre. Ces motifs peuvent fournir des indications quant à la fonction des protéines encore non caractérisées (Galperin & Frishman, 1999). Les principales banques de données regroupant les motifs protéiques sont regroupées dans le tableau 19.

Deux systèmes de recherche sophistiqués permettent aux usagers d'avoir une interface facile d'utilisation capable d'extraire différents types d'information à partir des banques de données de biologie moléculaire: Entrez (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/; Schuler *et al.*, 1996a) et SRS (Sequence Retrieval System: http://www.embl-heidelberg.de/srs5/; Etzold *et al.*, 1996). Entrez est un moteur de recherche qui permet de rechercher des données de biologie moléculaire et de bibliographie à partir de banques de données maintenues au NCBI. Un de ses points forts est le lien qui existe entre les dossiers qui permet de naviguer d'une séquence nucléotidique vers les références bibliographiques associées à cette séquence. SRS, quant à lui, fourni une interface uniforme vers plus de 50 banques de données. L'utilisateur doit sélectionner les banques de données et est ensuite invité à suivre les liens.

1.3.3.2. L'analyse des profils d'expression des gènes

La production d'ARNm à partir du génome est la première étape dans le processus de synthèse protéique. Des différences dans l'expression des gènes sont responsables à la fois de changements morphologiques et phénotypiques, mais aussi révèlent les réponses cellulaires à des perturbations environnementales (Lockhart & Winzeler, 2000). Contrairement au génome, le transcriptome est dynamique et est amené à subir des changements radicaux en réponse à des perturbations cellulaires, ou même lors d'évènements cellulaires normaux. En terme de compréhension de la fonction des gènes, savoir quand, où et à quel niveau un gène est exprimé est capital afin de comprendre l'activité et le(s) rôle(s) biologique(s) de la protéine produite. D'autre part, les modifications des profils d'expression de nombreux gènes peuvent fournir des éléments de réponse concernant les mécanismes de régulation ainsi qu'une vision plus globale des fonctions cellulaires et des voies biochimiques (Lockhart & Winzeler, 2000). Il existe plusieurs techniques permettant de détecter et de quantifier l'expression différentielle d'un gène donné. Nous verrons successivement les techniques dites globales, et les techniques qui permettent de cibler des groupes de messagers. Les approches classiques d'analyse comme le northern-blot permettaient d'étudier la régulation de l'expression d'un seul gène (Terryn *et al.*,

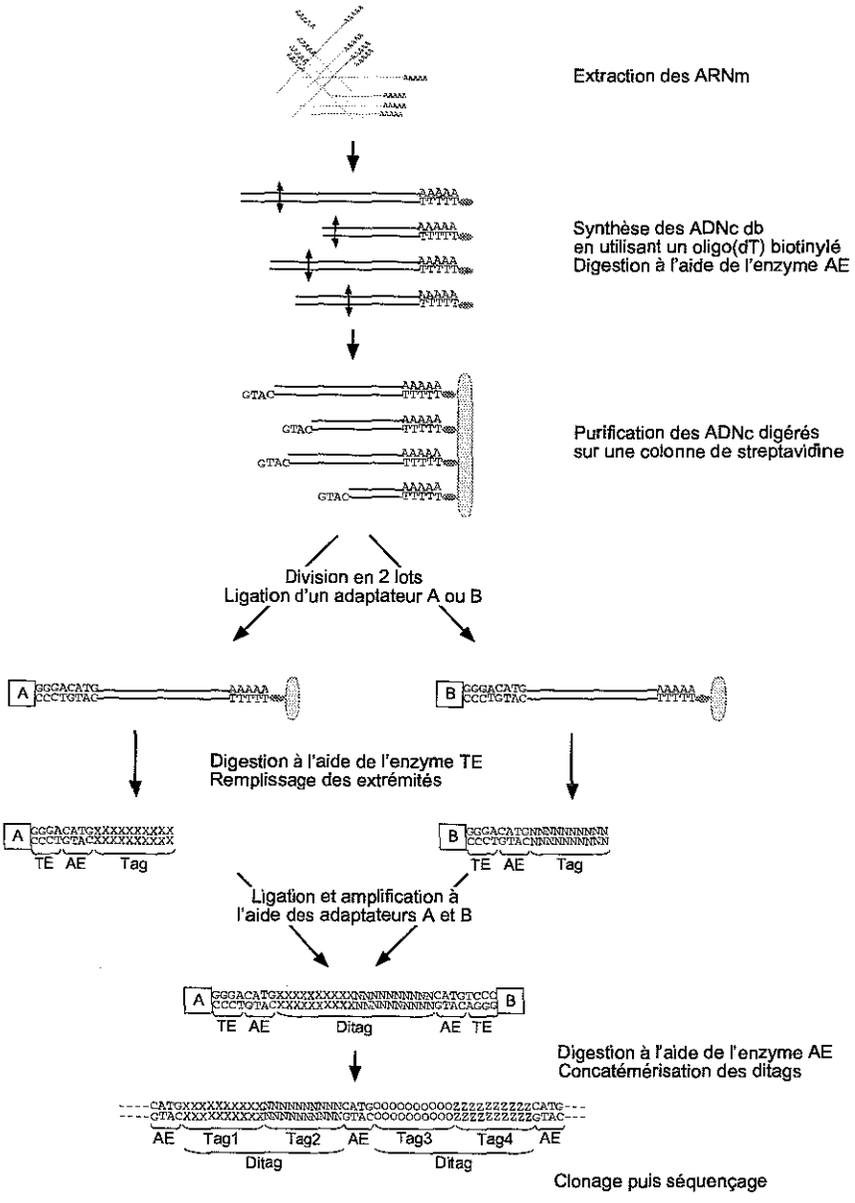


Figure 21. Schéma de la technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression).
Les ADNc double-brin sont synthétisés à partir des ARNm à l'aide d'une amorce oligo(dT) biotinylée. L'ADN est alors restreint par l'enzyme d'ancrage (AE) *Nla*III qui coupe fréquemment. Les ADNc restreint sont ensuite purifiés sur colonne de streptavidine, divisés en deux lots et ligués à deux adaptateurs différents dont la partie 3' contient la séquence reconnue par l'enzyme de "tagging" (TE) qui coupe à une distance donnée de son site de reconnaissance. La digestion par l'enzyme TE (*Bsm*FI) conduit à l'obtention de tags composés de l'adaptateur et d'une dizaine de paires de bases. Les extrémités sont rendues franches par remplissage, les deux lots sont ligués et servent ensuite de matrice pour une réaction de PCR qui utilise des amorces spécifiques des deux adaptateurs. Les ditags amplifiés sont restreints par l'enzyme AE qui élimine les adaptateurs, puis concaténérisés, clonés et séquencés. Chaque clone contient environ 10 à 50 tags, chaque ditag est separé par le site de reconnaissance de l'enzyme AE qui sert de signal de ponctuation. La fréquence de chaque tag dans une banque SAGE est le reflet de l'abondance de l'ARNm correspondant dans le tissus (modifié d'après Velculescu *et al.*, 1995).

1999), des stratégies ont été alors développées afin d'étudier l'expression des gènes à l'échelle du génome (Kozian & Kirschbaum, 1999).

1.3.3.2.1. Les approches globales

– techniques basées sur le séquençage ou l'amplification par PCR

Le séquençage des ESTs

La stratégie EST, en simplifiant le séquençage, permet la constitution rapide d'un catalogue, même partiel. Le profil d'expression établi à partir de ce catalogue permet d'apprécier les niveaux d'activité de différents gènes, reflétés par la fréquence d'apparition de l'EST correspondante (Okubo *et al.*, 1992).

L'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE)

Cette technique a été développée par Velculescu *et al.* (1995) et permet une analyse rapide, quantitative et simultanée d'un grand nombre de transcrits. Une condition préalable à l'identification des étiquettes est la disponibilité, dans les banques de données, d'un grand nombre de séquences de l'organisme à étudier (Bouchez & Höfte, 1998). La SAGE est basée sur deux principes:

- une petite étiquette nucléotidique de 9 à 10 paires de bases contient suffisamment d'information pour identifier sans ambiguïté un transcrit,
- la mise bout à bout des étiquettes permet l'analyse en série des transcrits en séquençant un seul clone contenant toutes les étiquettes assemblées.

La figure 21 illustre le principe de cette technique.

L'application de cette technique a fourni des informations précieuses lorsqu'elle a été appliquée à divers systèmes biologiques (Chen *et al.*, 2000). Les résultats ont montré que la SAGE peut fournir des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs quant à l'expression des gènes (Velculescu *et al.*, 1995). Cependant, cette technique n'est pas très pratique pour la comparaison de nombreux échantillons différents et pour l'étude des transcrits les plus rares (Bouchez & Höfte, 1998). La SAGE peut également être utilisée pour identifier de nouveaux transcrits, mais dans ce cas, cette technique est couplée à une réaction de PCR afin de générer des étiquettes plus longues (Chen *et al.*, 2000). La première application de la SAGE dans le domaine végétal a été réalisée par Matsumura *et al.* (1999), qui ont etudié plus de 10000 étiquettes issues d'environ 6000 gènes exprimés chez le riz.

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

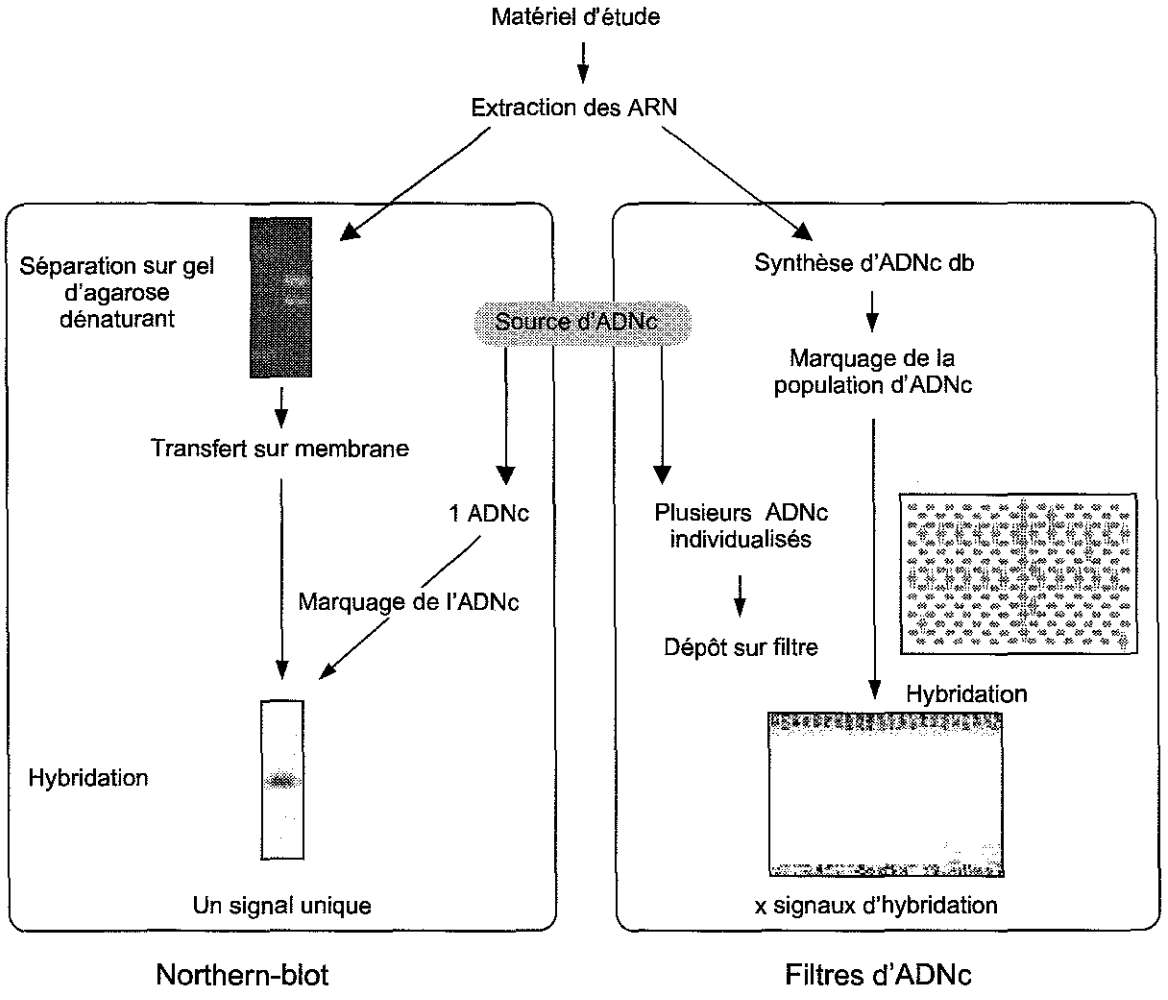


Figure 22. Comparaison de deux techniques d'analyse de l'expression des gènes: northern-blot et filtre d'ADNc.

Northern-blot, les ARN du tissu étudié sont extraits puis séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes, puis les ARN sont transférés et fixés sur une membrane de nylon. Ils sont ensuite hybridés avec un excès de sonde marquée, constituée de l'ADNc correspondant au gène dont on veut étudier l'expression. L'intensité de l'hybridation est fonction de la quantité de transcrits présents sur la membrane. **Filtres d'ADNc**, les ADNc correspondant aux gènes dont on veut étudier l'expression sont déposés sur une membrane de nylon et fixés. Les ARN du tissu étudié (dans un état physiologique donné) sont extraits puis rétro-transcrits en ADNc. Cette population d'ADNc constitue la sonde avec laquelle sont hybridés les filtres. L'intensite de l'hybridation est fonction de la quantité d'ADNc présents dans la sonde complexe.

– techniques basées sur l'hybridation moléculaire

Le point de départ a été l'observation suivante: l'ADN dénaturé, simple brin peut se fixer fortement aux membranes de nitrocellulose de telle façon que les deux brins complémentaires ne peuvent pas se réassocier, et permettent ainsi l'hybridation avec un ADN ou un ARN complémentaire (Gillespie & Spiegelman, 1965). Cette méthode simple a conduit à l'obtention de résultats fondamentalement importants, comme les méthodes de "blotting", la première desquelles combinait l'hybridation sur filtre à une séparation sur gel de fragments restreints. Cette méthode allait donner le Southern-blot (Southern, 1975). L'automatisation et la miniaturisation des dot-blot, a permis de montrer que les techniques d'hybridation pouvaient être utilisées à grande échelle afin d'exploiter les résultats provenant des programmes de génomique (Lennon & Lehrach, 1991).

Les filtres d'ADNc

Dans cette partie, le terme de filtre d'ADNc regroupera à la fois les dépôts d'ADNc réalisés sur membranes (nylon ou nitrocellulose) et les dépôts sur lame de verre.

Cette technique diffère de celle des northern-blot par plusieurs aspects qui sont illustrés sur la figure 22, et est parfois appelée technique de "réverse-northern".

Selon la nature du support, la source de l'ADN déposé et le système de détection, on peut distinguer plusieurs techniques.

- Filtres à moyenne densité en ADNc

Le système le plus simple, le plus souvent utilisé et le plus facilement utilisable est celui qui utilise de l'ADNc déposé sur membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive. L'utilisation d'ADNc déposé directement à la surface de membranes de nylon est plus sensible que l'utilisation de colonies bactériennes lysées comme source d'ADN. Les ADNc peuvent provenir des banques de données telles que GenBank (Benson *et al.*, 1997), dbEST (Boguski *et al.*, 1993) et UniGene (Schuler *et al.*, 1996b). Cependant, des ADNc pleine longueur ou des ESTs provenant de n'importe quelle banque d'intérêt peuvent être utilisés (Duggan *et al.*, 1999). En général, des produits PCR purifiés sont déposés sur le support. Chaque dépôt est composé de quelques nanolitres de produit PCR purifié à 100-500 µg/ml.

Le dépôt peut se faire manuellement, ou par l'intermédiaire de robots qui vont déposer les produits PCR en série sur plusieurs supports à la fois. Les premiers robots nécessitaient un contact avec la surface, rappelant un peu le principe des stylos à encre. De nombreuses évolutions de ces robots sont maintenant disponibles, des modes d'impression sans contact, utilisant les techniques de jet d'encre, ont été mis au point. Les types de membrane utilisés sont en nitrocellulose ou en nylon chargé positivement. Des membranes sur lesquelles sont déposés

des jeux de clones sont disponibles chez Clontech, Genome Research ou encore Research Genetics (Bowtell, 1999).

Les sondes utilisées sont les représentations des contenus en ARNm des cellules. Généralement, le marquage est réalisé en même temps qu'une étape de transcription inverse à partir d'un oligo(dT). Lorsque des sondes radioactives sont utilisées, le ^{33}P est préféré au ^{32}P, plus énergétique, car il permet une meilleure résolution. En effet, un fort signal d'hybridation avec un dépôt donné pourrait interférer avec la détection de signaux d'hybridation plus faible le jouxtant.

Ce système a été testé avec succès sur environ 800 ESTs d'*Arabidopsis* en donnant des résultats reproductibles (Desprez *et al.*, 1998). Une densité de dépôt de 6144 ADNc sur une membrane de 8x12 cm a pu être obtenue. Cette technique peut être utilisée pour détecter des transcrits faiblement représentés jusqu'à 1:10000. Le principal défaut des membranes est que la comparaison des niveaux d'expression des transcrits entre deux échantillons nécessite l'hybridation de chaque échantillon sur des membranes dupliquées ou bien sur une seule membrane qui devra être séquentiellement déshybridée et réhybridée (Bowtell, 1999).

- Filtres à haute densité en ADNc

C'est un système plus sophistiqué que le précédent qui utilise des dépôts à haute densité sur un support en verre prétraité (Schena *et al.*, 1995; DeRisi *et al.*, 1997). Le verre possède de nombreux avantages en communs avec les supports de membrane de nylon ou de nitrocellulose. Mais il possède en plus des avantages qui lui sont propres (Cheung *et al.*, 1999):

- les échantillons d'ADN peuvent être fixés de façon covalente sur la surface de verre traitée qui a été enduite de poly-lysine, ou autres dérivés de silanes qui permettent d'augmenter l'hydrophobicité du verre et l'adhérence des ADNc déposés,
- le verre est un matériau durable qui supporte les hautes températures et les lavages à fortes forces ioniques,
- le verre est non-poreux et donc le volume d'hybridation peut être réduit au maximum, augmentant ainsi les cinétiques d'hybridations entre les cibles et les sondes,
- du fait de sa faible fluorescence il permet l'utilisation de sondes fluorescentes en limitant le bruit de fond dû au support,
- deux sondes différentes peuvent être marquées avec des fluorochromes différents et incubées simultanément avec un filtre d'ADNc lors d'une seule réaction, alors que les filtres à moyenne densité sur membrane sont restreints à des hybridations en série ou en parallèles.

Des robots sont nécessaires pour réaliser de tels dépôts. Ils sont caractérisés par deux technologies différentes. La première consiste en des microdépôts mécaniques. La version

originale de ce système de dépôt a été développée dans le Laboratoire de Pat Brown à l'Université de Stanford (Schena *et al.*, 1995; Shalon *et al.*, 1996) puis commercialisée par Synteni (Fremont, CA, USA). Le dépôt s'accompagne d'un contact direct entre le support et le mécanisme de dépôt qui contient un jeu d'aiguilles ou de capillaires qui vont permettre le transfert. Quelques-uns des avantages de cette technologie sont son faible coût, sa souplesse d'utilisation. La densité des filtres ainsi obtenus est d'environ 10000 dépôts sur environ 3,6 cm^2. Les prochaines améliorations devraient conduire au dépôt de 100000 gènes sur 6,5 cm^2 (Schena *et al.*, 1998).

La deuxième technologie repose sur l'adaptation de la technologie jet d'encre qui utilise une propulsion piézoélectrique pour délivrer l'ADN. Elle ne nécessite donc pas de contact direct avec la surface de dépôt. Cette technologie est développée par les sociétés Incyte Pharmaceuticals et Protogene (Palo Alto, CA, USA). La densité des filtres ainsi obtenus est d'environ 10000 dépôts par cm^2. Si la précision et la reproductibilité des dépôts est très bonne par cette méthode, elle a comme inconvénients sa lenteur et quelques autres problèmes dus à la technologie jet d'encre, comme l'encrassage des pointes (François, 2000). Un autre frein à cette technique est, à l'heure actuelle, son coût élevé.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation du verre permet l'utilisation de sondes marquées à l'aide de fluorochromes. En général, ce sont Cy3-dUTP et Cy5-dUTP (fluorescents en vert et rouge respectivement) qui sont associés car ils possèdent une forte efficacité d'incorporation lors de l'étape de transcription inverse, ils ont des spectres d'excitation et d'émission bien séparés ainsi qu'une bonne photostabilité. Les signaux d'hybridation sont alors détectés à l'aide d'un microscope confocal. Les filtres à haute densité en ADNc ont une forte sensibilité: les ARNm dont l'abondance est inférieure ou égale à 1:100000 peuvent être détectés, ce qui chez la levure correspond à 0,15 molécule d'ARNm par cellule (soit 1 copie pour 5 à 10 cellules).

Les filtres d'oligonucléotides

Le principe de base d'utilisation de filtres d'oligonucléotides a été proposé à la fin des années 1980, lorsque plusieurs groupes ont développé indépendamment le concept de séquençage par hybridation (Chetverin & Kramer, 1994). Son utilisation a ensuite porté sur l'étude des profils d'expression.

Deux principales procédures permettent l'obtention de ces filtres d'oligonucléotides: tout d'abord le dépôt sur lame de verre d'une solution d'oligonucléotides préalablement synthétisés à l'aide d'un robot où l'on peut atteindre 30000 dépôts par cm^2 (Yershov *et al.*, 1996). L'autre principe repose sur la synthèse *in situ* des acides nucléiques et est appelé photolithographie. Cette technologie a été développée par Fodor *et al.* (1991) et la société Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) (Pease *et al.*, 1994; Lipschutz *et al.*, 1995), elle combine la technologie de photolithographie de l'industrie des semi-conducteurs avec la chimie de synthèse de l'ADN.

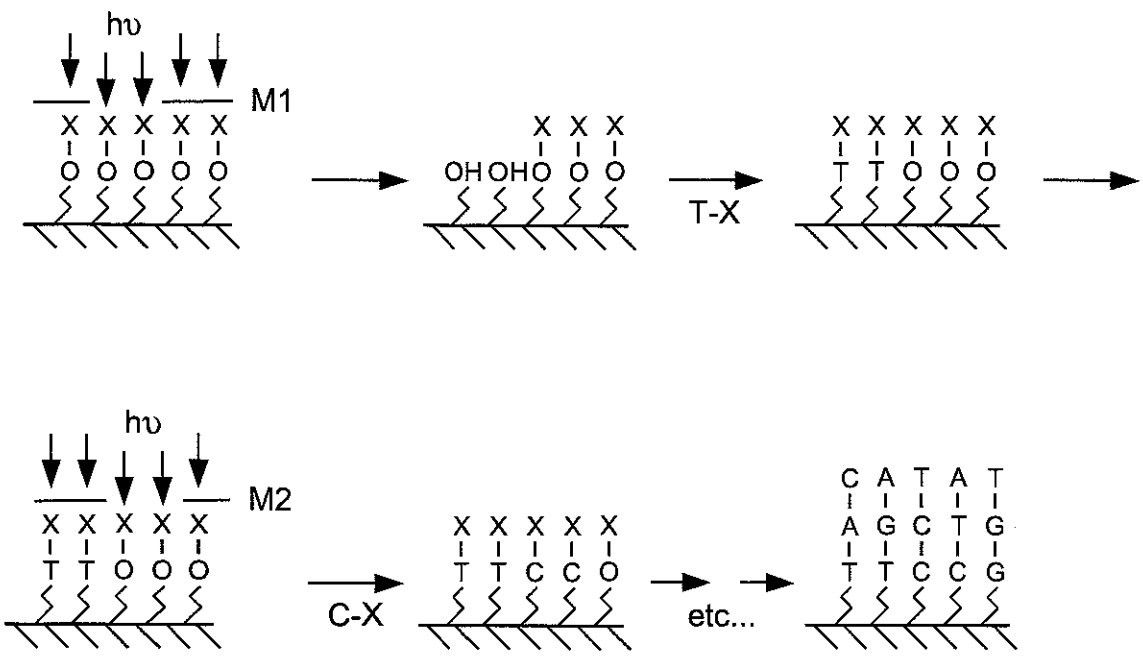


Figure 23. Principe de la synthèse *in situ* des oligonucléotides par photolithographie.
La surface portant des extrémités hydroxyles photoprotégées (O-X) est éclairée au travers d'un masque photolithographique (M1), générant ainsi des groupes hydroxyles libres dans les régions photodéprotégées. Les groupement hydroxyles sont alors couplés à un désoxynucléoside phosphoramidite (photoprotégé en 5'). Un nouveau masque (M2) est alors appliqué, et un second phosphoramidite photoprotégé est couplé. Les cycles d'éclairage et de couplage sont répétés jusqu'à ce que les oligonucléotides désirés soient produits (modifié d'après Pease *et al.*, 1994).

La photolithographie utilise une source de lumière ultraviolette qui passe à travers un masque qui dirige le lieu de la réaction photochimique (c'est-à-dire la synthèse de l'oligonucléotide) sur la surface de verre siliconée. Le principe de cette technologie est illustré par la figure 23. Toutefois, les oligonucléotides ne peuvent pas dépasser 25 nucléotides de long. Les filtres ainsi obtenus sont ensuite hybridés à l'aide de sondes fluorescentes et les signaux détectés comme nous l'avons vu précédemment.

Un des avantages de cette technique est que les filtres peuvent être réalisés directement à partir de séquences présentes dans les banques de données. D'autre part, l'utilisation de composés synthétiques minimise les variations de filtre à filtre. Cependant, cette technique nécessite encore un appareillage coûteux (Schena *et al.*, 1998). La densité de ces filtres peut atteindre plusieurs centaines de milliers d'oligonucléotides par cm^2 de support (Celis *et al.*, 2000). La sensibilité de cette méthode permet de détecter un transcrit présent à une copie pour 10 à 20 cellules.

Les filtres d'oligonucléotides ont été utilisés chez la souris, la levure et les bactéries (Lockhart *et al.*, 1996; Wodicka *et al.*, 1997; DeSaizieu *et al.*, 1998). Chez l'homme, de nombreuses études ont utilisé cette technologie (http://www.affymetrix.com) Toutefois, aucune étude chez les plantes n'apparaît, probablement parce que l'emploi de cette technologie nécessite la connaissance d'une grande partie sinon de tout le génome de l'organisme (Kuhn, 2001).

1.3.3.2.2. Techniques ciblées

A côté des approches globales que nous venons de voir, les recherches peuvent être ciblées sur un groupe d'ARNm dans le but d'identifier les gènes impliqués dans un processus défini. La sélection d'une sous-population d'ARNm est réalisée classiquement par soustraction ou par comparaison (Hatey *et al.*, 1998).

– criblage différentiel de banques d'ADNc

C'est la plus ancienne méthode pour isoler des ADNc différentiellement exprimés, les banques pouvant être plasmidiques ou phagiques. En principe, le criblage différentiel peut être utilisé pour identifier les gènes différentiellement régulés. Cependant en pratique, cette méthode n'est efficace que si l'ARNm d'intérêt représente plus de 0,05% des ARNm totaux dans une cellule et moins de 0,01% dans l'autre (Sambrook *et al.*, 1989). La sensibilité de cette méthode peut être accrue en utilisant d'abord une technique de soustraction qui va conduire à un enrichissement en séquences spécifiques (Kuhn, 2001). Cette sous-population enrichie pourra alors servir soit de sonde pour cribler une banque d'ADNc, soit de base pour la construction d'une banque d'ADNc soustraite. Toutefois cette méthode est considérée laborieuse et peu efficace, d'autant plus que des messagers rares sont concernés.

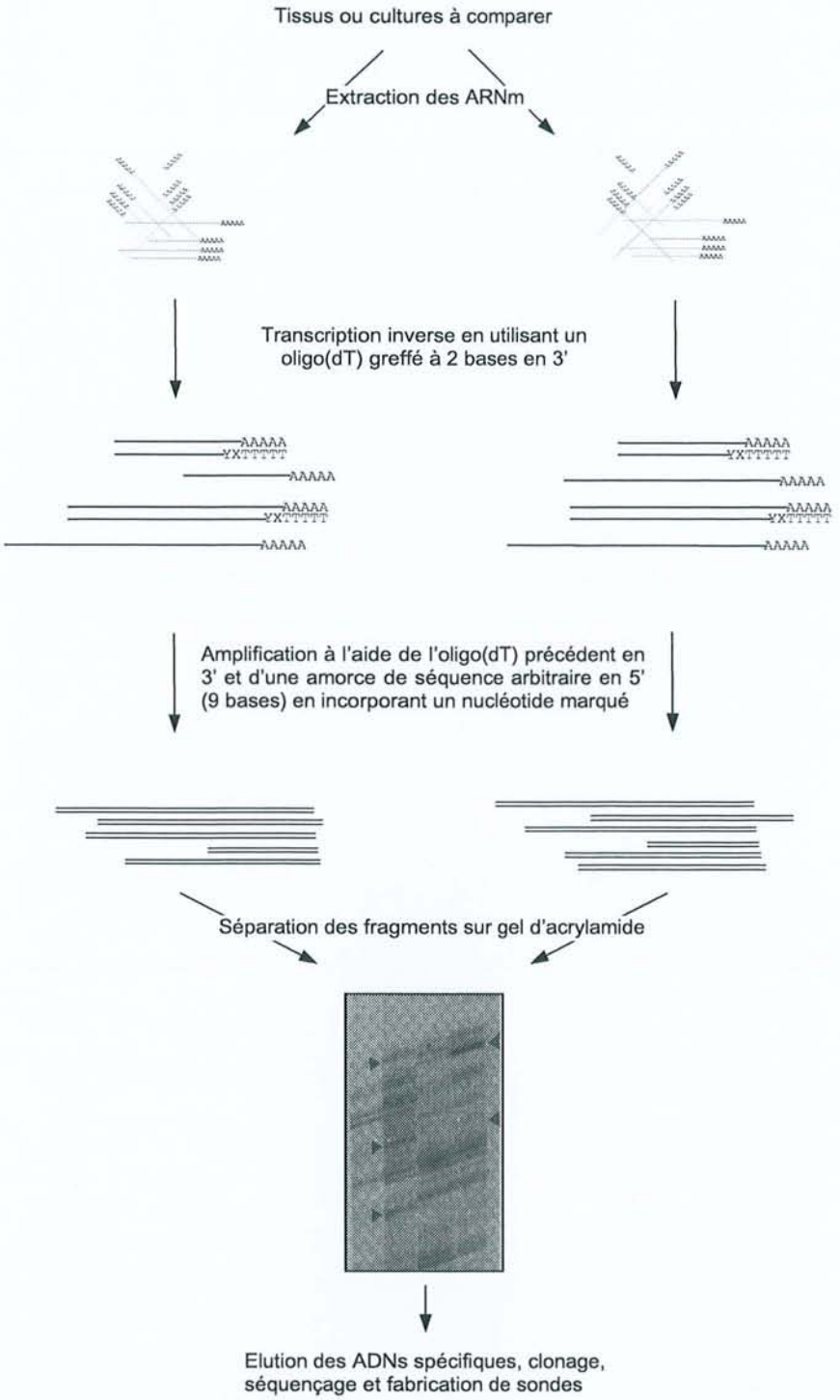


Figure 24. Schéma de la technique de tri différentiel d'ARN.
Les ARNm sont extraits des tissus comparés puis rétrotranscrits à l'aide d'une amorce oligo(dT) comprenant en 3' deux bases supplémentaires. Il existe 12 amorces oligo(dT) possibles, et autant de rétrotranscriptions. Les ADNc simple-brin sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide de l'oligo(dT) et d'une amorce aléatoire en 5' de 8 à 10 bases. Plusieurs réactions PCR sont réalisées avec différentes amorces aléatoires. Les produits d'amplification sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide et les profils électrophorétiques sont comparés, pour un même couple d'amorce, entre les tissus de départ. Les bandes spécifiques peuvent alors être éluées, clonées, séquencées et faire l'objet d'études de régulation par exemple (d'après Liang & Pardee, 1992).

Cette méthode a été très appliquée chez les plantes et cela dès 1984 (Hershey *et al.*). Elle a permis l'isolement de séquences d'ADNc correspondant à des gènes exprimés spécifiquement lors du développement de la fleur chez le tabac (Goldman *et al.*, 1992) et *Sinapsis alba* (Staiger & Apel, 1993) et la caractérisation d'ADNc de la fleur mâle du maïs (Wright *et al.*, 1993).

– le tri différentiel d'ARN

Cette technique, plus connue sous le nom de "mRNA differential display", est la première conçue pour l'analyse de l'expression en masse des gènes et pour l'identification de gènes différentiellement exprimés. Elle a été développée en 1992 par Liang & Pardee. La stratégie générale consiste à amplifier des sous-populations d'ARNm, en utilisant la rétro-transcription et la PCR, afin d'obtenir une population de fragments PCR présentant un polymorphisme de taille. Pour ce faire, Les ARNm sont répartis en 12 lots et rétro-transcrits en utilisant 12 amorces oligo(dT) (car il existe 12 combinaisons possibles qui déterminent les deux dernières bases en 3' de l'oligo(dT) en omettant le T pour l'avant-dernière). Les ADNc ainsi générés sont amplifiés en utilisant la même amorce oligo(dT) et une séquence aléatoire d'une dizaine de bases. Lors de la PCR, un nucléotide marqué est incorporé, et le produit d'amplification est séparé sur gel de séquençage et visualisé par autoradiographie (Figure 24). Les fragments d'intérêts peuvent alors être découpés du gel, purifiés, clonés et séquencés.

Cette méthode a été très largement utilisée, ce qui a mis à jour ses limites: sa reproductibilité est très variable et en général faible, elle génère des faux positifs et introduit un biais pour les messagers fortement représentés, certains signaux d'ARNm sont sous-représentés et redondants, et elle demande beaucoup de travail (Ledakis *et al.*, 1998). Depuis, des aménagements ont été fait, en particulier les amorces oligo(dT) n'ont plus qu'une seule base variable en 3' (d'où 3 combinaisons), les amorces aléatoires sont en général plus longues (20-mer) et les méthodes de séparation des produits d'amplification utilisent aujourd'hui l'électrophorèse capillaire, ou bien l'électrophorèse en gel d'agarose (Kuhn, 2001). D'autre part, parce que l'amplification commence à partir de la fin de l'ARNm, les amplicons sont constitués en grande partie de la région 3' non traduite. Ils ne contiennent donc pas l'information nécessaire pour réaliser des recherches d'homologies dans les banques de données.

La simplicité de la technique en a fait une méthode très utilisée. Depuis 1992 des centaines d'applications ont été rapportées chez de nombreux organismes. En particulier chez les plantes le tri différentiel d'ARNm a été appliqué pour identifier et isoler des ADNc induits dans différentes conditions de stress (Kuhn, 2001).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
54506 VILLERS-LES-NANCY

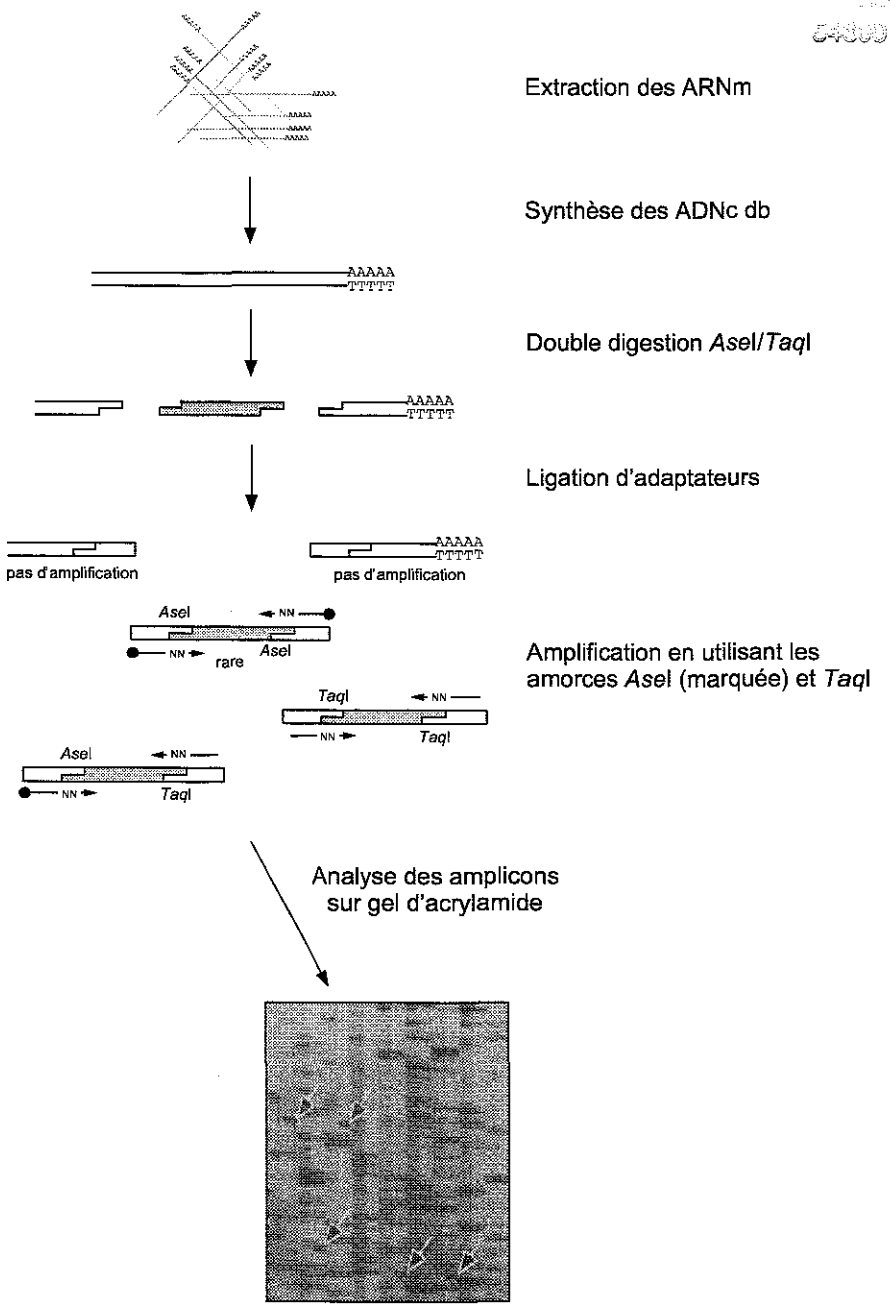


Figure 25. Schéma de la technique d'ADNc-AFLP.
Les ADNc double-brin sont synthétisés à partir des ARNm extraits des tissus à comparer puis restreint par deux enzyme *TaqI* et *AseI* qui reconnaissent 4 et 6 pb respectivement. Cinq types de molécules sont obtenues selon leurs extrémités. Des adaptateurs sont alors ligués aux ADNc digérés afin de permettre une amplification par PCR en deux temps: dans une premier temps des amorces spécifiques des adaptateurs mais sans extensions sont utilisées, puis le produit d'amplification sert de matrice à une deuxième PCR qui utilise des amorces comportant à leurs extrémités 3' deux nucléotides supplémentaires permettant ainsi uniquement l'amplification d'une sous-population de l'amplifiat précédent. Les produits d'amplification sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide et visualisés par autoradiographie. La plupart des bandes correspondent à des fragments *AseI/TaqI* car les fragments *AseI/AseI* sont rares et les fragments *TaqI/TaqI* sont trop courts et non visibles sur gel. Les bandes spécifiques peuvent alors être éluées, clonées, séquencées et faire l'objet d'études de régulation par exemple (modifié d'après Kuhn, 2001).

– le polymorphisme de longueur de fragments d'ADNc amplifiés (ADNc-AFLP)

Quelques comparaisons entre cette méthode et la méthode précédente ont été publiées, et il en est ressorti que l'ADNc-AFLP était en plusieurs points supérieure au tri différentiel d'ARN (Habu *et al.*, 1997; Jones & Harrower, 1998).

L'ADNc-AFLP est une technique d'empreintes d'ARN qui s'inspire de l'AFLP d'ADN génomique décrite par Vos *et al.* (1995). L'ADNc-AFLP classique décrite par Bachem *et al.* (1996) utilise le protocole de l'AFLP sur une matrice ADNc. Cette technique consiste en trois étapes:

- une digestion de l'ADNc avec deux enzymes de restriction en général *Ase*I et *Taq*I (l'une à six, l'autre à quatre bases) et une ligation avec des adaptateurs,
- une amplification sélective des fragments restreints par l'utilisation d'amorces PCR comportant deux nucléotides spécifiques en 3' (donc 16 amorces possibles, or il y a une amorce spécifique à chaque enzyme, cela fait par conséquent 256 combinaisons possibles),
- et une analyse sur gel des fragments amplifiés (Figure 25).

La taille des produits obtenus varie entre 100 et 1000 pb, leur nombre est d'environ 40 par couple d'amorce et ils sont généralement issus de la double digestion *Ase*I/*Taq*I. En effet, les fragments *Ase*I/*Ase*I sont rares, et les fragments *Taq*I/*Taq*I ne sont pas visibles sur gel.

Cette technique a été modifiée en 1997 par Habu *et al.* qui a montré que 45 % des séquences connues chez la pomme de terre sont clivées par le couple *Ase*I/*Taq*I. Donc plus de la moitié des transcrits ne seraient pas détectés par la technique classique. Ces auteurs n'ont donc utilisé qu'une seule enzyme de restriction, *Taq*I.

L'ADNc-AFLP a été appliqué aux plantes pour la première fois par Bachem *et al.*(1996). Depuis, seulement un faible nombre d'études ont décrit l'utilisation de cette technique chez les plantes et les animaux. Toutefois les résultats sont bien reproductibles et généralement les faux positifs sont rares (Kuhn, 2001). Malgré tout, l'inconvénient majeur de cette technique reste la nécessité de sites de restriction appropriés sur les molécules d'ADNc. De ce fait, plusieurs expériences d'ADNc-AFLP utilisant différentes enzymes sont nécessaires pour visualiser tous les ADNc présents dans une cellule.

L'ADNc-AFLP peut également être couplée au tri différentiel, on parle alors de RC4D (Restriction fragment length polymorphism-Coupled Domain Directed Differential Display). Cette méthode est spécifiquement conçue pour analyser l'expression de familles multigéniques (Fischer *et al.*, 1995). En effet, au lieu d'utiliser les amorces aléatoires du tri différentiel, des amorces dirigées contre un domaine spécifique d'une famille multigénique sont utilisées. Les produits d'amplification étant homogènes en taille, un polymorphisme de longueur est introduit par digestion à l'aide d'une enzyme de restriction.

– la stratégie de soustraction

Dans les méthodes de soustraction, le but est d'enrichir la population d'ADNc en molécules spécifiques d'un type cellulaire ou d'une condition donnée (de culture par exemple) en éliminant les séquences communes à plusieurs types cellulaires ou à plusieurs conditions. En général elles impliquent l'hybridation des ADNc d'une population (tester) à un excès d'ADNc d'une autre population (driver) puis la séparation de la fraction non-hybride (cible) des séquences communes hybridées. Cette dernière étape peut être réalisée à l'aide d'une chromatographie hydroxylapatite, une fixation avidine-biotine, ou à l'aide de billes de latex auxquelles a été greffé un oligo(dT) (Diatchenko *et al.*, 1996). Toutefois, la technique décrite par Hubank & Schatz (1994), l'analyse de différences de représentation (RDA), ne nécessite pas de séparation physique entre les ADNc simples et doubles brins.

En 1996, Diatchenko *et al.* ont développé une méthode de soustraction couplée à la PCR, appelée hybridation soustractive et suppressive. Cette technique sera détaillée dans le chapitre "matériel et méthodes", et les avantages et les inconvéniants seront discutés dans la discussion générale.

Cependant, les ARNm ne sont que des intermédiaires dans la voie de production des protéines fonctionnelles. Comme nous allons le voir par la suite, des méthodes ont été développées afin d'évaluer les niveaux de protéines, directement ou indirectement.

1.3.3.3. Analyse des profils d'expression des protéines

Wilkins *et al.* (1996) ont défini le protéome comme étant l'ensemble des **protéines** codées par le génome, et cette définition a été élargie pour inclure les protéines exprimées à la fois dans l'espace et le temps. Les résultats concernant l'expression des protéines sont plus informatifs que ceux qui concernent les niveaux de transcrits, mais ils sont aussi plus difficiles à obtenir. En effet, certains messagers sont transcrits mais non traduits, le nombre de copies d'ARNm ne reflète pas nécessairement le nombre de protéines fonctionnelles correspondantes (Anderson & Seilhamer, 1997). D'autre part, la protéomique s'intéresse à des problèmes auxquels l'analyse d'ADN ne peut pas répondre, comme l'abondance relative d'une protéine, les modifications post-traductionnelles, le turnover, les interactions avec d'autres protéines ainsi que les aspects fonctionnels (Celis *et al.*, 2000). De plus, les travaux de Gygi *et al.* (1999) ont montré qu'il existait une corrélation insuffisante entre les niveaux d'ARNm et de protéines pour pouvoir prédire à partir de données quantitatives de transcrits les niveaux d'expression des protéines. Ceci suggère fortement que les processus de dégradation des transcrits, l'épissage alternatif, les modifications co-et post-traductionnelles, et la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes sont des processus essentiels qui rendent difficile l'extrapolation des profils d'expression des transcrits aux profils des protéines (Steiner & Witzmann, 2000).

Toutefois, les travaux menés sur le cancer de la vessie ont montré que pour environ 40 protéines, il existait une bonne corrélation entre les taux de transcrits et les taux de protéines (Celis *et al.*, 2000). Les filtres à ADN et l'approche protéomique sont donc complémentaires. Cependant, il n'y a qu'un nombre limité d'études pour lesquelles les deux technologies ont été comparées par leur utilisation sur un même échantillon (Celis *et al.*, 2000).

La technologie protéomique est complexe, elle comprend un grand nombre de techniques pour séparer (gels 2D à haute résolution), quantifier (phosphorimager, scanner), identifier et caractériser les protéines (microséquençage, spectrométrie de masse), ainsi que stocker (banques de données de gels 2D; http://biobase.dk/cgi-bin/celis; http://expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.html), communiquer et faire le lien entre les séquences nucléotidiques et protéiques (bioinformatique) (Celis *et al.*, 2000). Les composants centraux de la protéomique impliquent essentiellement les gels d'électrophorèse bidimensionnels (2D SDS-PAGE; Klose & Kobalz, 1995) et la spectrométrie de masse (MS; Moniatte *et al.*, 1996; Roepstorff, 1997; Dukan *et al.*, 1998). Des ouvrages récents abordent les différentes méthodologies et passent en revue les progrès significatifs de ces technologies (Wilkins *et al.*, 1996; Link, 1999; Rabilloud, 2000).

Un certain nombre de travaux se sont focalisés récemment sur la faisabilité de filtres de protéines. Le premier concept repose sur la construction d'une banque d'expression d'ADNc comprenant en 5' de leur séquence une étiquette histidine permettant la purification ultérieure du produit de traduction (Larsson *et al.*, 2000). Ces protéines serviront ensuite à la production d'anticorps spécifiques qui pourront être déposés sur filtres afin d'étudier les profils d'expression des protéines. De même, les filtres de protéines pourront être utilisés pour étudier les interactions protéine-protéine (Larsson *et al.*, 2000). Afin d'étudier ces interactions protéine-protéine ou protéine-ADN ou autre ligand, Lueking *et al.* (1999) proposent de réaliser des filtres de protéines sur membrane PVDF (polyvinylidene difluoride) à partir de cultures bactériennes exprimant les protéines à déposer. La miniaturisation du système permet de déposer environ 4800 échantillons sur une surface de 18,75 cm^2, la sensibilité de détection étant de 10 pg de protéine (Lueking *et al.*, 1999). Le Laboratoire de Pat Brown a entrepris la mise au point de filtres d'anticorps ou d'antigènes pour la quantification de protéines dans des mélanges complexes (Haab *et al.*, 2001). De par leur stabilité supérieure, il apparaît que les filtres d'anticorps sont davantage performants par rapport aux filtres d'antigènes. Le principe est le même que pour les filtres d'ADNc, les deux solutions sont marquées à l'aide d'un fluorochrome sur le groupement amine des protéines, et le rapport de fluorescence au niveau de chaque signal correspond au rapport de concentration de chaque protéine dans les deux solutions à tester. La limite de détection est d'environ 20 pg, mais elle est amenée à être améliorée lors des perfectionnements de la méthode.

Dans l'étude des interactions protéine-protéine, le système double-hybride de la levure est également un outil puissant (Fields & Song, 1989). C'est une méthode génétique basée sur la structure modulaire de facteurs de transcription pour lesquels le rapprochement du domaine de fixation à l'ADN et du domaine d'activation induit une augmentation de la transcription d'un

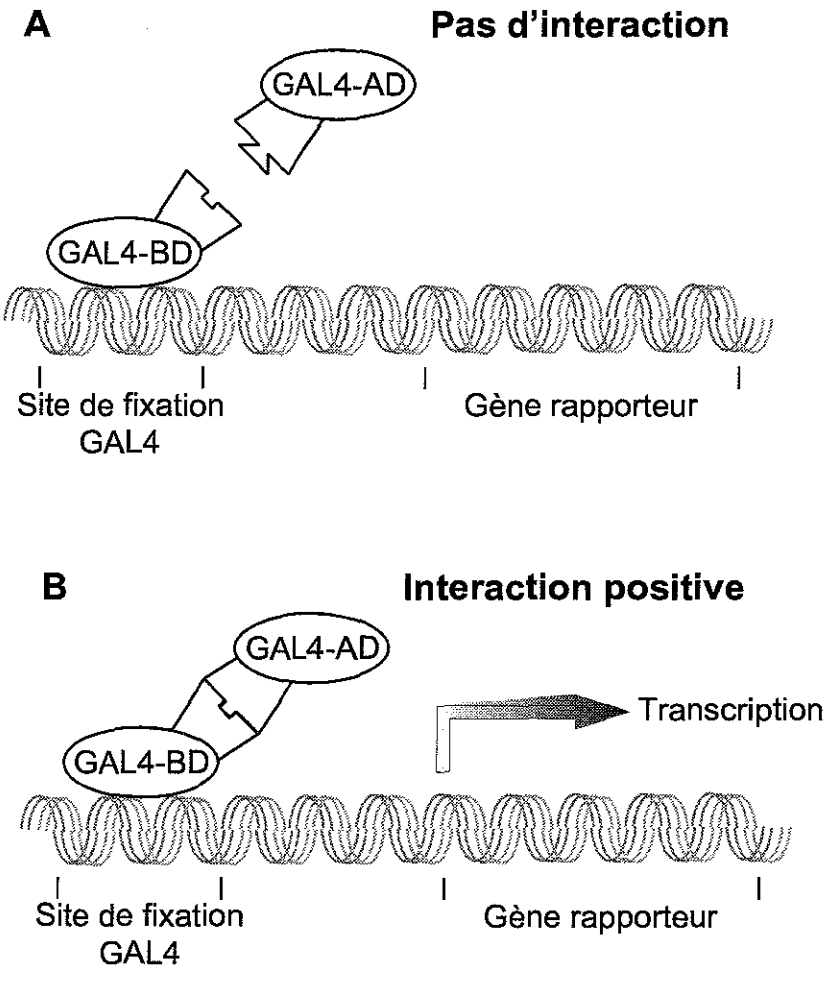


Figure 26. Le système double-hybride de la levure.
A, Des ORFs différentes sont exprimées sous forme de protéines de fusion avec soit le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 (GAL4-BD) ou son domaine d'activation (GAL4-AD). Si les protéines codées par les ORFs n'interagissent pas entre elles, les protéines de fusion ne vont pas entrer en contact et il n'y a pas d'activation de la transcription du gène rapporteur contenant en amont les sites de fixation de GAL4. **B**, Si les ORFs codent des protéines qui interagissent entre elles, les protéines de fusion s'assemblent au niveau du site de fixation de GAL4 situé en amont du gène rapporteur, ce qui active la transcription de celui-ci (modifié d'après Pandey & Mann, 2000).

certain nombre de gènes. Le système de la levure utilise des ORFs fusionnées au domaine de fixation à l'ADN ou au domaine d'activation de GAL4 de telle façon qu'une augmentation de la transcription d'un gène rapporteur soit observable lorsque les protéines codées par les deux ORFs interagissent dans le noyau de la levure (Figure 26). Cette méthode a été adaptée pour des criblages à grande échelle, soit d'après la méthode de filtres, ou bien comme variation de la technique de criblage de banque (Pandey & Mann, 2000).

1.3.3.4. La génétique pour l'étude de la fonction d'un gène

La génétique est l'étude de variants naturels ou bien induits par mutagenèse. Les approches de mutagenèse ont été très utilisées ces dernières années pour les études génétiques et moléculaires de nombreux caractères en biologie des plantes. L'accès aux gènes mutés est obtenu en utilisant des stratégies de clonage dépendant de la position des gènes sur la carte génétique de l'organisme considéré.

1.3.3.4.1. Mutagenèse insertionnelle

Cette technique permet de cloner rapidement un gène muté. Les éléments capables de s'insérer au hasard dans les chromosomes tels les transposons (Martienssen, 1998) ou l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* (Azpiroz-Leehan & Feldmann, 1997), peuvent être utilisés chez les plantes comme agents mutagènes pour créer des mutations par perte de fonction. Comme la séquence de l'élément inséré est connue, le gène dans lequel il s'est inséré peut être facilement identifié. Chez *Arabidopsis*, il existe pour chaque gène, un mutant insertionnel dans les banques de données mondiales (Terryn *et al.*, 1999).

1.3.3.4.2. La génétique inverse: du gène à la fonction

Une façon de connaître la fonction d'un gène identifié par séquençage est de créer une mutation par perte de fonction et d'étudier le phénotype du mutant ainsi obtenu. La recombinaison homologue peut être utilisée pour cibler une mutation dans un gène précis en remplaçant le gène sauvage par un allèle muté. Bien que cette méthode soit applicable aux micro-organismes et à la souris, son contrôle chez les plantes est très difficile à cause de nombreux évènements de recombinaison illégitime (Puchta & Hohn, 1996). Toutefois, certaines réussites ont été rapportées (Miao & Lam, 1995; Kempin *et al.*, 1997).

Une procédure alternative, très efficace, provient de la disponibilité de collections de plantes mutagenéisées soit par un transposon ou bien par l'ADN-T. L'utilisation de l'outil PCR avec des amorces spécifiques de l'élément insertionnel et du gène d'intérêt permet de détecter un événement d'insertion dans le gène.

Les premiers résultats de mutation ciblée chez *Arabidopsis* (Gilliland *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1998) ont montré qu'une analyse fine des mutants est souvent nécessaire pour détecter les

effets d'une mutation. D'autre part, il apparaît que le génome des eucaryotes est assez redondant avec des gènes dupliqués en familles (Bevan *et al.*, 1998). L'analyse fonctionnelle de telles familles de gènes nécessite souvent la construction de lignées contenant plusieurs mutations dans les différents membres de la famille (Bouchez & Höfte, 1998).

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Tableau 20. Détails et caractéristiques des sites de récolte des isolats fongiques.

Caractéristique des sites de récolte des carpophores	*Isolats*
Sites pollués	
Chrzanow. Pologne. Sol riche en minerai de cuivre et de zinc, au voisinage de déchets de zinc.	*Paxillus involutus* (P18, P19, P20, P21),
Cd: 50; Cu: 44-200; Ni: 0.15; Zn: 9795.	*Suillus luteus* (P11, P41)
La Calamine (Kelmis). Belgique. Activités de mine depuis le 9ème siècle, minerai superficiel.	*Paxillus involutus* (B07)
Cd: 2; Cu: 20; Zn: 4101.	
Maatheide (Lommel). Belgique. Sol contaminé en cadmium, cuivre et zinc. Ancienne fonderie de zinc.	*Paxillus involutus* (B08, B10, B12, B13),
Cd: 39; Cu: 1300; Zn: 11425.	*Suillus luteus* (B04), *Scleroderma citrinum* (B06)
Villerupt-D. France. Site pollué. Ancienne fonderie de fer.	*Suillus luteus* (F10), *Paxillus involutus* (F11)
Cd: 2.88; Cu: 117; Ni: 103; Zn: 1648.	
Plombières. Belgique. Activités de mine depuis le 9ème siècle, minerai superficiel. Ancienne fonderie de zinc.	*Paxillus involutus* (B06)
Cd: 41; Cu: 738; Zn: 20961.	
We1-nowiec (Katowice). Pologne. Déchets industriels de zinc.	*Pisolithus tinctorius* (Pa, Pb)
Cd: 43; Cu: 882; Ni: 1794; Zn: 800-3333.	
Sites non-pollués	
Manskogstjarn. Suède.	*Paxillus involutus* (S02)
Villerupt-E. France.	*Suillus luteus* (F02, F05, F07, F09)
Cd: 0.04; Cu: 2.1; Ni: 74.9; Zn: 249.	
Midlothian. Ecosse.	*Paxillus involutus* (Sc01)
Montpellier. France.	*Paxillus involutus* (F22)
Paal (Beringen). Belgique.	*Paxillus involutus* (B14, B15, B17),
Cd: 0.5; Cu: 18; Zn: 100.	*Suillus luteus* (B01, B03)
Tübingen. Allemagne.	*Pisolithus tinctorius* (Y7, IK)
Zmiaca (Limanowa). Pologne.	*Suillus variegatus* (P17), *Rhizopogon roseolus* (PO4, PO5)

Les concentrations en métaux sont données en mg/kg de sol sec.

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Les isolats fongiques

2.1.1.1. Isolats utilisés

Les carpophores de champignons ectomycorhiziens ont été récoltés sur différents sites disséminés à travers toute l'Europe, et une quarantaine d'isolats ont été obtenus. Ce travail a fait l'objet d'un projet de recherche auquel étaient associées une équipe polonaise et une équipe suédoise. Les détails des sites de récolte des isolats sont donnés dans le tableau 1 (Blaudez *et al.*, 2000b): neuf d'entre eux ne sont pas contaminés alors que les autres le sont à différents degrés.

Pour les tests de tolérance aux métaux lourds en conditions axéniques, cinq espèces et trente-neuf isolats ont été utilisés au laboratoire: *P. involutus* (19 isolats), *Pisolithus tinctorius* (4 isolats), *Suillus luteus* (9 isolats), *S. variegatus* (4 isolats), *S. bovinus* (3 isolats) (Tableau 20).

Pour les études biochimiques et moléculaires, le champignon ectomycorhizien utilisé est un isolat de *P. involutus* (Batsch) Fr. (ATCC 200175, isolat Sc01) obtenu à partir d'un carpophore associé à un bouleau *Betula pendula* âgé de 15-30 ans à Midlothian (Ecosse).

2.1.1.2. Conditions de culture

Le mycélium végétatif est maintenu en culture par repiquages successifs sur milieu gélosé de Melin-Norkrans (MMN) modifié (Tableau 21) au laboratoire. Les isolats sont maintenus à l'obscurité à 23°C.

Les tests de tolérance vis-à-vis de différentes concentrations de cadmium, cuivre, nickel et zinc sont réalisés sur les mycélium en culture pure sur milieu MMN gélosé à une valeur de pH de 4,3. Cette valeur de 4,3 a été choisie pour que la disponibilité des métaux soit maximale et pour éviter les phénomènes de précipitation des métaux. Des implants de 8 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce dans la zone juvénile des colonies fongiques et déposés sur milieu MMN gélosé additionné ou non d'un métal (parmi les quatre métaux étudiés), à une

Tableau 21. Composition du milieu MMN (modifié d'après Marx, 1969).

Pour 100 ml de milieu	
KH_2PO_4	50 mg
$(NH_4)_2HPO_4$	25 mg
$CaCl_2$	5 mg
NaCl	2,5 mg
$MgSO_4.7H_2O$	15 mg
Hydrochlorure de thiamine	0,01 mg
$FeCl_3.6(H_2O)$	0,1 mg
Glucose	1 g
pH	5,5
Agar (milieu solide)	1 g
H_2O	qsp 100 ml

concentration donnée (parmi les trois concentrations utilisées). Pour éviter la formation de précipités, les solutions de métaux sont ajoutées par filtration (filtre Millipore de 0,2 µm de diamètre) au milieu de culture préalablement autoclavé. Les concentrations utilisées sont les suivantes:

- pour le cadmium (Cd^{2+}): 0; 0,05; 0,2; 1 ppm, apporté sous forme de $CdSO_4$,
- pour le cuivre (Cu^{2+}): 0; 10; 30; 60 ppm, apporté sous forme de $CuSO_4$,
- pour le nickel (Ni^{2+}): 0; 1; 10; 50 ppm, apporté sous forme de $NiSO_4$,
- pour le zinc (Zn^{2+}): 0; 25; 75; 225 ppm, apporté sous forme de $ZnSO_4$.

Les colonies sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance, après chauffage pendant 1 min au four à micro-ondes (P=800 W) pour faire fondre l'agar. Le mycélium est épongé entre deux feuilles de papier Whatmann puis mis à sécher dans une étuve à 60°C jusqu'à atteindre une masse constante, et pesé. Pour chaque isolat et pour chacune des concentrations en métaux, cinq réplications ont été réalisées.

L'étude des réponses cellulaires vis-à-vis du cadmium est réalisée sur le mycélium en culture pure (*P. involutus* Sc01) sur milieu MMN liquide à pH 4,3. Des implants de 8 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce dans la zone juvénile des colonies fongiques et déposés sur milieu MMN gélosé recouvert d'une feuille de cellophane stérile. Ce dispositif permet par la suite de récupérer facilement les colonies fongiques intègres. Les colonies âgées de 4 jours sont ensuite prélevées délicatement et placées pendant 7 jours dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MMN liquide dont le pH est ajusté à 4,3. Pendant cette période de culture, le milieu est renouvelé au 2/3 quotidiennement. Au bout de 7 jours, 0,05 ppm de cadmium est ajouté sous forme de $CdSO_4$ dans le milieu de culture de la moitié des boîtes. Des lots de mycélium sont prélevés à différents temps après l'addition de cadmium, le mycélium est séché entre deux feuilles de papier KIMWIPES® Lite (Kimberly-Clark®), pesé pour déterminer la masse fraîche et congelé rapidement dans l'azote liquide. Les mycéliums congelés sont ensuite conservés à -70°C jusqu'à leur utilisation.

*2.1.2. Les souches d'*Escherichia coli

2.1.2.1. Souches utilisées

DH5αF': F', *hsd*R17 ($r_K^- m_K^+$), *sup*E44, Δ(*lac*IZYA-*arg*F)U169, *deo*R, (Φ80 d*lac*Δ(*lac*Z)M15), *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *rel*A1.

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

Tableau 22. Composition des milieux de culture pour bactéries.

Pour 100 ml de milieu	*LB*	*2YT*	*SOB*	*TB*
Bactotryptone	1 g	1,2 g	2 g	1,2 g
Extrait de levure	0,5 g	1 g	0,5 g	2,4 g
NaCl	1 g	0,5 g	0,05 g	
KCl			0,02 g	
Glycérol				0,4 ml
KH_2PO_4				17 mM
K_2HPO_4				72 mM
pH	7,0 – 7,5	7,0 – 7,5	7,3	
Agar bactériologique (milieu solide)	1,5 g			
H_2O			qsp 100 ml	

BL21 (DE3): F^-, *hsd*S_B ($r_B^-m_B^-$), *omp*T, *gal*, *dcm*, λ(DE3).

Cette souche a été utilisée pour la surexpression de protéines dont le gène a été inséré dans un vecteur d'expression pET, sous le contrôle du promoteur T7 de l'ARN polymérase. Dans nos conditions, cette souche n'a été utilisée qu'après transformation avec le plasmide pSBET contenant le gène *arg*U codant l'ARN de transfert des codons AGA et AGG (codant pour l'arginine) ou $ARNt_{arg4}$(Schenk *et al.*, 1995).

Y1090r$^-$: F^-, *ara*D139, *hsd*R($r_K^-m_K^+$), *mcr*B^+, *rps*L, *sup*F, *tpr*C22::Tn10, ΔlacU169, Δ*lon*, λ$^-$(pMC9)

Cette souche a été utilisée comme hôte du phage λgt11 lors de la réalisation de la banque d'ADNc et permet la sélection blanc-bleu.

OX326A: MG 1655 Δ(*rha-pfk*A)15, *kdg*T, *cpx*A, Δ*sod*A, Δ*sod*B.

Fournie par le Pr. Howard Steinman (Albert Einstein College of Medicine, New-York), elle est caractérisée par la délétion des gènes codant les superoxyde dismutases manganèse et fer-dépendantes. Elle a été utilisée lors des expériences de complémentation fonctionnelle.

Toutes les souches utilisées sont conservées à -70°C dans 15 % de glycérol.

2.1.2.2. Conditions de culture

Les différentes souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C avec agitation. La composition des différents milieux de culture utilisés est détaillée dans le tableau 22.

2.1.3. Les plasmides et bactériophages

2.1.3.1. Vecteurs plasmidiques

Le plasmide pKS^+(2,9 kpb) (Stratagène) contient l'origine de réplication du plasmide ColE1, le gène de résistance à l'ampicilline et un multisite de clonage situé dans le fragment d'ADN codant pour le peptide α de la β-galactosidase (gène *lacZ*α). Le produit de ce gène complémente le fragment Ω de la β-galactosidase dont le gène est porté par le facteur F' de la bactérie hôte. Cette α-complémentation est utilisée pour la sélection des plasmides recombinants en présence d'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, inducteur de l'opéron lactose; utilisé à 1 mM) et de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3 indolyl-β-D-galactopyranoside, analogue du substrat lactose; utilisé à 20 mg/ml) dans le milieu. Les colonies bactériennes transformées par le plasmide natif développent une couleur bleue alors que celles transformées par le plasmide recombinant restent incolores.

Le plasmide pGEM-T (3 kpb) (Promega) possède le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de réplication du phage f1 et un multisite de clonage localisé dans le gène *lacZ*α. Il est

capable d'α-complémentation. Il a été utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Ce plasmide linéaire possède une base thymidine à chacune de ses extrémités 3'OH, permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits PCR obtenus avec l'ADN polymérase Advantage 2 (Clontech). Celle-ci rajoute en effet une molécule de dATP aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN qu'elle génère.

Le plasmide d'expression pET3d (4,6 kpb) (Novagen) possède le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de réplication du plasmide ColE1, ainsi que le promoteur et le terminateur du bactériophage T7. Le gène-cible est cloné sous contrôle du promoteur fort à l'aide des sites de restriction *Nco* I et *Bam*H I qui permettent un clonage orienté de l'insert. L'expression est induite par l'IPTG dans les bactéries hôtes fournissant une source d'ARN polymérase du bactériophage T7.

Le plasmide d'expression pTrc99A (4,2 kpb) (Amersham Pharmacia Biotech) est un dérivé du plasmide pKK233-2. Il contient le gène de résistance à l'ampicilline, le promoteur fort *trc* en amont du multisite de clonage et un signal fort de terminaison de transcription *rrnB* en aval. Les sites de restriction *Nco* I et *Bam*H I permettent un clonage orienté de l'insert. Le promoteur trc est inductible par l'IPTG.

2.1.3.2. Bactériophage λgt11

L'ADN du phage λgt11 (43,7 kbp) prédigéré par *Eco*R I et déphosphorylé a été utilisé pour le clonage d'ADNc lors de la construction de la banque cadmium-spécifique. Le site unique *Eco*R I est situé dans le gène *lacZα*. Ce vecteur, lorsqu'il est hébergé par des bactéries *sup*F comme Y1090r , est capable d'induire la lyse des cellules hôtes. Sur un tapis de bactéries indicatrices, la production de virions se traduit par la formation de plages de lyse. Comme dans le cas de la transformation par le vecteur pKS$^+$, la sélection des virus recombinants s'effectue selon la coloration bleue-blanche des plages.

2.2. Méthodes

2.2.1. Analyse statistique des tests de tolérance

Les différences de croissance entre les contrôles et les traitements par les métaux ont été analysées en utilisant le programme de statistiques ANOVA à une variable du logiciel Statview (version 4.02) pour Macintosh. Pour chaque isolat et chaque métal, la courbe d'inhibition de croissance a pu être tracée et la valeur EC_{50} qui correspond à la concentration en métal qui inhibe la croissance du champignon de 50 %, calculée. Plus cette valeur est faible, plus la toxicité du métal est importante. Les concentrations en métaux dans les sols ont été classées en trois catégories, faibles, moyennes ou fortes, en accord avec Ewers (1991).

2.2.2. Extraction des acides nucléiques

2.2.2.1. Extraction des ARN totaux de P. involutus

Les ARN totaux sont extraits du mycélium de *P. involutus* à l'aide du kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen). Les compositions exactes des tampons de ce kit ne sont pas données par le fournisseur. Cent mg de mycélium congelé sont broyés dans 450 µl de tampon 1 contenant de l'hydrochlorure de guanidine et du β-mercaptoéthanol. Le lysat est ensuite déposé sur une colonne (QIAshredder) qui retient les débris cellulaires et réduit la viscosité du lysat, puis centrifugé à 12000 *g* pendant 2 min. A l'éluat obtenu est ajouté 0,5 volume d'éthanol afin de créer les conditions favorables à l'accrochage des ARNs sur la membrane RNeasy. Le mélange est déposé sur une deuxième colonne (RNeasy) et centrifugé à 8000 *g* pendant 15 sec. La colonne est lavée trois fois à l'aide du tampon 2 contenant de l'éthanol, puis les ARNs sont élués en deux étapes dans 70 µl d'eau ultrapure stérile traitée au DEPC.

La qualité des ARN totaux est contrôlée sur un gel d'agarose à 1 %. Les ARNr 25S et 17S apparaissent comme deux bandes intenses. La bande correspondant aux ARNr 25S est approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARNr 17S. La pureté de la préparation est déterminée en calculant le rapport de la valeur de la densité optique (DO) à 260 nm sur la valeur de la DO à 280 nm, longueur d'onde à laquelle absorbent les protéines (acides aminés aromatiques). Si ce rapport est compris entre 1,8 et 2, la préparation est considérée exempte de protéines. La quantité des ARN totaux purifiés est déterminée par spectrophotométrie, 1 unité de DO à 260 nm correspondant à 40 µg/ml d'ARN.

2.2.2.2. Extraction de l'ADN génomique de P. involutus

L'ADN génomique est extrait du mycélium de *P. involutus* à l'aide du kit "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen). Les compositions des tampons de ce kit ne sont pas données par le fournisseur. Environ 200 mg de mycélium congelé sont broyés dans un tube Eppendorf à l'aide d'un micropilon dans l'azote liquide puis le broyat est resuspendu dans 400 µl de tampon 1 de lyse contenant de la RNase A (1 mg/ml) en vortexant vigoureusement. Après une incubation de 10 min à 65 °C, 130 µl de tampon 2 sont ajoutés pour précipiter les détergents, les protéines et les polysaccharides et le mélange est placé à 0°C pendant 5 min. Le lysat est alors centrifugé à 12000 *g* pendant 5 min puis déposé sur une colonne (QIAshredder) qui retient les débris cellulaires et les polysaccharides. A l'éluat obtenu sont ajoutés 0,5 volume de tampon 3 et 1 volume d'éthanol. Le mélange est déposé sur une nouvelle colonne (DNeasy) qui retient sélectivement l'ADN et centrifugé à 6000 *g* pendant 1 min. La colonne est lavée deux fois à l'aide du tampon 4 contenant de l'éthanol, puis l'ADN est élué dans 200 µl d'eau ultrapure stérile.

La qualité de l'ADN génomique est contrôlée sur un gel d'agarose à 0,8 % où il doit apparaître sous forme d'une bande large, de taille comprise entre 20 et 25 kbp. La quantité

d'ADN génomique purifié est déterminée par spectrophotométrie, 1 unité de densité optique (DO) à 260 nm correspondant à 50 µg/ml d'ADN. La pureté de la préparation est déterminée en calculant le rapport de la valeur de la DO à 260 nm sur la valeur de la DO à 280 nm, longueur d'onde à laquelle absorbent les protéines (acides aminés aromatiques). Si ce rapport est supérieur à 1,8, la préparation est considérée exempte de protéines.

2.2.2.3. Extraction de l'ADN plasmidique

2.2.2.3.1. Minipréparation

Les plasmides bactériens sont extraits par la méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim & Doly (1979).

Trois ml de culture bactérienne en fin de phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 12000 *g* pendant 5 min. Le culot est repris dans 100 µl de tampon TGE (Tris 25 mM; glucose 50 mM; EDTA 10 mM; pH 8,3) et incubé 5 min à température ambiante. Deux cents µl de solution de lyse (NaOH 0,2 N; SDS 1 % (p/v)) sont ajoutés et le mélange est placé à 0°C pendant 5 min, puis neutralisé par 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 3 M pH 5,8. Le mélange est maintenu dans la glace pendant 10 min puis le précipité d'ADN génomique et de débris cellulaires est sédimenté par centrifugation à 12000 *g* pendant 10 min. Les acides nucléiques contenus dans le surnageant sont déprotéinisés par 2 extractions successives au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (PCIA 25/24/1, v/v/v) et au chloroforme-alcool isoamylique (CIA 24/1, v/v), puis précipités par addition de 2 volumes d'éthanol 96% froid et de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2. La précipitation est réalisée à -20°C ou à -80°C pendant 30 min minimum. Les acides nucléiques sont sédimentés par centrifugation à 12000 *g* pendant 20 min. Le culot est lavé à l'éthanol à 70 % et séché sous vide. Les acides nucléiques sont finalement dissous dans 50 µl d'eau ultrapure stérile.

2.2.2.3.2. Méthode préparative

Dans ce cas, les plasmides bactériens sont préparés à l'aide du kit "Quantum Prep Plasmid Miniprep" (Bio-Rad). Les bactéries sont cultivées dans le milieu TB, recommandé par le fournisseur, pour augmenter le rendement d'extraction. Trois ml de culture bactérienne en fin de phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 12000 *g* pendant 30 sec. Le culot est repris dans 200 µl de solution de resuspension. Deux cent cinquante µl de solution de lyse sont ajoutés et le mélange est homogénéisé par inversion du tube puis neutralisé par 250 µl d'une solution de neutralisation. Après homogénéisation, le précipité d'ADN génomique et de débris cellulaires est sédimenté par centrifugation à 12000 *g* pendant 5 min. Les acides nucléiques contenus dans le surnageant sont déposés sur une colonne (Spin Filter) et 200 µl de matrice (exosquelette de silice des diatomées) sont ajoutés. Le mélange est centrifugé à 12000 *g* pendant 30 sec. La

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

colonne est lavée deux fois à l'aide d'un tampon de lavage contenant de l'éthanol, puis l'ADN est élué dans 100 µl d'eau ultrapure stérile.

La quantité d'ADN recueilli est déterminée par spectrophotométrie. Une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN. Le degré de pureté de la préparation est estimé par le rapport de cette valeur sur la valeur mesurée à 280 nm (longueur d'onde correspondant à l'absorbance des protéines). Une purification correcte est obtenue quand ce rapport est supérieur à 1,8.

2.2.3. Analyse des acides nucléiques par électrophorèse en gel d'agarose

2.2.3.1. Electrophorèse des ARNs en gel d'agarose dénaturant

La méthode utilisée dérive de celle décrite par Lehrach *et al.* (1977).

Les ARNs sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % (p/v) en conditions dénaturantes. L'agarose est porté à ébullition dans 43,5 ml d'eau stérile complétés par 5 ml de tampon MOPS[acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique]/EDTA 10X composé de MOPS 0,2 M, d'EDTA 10 mM et d'acétate de sodium 50 mM. La solution est refroidie à 50°C et complétée par 2,55 ml de formaldéhyde 36 % (v/v).

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

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

Après électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (BEt) à 2 µg/ml pendant 15 min et rincé dans de l'eau stérile pendant au moins 2 h. Les ARNs sont visualisés sous lumière U.V. (λ = 312 nm).

2.2.3.2. Hydrolyse de l'ADN par des endonucléases de restriction de type II

L'hydrolyse des ADNs par les enzymes de restriction est réalisée en présence d'un minimum de 5 unités d'enzyme par µg d'ADN plasmidique et de 20 unités par µg d'ADN génomique, dans le tampon préconisé par le fournisseur. Les échantillons sont incubés à la température optimale d'activité de l'enzyme donnée par le fournisseur. La durée de l'hydrolyse varie de 2 à 16 h selon la quantité et la nature de l'ADN.

2.2.3.3. Electrophorèse analytique d'ADN en gel d'agarose

L'ADN natif ou restreint est analysé par électrophorèse horizontale en gel d'agarose (0,8 % à 2,5 % (p/v)) dans du tampon TBE 1X (Tris-HCl pH 8, 89 mM; acide borique 89 mM; EDTA 2,5 mM).

Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons sont additionnés de 0,2 volume de tampon de charge [glycérol 30 % (v/v); bleu de bromophénol 0,25 % (p/v)].

L'électrophorèse est réalisée sous une tension maximale de 10 V/cm.

Après électrophorèse, le gel est coloré par immersion dans une solution de BEt à 2 µg/ml pendant 15 min avant d'être observé en lumière U.V.

L'ADN migre de façon linéaire par rapport au logarithme du nombre de paires de bases qui le compose. La taille d'un fragment d'ADN peut donc être estimée par comparaison avec des standards de taille connue.

2.2.3.4. Electrophorèse préparative d'ADN en gel d'agarose

L'électrophorèse préparative est réalisée comme ci-dessus en utilisant un gel faiblement concentré en agarose (0,8 %). Ceci évite d'effectuer la migration électrophorétique à 4°C imposée par un agarose à faible point de fusion.

Après électrophorèse, la bande d'agarose contenant le fragment souhaité est excisée. La purification est effectuée par fixation de l'ADN sur fibres de verre après dissolution de l'agarose dans un agent chaotropique selon le protocole décrit par le fournisseur ("GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit", Amersham Pharmacia Biotech).

2.2.4. Transfert des acides nucléiques sur membrane et hybridations moléculaires

2.2.4.1. Transfert d'ADNs (Technique de Southern, 1975)

Après électrophorèse, le gel est coloré par immersion dans une solution de BEt à 2 µg/ml pendant 10 min avant d'être photographié en lumière U.V. en plaçant le zéro d'une règle fluorescente en face des puits de dépôts. Les fragments d'ADN sont alors dépurinisés par immersion du gel dans une solution d'HCl 0,2 N pendant 10 min puis transférés sous vide sur membrane de nylon N^+ (Appligène) à l'aide de l'appareil commercialisé par Appligène (TransDNA Express), dans une solution de NaOH 0,4 N.

Après transfert, les membranes sont rincées brièvement dans du tampon 2X SSC (1X SSC: NaCl 150 mM; citrate de sodium 15 mM). Les ADNs sont fixés à la membrane par irradiation aux U.V. pendant 2,5 min.

2.2.4.2. Transfert d'ARNs

Le transfert des ARNs sur membrane de nylon N^+ est réalisé suivant la technique du northern-blot décrite par Sambrook *et al.* (1989).

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

2.2.4.3. Transfert des plages de lyse

Les disques de nylon N^+ sont repérés en traçant à l'encre indélébile 3 traits asymétriques à leur surface. Un disque de nylon N^+ est mis en contact avec les plages de lyse pendant 45 sec. L'ADN est ensuite dénaturé sur le disque de nylon en le déposant pendant 5 min sur du papier Whatmann 3 MM imbibé d'une solution de NaOH 0,5 N et NaCl 1,5 M. Le disque est ensuite placé sur une nouvelle feuille de papier Whatmann 3MM imbibée de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 contenant du NaCl 1,5 M (solution de neutralisation) pendant 5 min. Après rinçage de la membrane dans du 2X SSC, les ADNs sont fixés par irradiation aux U.V. pendant 2,5 min.

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

Le marquage d'ADN double brin est réalisé par la technique d'amorçages multiples (Feinberg & Vogelstein, 1983; 1984).

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

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

L'ADN radiomarqué est séparé des nucléotides libres par purification sur une colonne d'exclusion Séphadex G25 (Pharmacia) de 1 ml et élué avec 200 µl de tampon TE (Tris–HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

La radioactivité incorporée est quantifiée en utilisant un compteur à scintillation. La radioactivité spécifique de la sonde varie de $1x10^8$ à $1x10^9$ cpm/µg d'ADN.

Avant d'être marqués, les produits d'amplification sont préalablement purifiés par électrophorèse en gel d'agarose selon le protocole du kit "GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification". L'ADN extrait est marqué comme précédemment décrit.

Tableau 23. Composition du tampon d'hybridation.

Composants	
Formamide	50%
SSC	5X
Denhardt	5X
SDS	0,1%
Tris-HCl pH 7,6	20 mM
ADN de sperme de saumon dénaturé	400 µg/ml
Denhardt 50X	
Ficoll	5 g
Polyvinyl pyrrolidone	5 g
BSA	5 g
H_2O qsp	500 ml

2.2.4.5. Conditions d'hybridation

Les températures de préhybridation et d'hybridation varient selon l'homologie entre la sonde et l'ADN cible d'une part, et d'autre part leur pourcentage de paires de bases (G+C).

Une étape préliminaire à l'hybridation (la préhybridation) est nécessaire pour saturer les sites libres des filtres de nylon où sont fixés les ADNs. Les filtres sont placés dans un tube à hybridation (face acides nucléiques vers l'intérieur) en présence de tampon d'hybridation (1 ml/10 cm^2) dont la composition est mentionnée dans le tableau 23. La préhybridation est réalisée pendant 2 heures à 42°C (ou 37°C dans le cas des northern-blot) dans un four à hybridation à agitation rotative (Hybridizer, Techne).

La sonde marquée est dénaturée par chauffage à 100°C pendant 10 min puis refroidie dans la glace avant d'être ajoutée dans le tube à hybridation à raison de 10^6 cpm/ml de tampon. L'hybridation est effectuée à 42°C (ou 37°C) pendant 16 h.

2.2.4.6. Conditions de lavages

Après hybridation, les filtres sont rincés 3 fois pendant 20 min à température ambiante dans du 2X SSC, 0,5 % SDS (p/v). Ces lavages sont suivis:

- de deux lavages supplémentaires réalisés dans du 1X SSC, 0,1 % SDS (p/v) pendant 30 min à 65°C dans le cas d'une hybridation en conditions stringeantes (42°C),
- de deux lavages en 1X SSC 0,1 % SDS (p/v) à 55°C pendant 30 min dans le cas d'une hybridation en conditions peu stringeantes (37°C),

2.2.4.7. Conditions de révélation

Après les lavages, les filtres sont rincés brièvement dans du 2X SSC à température ambiante puis exposés avec un film autoradiographique (Kodak BioMax MS) à -70°C entre 2 écrans amplificateurs. Les temps d'exposition varient de 24 h à plusieurs jours.

2.2.5. Insertion d'ADN dans des vecteurs de clonage

2.2.5.1. Préparation du vecteur

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

Le vecteur (pKS^+, pET3d, pTrc99A) est linéarisé par la (ou les) enzyme(s) de restriction choisie(s) selon le protocole décrit au paragraphe 2.2.3.2. Le vecteur linéarisé est ensuite déphosphorylé à l'aide de deux unités de phosphatase alcaline pour 1 µg d'ADN à 37°C pendant 1 h dans le tampon recommandé par le fournisseur (New England BioLabs). Cette étape évite la

religation du vecteur sur lui-même. Le vecteur linéaire déphosphorylé est purifié par déprotéinisation selon le protocole décrit au paragraphe 2.2.2.3.1.

2.2.5.2. Préparation du fragment à cloner

Les fragments à cloner sont hydrolysés par la (ou les) enzymes de restriction adéquate(s). Les enzymes de restriction sont éliminées par déprotéinisation et précipitation de l'ADN à l'éthanol. Les fragments d'ADN ainsi générés peuvent être clonés globalement ou isolés par électrophorèse en gel d'agarose comme décrit précédemment.

Dans le cas du clonage de produits d'amplification dans le vecteur pGEM-T, ceux-ci sont purifiés directement ou après séparation sur un gel d'agarose, à l'aide du kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Pharmacia Biotech).

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans des vecteurs de clonage autres que le pGEM-T sont d'abord purifiés à l'aide du kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification" puis hydrolysés par la (ou les) enzymes de restriction choisie(s). L'échantillon est alors déprotéinisé avant d'être précipité à l'éthanol.

2.2.5.3. Ligation

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

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

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

La ligation est conduite à 4°C pendant 16 h dans un volume de 10 µl final contenant 10 à 50 ng de vecteur, 20 à 100 ng de fragment à cloner, 1 unité de T4 ADN ligase dans le tampon de réaction préconisé par le fournisseur (Boehringer Mannheim).

2.2.6. Transformation des bactéries

2.2.6.1. Préparation des cellules compétentes

2.2.6.1.1. Méthode de Hanahan (1983)

Cette méthode a été utilisée pour la préparation des cellules compétentes d'*E. coli* souches DH5αF' et OX326A.

Tableau 24. Composition du tampon TFB.

Composants	
MES (K) pH 6,2	10 mM
KCl	100 mM
$MnCl_2$	45 mM
$CaCl_2$	10 mM
Hexamine cobalt Cl_3	3 mM

Vingt-cinq ml de milieu SOB (Tableau 22) additionné de $MgCl_2$ à la concentration finale de 20 mM sont ensemencés au 1/100 par une préculture d'*E. coli* en fin de phase exponentielle de croissance, et incubés à 37°C avec agitation. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance (DO à 600 nm = 0,5), la culture est placée dans la glace pendant 15 min. Les cellules sont collectées par centrifugation à 8000 *g* à 4°C pendant 10 min, remises en suspension dans 10 ml de tampon TFB (Tableau 24) et placées dans la glace pendant 15 min. Après une nouvelle sédimentation, le culot est dispersé dans 2,4 ml de TFB. A la suspension bactérienne placée dans la glace sont ajoutés successivement: 80 µl de DMSO (diméthylsulfoxide) puis 5 min plus tard, 80 µl de DTT 2,25 M (dithiothréitol dissous dans de l'acétate de potassium 40 mM pH 6,0) et enfin 10 min plus tard, 80 µl de DMSO.

2.2.6.1.2. Méthode de Dower *et al.* (1988)

Cette méthode de préparation des cellules compétentes a été utilisée pour la transformation des souches d'*E. coli* DH5αF' et BL21(DE3).

Les bactéries sont cultivées dans 1 l de milieu LB (Tableau 22) jusqu'à une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 1 (phase exponentielle de croissance). La culture est alors refroidie dans la glace et centrifugée à 4000 *g* à 4°C pendant 15 min. Les cellules sont lavées à deux reprises dans 1 l d'eau ultrapure stérile et remises en suspension dans 20 ml de glycérol 10 %. Après une nouvelle sédimentation, le culot est dispersé dans 5 ml de glycérol 10 %. Cette suspension bactérienne est répartie par fractions de 40 µl qui sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -70°C.

2.2.6.2. Transformation des cellules compétentes

2.2.6.2.1. Choc thermique

Les cellules compétentes (200 µl) sont mises en présence de plusieurs quantités de mélange de ligation (1,5 et 4 µl) et incubées dans la glace pendant 45 min. Elles subissent ensuite un choc thermique de 2 min à 42°C. Les cellules transformées sont reprises dans 0,8 ml de milieu LB et incubées à 37°C pendant 1 h avant d'être étalées sur milieu LB solide additionné d'ampicilline à 50 µg/ml, d'IPTG 1 mM et de X-Gal à 20 mg/ml. L'incubation est poursuivie à 37°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes bien distinctes.

L'efficacité de transformation est généralement de 10^7 transformants par µg d'ADN.

2.2.6.2.2. Electroporation

Les bactéries décongelées à 4°C sont additionnées de 0,5 µl du mélange de ligation précédent. Après une incubation de 5 min dans la glace, le mélange est transféré dans une cuve à

électroporation dont les électrodes sont espacées de 0,2 cm. La cuve est ensuite placée dans l'appareil à électroporation (Savant Instruments) puis soumise à un choc électrique de 14 kV/cm pour une capacitance de 25 µF et une résistance de 160 Ω. Ces conditions génèrent un pulse électrique d'environ 5 ms. Les cellules transformées sont reprises immédiatement dans 0,8 ml de milieu LB et incubées à 37°C pendant 1 h avant d'être étalées sur milieu LB solide additionné d'ampicilline à 50 µg/ml, d'IPTG 1 mM et de X-Gal à 20 mg/ml. L'incubation est poursuivie à 37°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes bien distinctes.

L'efficacité de transformation par électroporation est habituellement supérieure à 10^8 transformants par µg d'ADN.

2.2.7. *Technique d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction)*

La technique PCR utilisée est celle décrite par Saiki *et al.*, (1985, 1988). Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes: une dénaturation thermique des brins d'ADN matriciel, une hybridation des amorces à leur séquence-cible et une élongation à partir des amorces par l'action d'une ADN polymérase thermostable.

2.2.7.1. Les amorces nucléotidiques

La spécificité de la réaction PCR repose sur la spécificité de l'hybridation entre les amorces oligonucléotidiques et leur séquence cible sur l'ADN matriciel. Pour cela, différents critères ont été définis dans le choix des amorces: une longueur minimale en dessous de laquelle l'hybridation n'est plus fiable (16 nucléotides); une absence de complémentarité entre les amorces; un Tm théorique proche pour que la température d'hybridation choisie soit adéquate pour les 2 amorces. Le Tm est la température de fusion qui correspond à la température pour laquelle deux brins d'ADN sont associés par 50 % de leurs séquences complémentaires. La formule permettant de calculer la valeur du Tm est la suivante: Tm = 2(A+T) + 2(G+C).

2.2.7.2. Composition de l'essai

La composition de l'essai pour un volume réactionnel de 50 µl est la suivante: 0,5 à 1 ng d'ADN cible sont mis au contact de 0,2 µM de chaque amorce nucléotidique et de 200 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides (dNTPs). La composition du tampon de réaction est: Tris-HCl 10 mM, pH 9; KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM; Triton X-100 0,1 %; BSA 0,2 mg/ml lorsque l'enzyme utilisée est l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Chien *et al.*, 1976) fournie par Appligene qui est additionnée à raison de 1 U.

Dans les cas où les produits de PCR serviront de matrice aux réactions de séquençage, ou bien seront clonés dans des vecteurs d'expression, ou encore dans les cas particuliers d'utilisation de certains kits, l'"Advantage® 2 Polymerase Mix" sera préférée à l'ADN polymérase fournie par Appligene. L'"Advantage® 2 Polymerase Mix" est un mélange de deux ADN

polymérases commercialisé par Clontech qui permet d'amplifier de longs fragments d'ADN avec une grande fidélité. Elle est fournie en solution 50 fois concentrée et fonctionne dans son tampon de réaction dont la composition est la suivante: Tricine-KOH 40 mM, pH 8,7; KOAc 15 mM; $Mg(OAc)_2$ 3,5 mM; BSA 3,75 µg/ml; Tween-20 0,005 %; Nonidet-P40 0,005 %.

2.2.7.3. Conditions d'amplification

L'amplification est réalisée dans un appareil automatisé (Mastercycler Gradient, Eppendorf).

Les conditions de dénaturation sont de 2 min à 94°C pour le premier cycle et de 1 min pour les cycles suivants. Les conditions d'hybridation sont de 45 sec à 1 min à des températures comprises entre 55 et 70°C, cette valeur étant fonction des Tm de chaque amorce. Les conditions d'élongation sont de 1 à 3 min à 72°C. Le mélange est soumis à 35 cycles d'amplification dans les conditions décrites puis à un dernier cycle d'élongation de 10 min à 72°C. La durée de cette étape dépend de la longueur de la molécule d'ADN à synthétiser.

2.2.7.4. PCR sur les colonies bactériennes ou les phages

Afin d'identifier le contenu plasmidique d'une colonie bactérienne, une méthode rapide d'analyse consiste à effectuer la réaction de PCR sur une colonie. La colonie est prélevée à l'aide d'un cure-dents stérile, resuspendue dans 8 µl d'eau distillée stérile puis repiquée sur milieu LB solide additionné d'ampicilline à 50 µg/ml. La réaction de PCR est réalisée sur la suspension cellulaire en utilisant soit les amorces spécifiques du plasmide de clonage (le couple T3/T7 si le plasmide utilisé est le pKS^+; SP6/T7 dans le cas du pGEM-T) soit les amorces spécifiques de l'insert. La réaction PCR peut également être effectuée sur 1,5 µl de culture bactérienne maintenue à 37°C pendant une nuit dans le milieu de culture approprié.

La PCR peut également se faire sur des phages après carottage des plages de lyse. La solution de phages est incubée à 70°C pendant 10 min pour détruire la capside du phage et libérer l'ADN. La réaction de PCR est réalisée sur une fraction (0,3 à 0,5 µl) de la solution refroidie dans la glace en utilisant soit des amorces spécifiques du phage λgt11 (FP/RP) soit les amorces spécifiques de l'insert.

2.2.8. Séquençage des fragments d'ADN

La caractérisation fine d'un gène ou d'un ADNc passe par la connaissance de leurs séquences primaires. La traduction de la séquence nucléotidique et la comparaison de celle-ci avec les séquences contenues dans les bases de données, permet d'attribuer une fonction à la protéine codée par ce gène. Le séquençage a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique.

2.2.8.1. Principe

Le séquençage des fragments d'ADN est effectué par la méthode de terminaison de chaînes aux didésoxyribonucléotides (Sanger *et al.*, 1977). Le principe de cette technique est d'effectuer la synthèse d'un brin radioactif ou fluorescent complémentaire du brin dont on veut déterminer la séquence. Un didésoxynucléoside triphosphate est un analogue structural d'un désoxynucléoside triphosphate exempt de groupement OH en 3' et en 2'. Il s'incorpore normalement dans une chaîne en cours de synthèse, mais l'extension de celle-ci est stoppée aussitôt après son incorporation. Ainsi une population de fragments d'ADN tronqués de taille variable est générée.

La méthode employée repose sur un marquage aux fluorochromes des didésoxynucléosides triphosphates (chimie "Dye Terminator"). Ainsi chaque didésoxynucléoside triphosphate est lié à un fluorochrome spécifique, ce qui permet de réaliser la réaction de séquence en une fois. La lecture est réalisée par détection laser et est basée sur la différence d'émission de chaque fluorochrome lors d'une excitation.

2.2.8.2. Réaction de séquence

L'ADN plasmidique est préparé suivant la méthode préparative (paragraphe 2.2.2.3.2). Les réactions de séquence sont réalisées avec les réactifs et selon le protocole du kit "ABI Prism™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin-Elmer, Foster City, CA).

Les réactions de séquence ont été analysées sur un séquenceur automatique de type ABI Prism 310 Genetic Analyser par Christine Delaruelle (U.M.R. IaM).

2.2.8.3. Analyse des séquences

2.2.8.3.1. Traitement des données brutes

Chaque séquence reçue fait l'objet d'une analyse manuelle avant même d'être soumise aux banques de données. Le chromatogramme est visualisé à l'aide du logiciel "EditView ABI Automated DNA Sequence Viewer" version 1.0. Après édition, élimination des séquences vectorielles et correction des ambiguïtés, les séquences nucléotidiques ont été systématiquement comparées aux séquences déjà répertoriées dans les bases de données grâce à l'utilisation d'outils bioinformatiques.

2.2.8.3.2. Analyse bioinformatique

– Recherche d'homologies

Afin de déterminer si un clone d'ADNc séquencé correspond à une protéine connue, la séquence nucléotidique de celui-ci est comparée avec les séquences des protéines enregistrées dans les bases de données. Pour cela, nous avons fait appel aux serveurs du "National Center for Biotechnology Information, the National Library of Medicine NIH Bethesda, MD, USA" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) et du "Baylor College of Medicine, Human Genome Sequencing Center, Houston, TX, USA" (http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331). La comparaison de notre séquence avec celles présentes dans les banques de données est réalisée à l'aide de l'algorithme BLAST version 2.0 (Altshul *et al.*, 1990; Altshul *et al.*, 1997). Ce logiciel est couplé au traitement de données BEAUTY sur le serveur du "Baylor College of Medicine, Human Genome Sequencing Center, Houston, TX, USA" (Worley *et al.*, 1998; Worley *et al.*, 1995). Le programme utilisé (blastx) compare les produits de la traduction de la séquence étudiée dans les six phases de lecture possibles avec les séquences protéiques présentes dans les bases de données.

Ainsi, trois catégories de séquences ont été définies: les séquences présentant des homologies avec des gènes connus déjà identifiés (séquences homologues), les séquences ne présentant aucune homologie (nouvelles séquences), et les séquences présentant des homologies avec des gènes de fonction inconnue (séquences orphelines). Les ESTs non homologues sont régulièrement soumises à BLAST pour la recherche de nouvelles homologies et la présence de motifs conservés au sein de la séquence protéique à tester.

– Caractérisation d'une séquence peptidique

La caractérisation de la protéine résultant de la traduction de la séquence nucléotidique est réalisée à l'aide d'outils répertoriés dans le serveur "EXpert Protein Analysis SYstem" (ExPASy) du "Swiss Institute of Bioinformatics" (http://www.expasy.ch/):

- PROSITE: c'est une base de données biologiques regroupant les motifs, les signatures et les profils caractéristiques de protéines connues. Cet outil permet de formuler des hypothèses quant à la fonction d'une protéine issue de la traduction d'une séquence nucléotidique nouvellement séquencée.

- Proteomics tools: ce site regroupe des programmes qui permettent de caractériser une protéine à partir de sa séquence primaire. En particulier, ProtParam permet la caractérisation physico-chimique de la séquence protéique (composition, point isoélectrique, coefficient d'extinction molaire, stabilité,...).

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

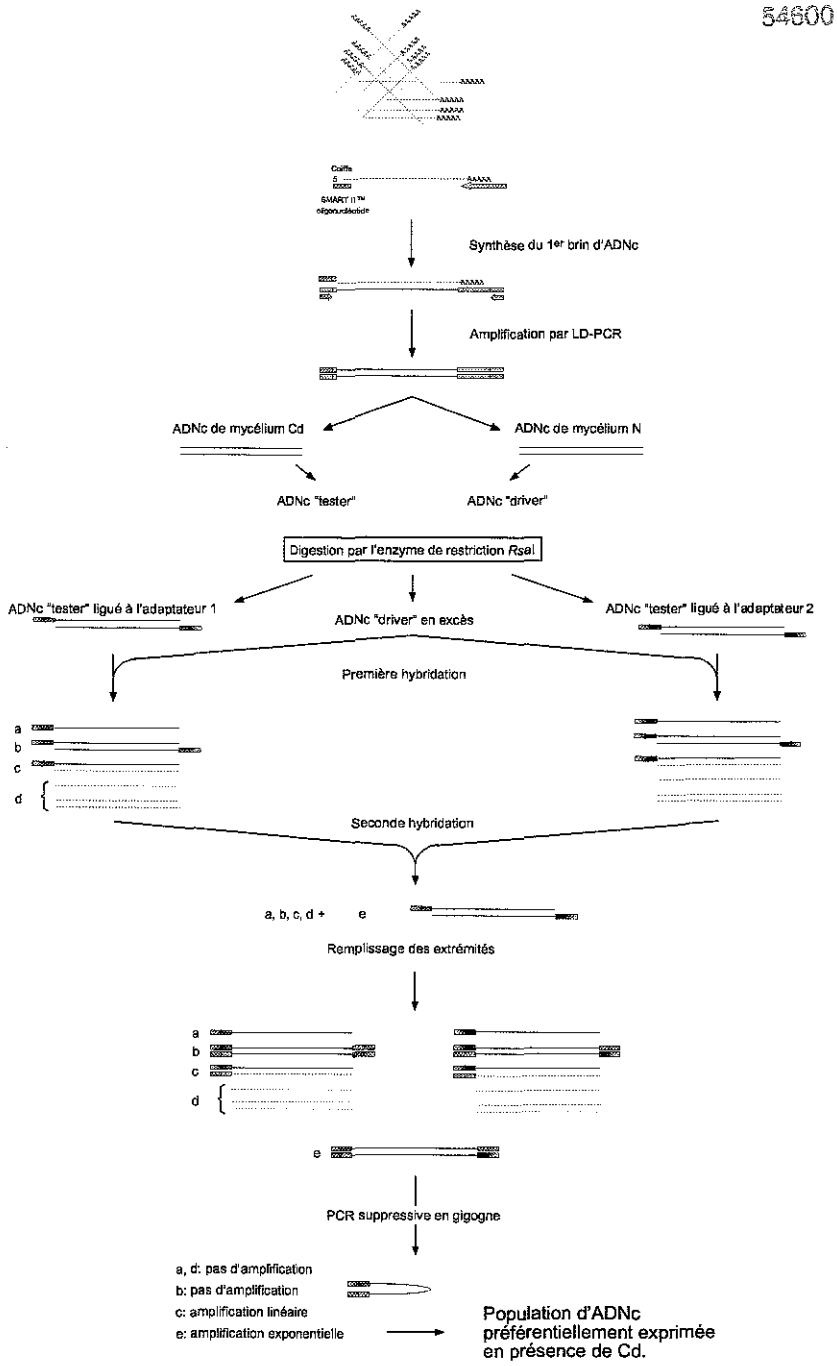


Figure 27. Schéma de la technique d'hybridation soustractive par suppression (SSH).
Les ADNc double-brin sont obtenus à l'aide du kit SMART™ cDNA Synthesis (Clontech). Les ADNc issus du mycélium cultivé en présence de Cd constituent la population "tester" alors que les ADNc issus du mycélium contrôle forment la population "driver" dans l'exemple illustré ci-dessus. La soustraction inverse a également été réalisée, mais n'est pas représentée ici pour simplifier la figure. Les deux populations d'ADNc sont digérées par l'enzyme de restriction *Rsa*I. Les ADNc "tester" sont alors séparés en deux lots qui sont ligués à des adaptateurs différents. Les ADNc "driver" ne portent aucun adaptateur. Les ADNc "tester" et "driver" sont soustraits lors de deux tours d'hybridation qui aboutissent à l'enrichissement de la population d'ADNc en molécules de type "e". Ces molécules correspondent aux gènes différentiellement exprimés dans la population "tester". La population d'ADNc est alors amplifiée par PCR à l'aide d'amorces complémentaires des deux adaptateurs. Les ADNc de type "e" qui possèdent à leurs extrémités les deux types d'adaptateurs, sont sélectivement amplifiés (modifié d'après Diatchenko *et al.*, 1996).

2.2.9. Hybridation soustractive et suppressive

L'hybridation soustractive est une technique qui permet de comparer deux populations d'ARNm et d'isoler des gènes qui sont exprimés dans une seule des deux populations. Le principe de base à toute méthode de soustraction est le même: tout d'abord deux populations d'ADNc sont synthétisées à partir des ARNm, la population supposée contenir les transcrits spécifiques est appelée population "tester", la population de référence est appelée "driver". Ces deux populations sont hybridées entre elles, et les hybrides sont éliminés. Ils restent donc les ADNc non hybridés qui représentent des gènes dont les transcrits sont présents dans la population "tester" mais absents dans la population "driver". Par cette méthode, il est donc possible d'analyser et de caractériser des modifications de l'expression d'un gène au niveau transcriptionnel.

Il existe plusieurs méthodes de soustraction, nous avons utilisé la méthode d'hybridation suppressive soustractive (SSH) proposée par le kit "PCR-Select™ cDNA Subtraction" commercialisé par Clontech. Cette méthode a été décrite par Diatchenko *et al.* (1996). En 1997, lorsque nous avons commencé à utiliser cette technique, une demi-douzaine d'articles étaient publiés. Depuis, cette méthode est largement utilisée surtout dans le domaine médical. Dans notre cas, la population "tester" correspond aux ARNm extraits de *P. involutus* cultivé pendant 12 h sur milieu nutritif liquide contenant 0,05 ppm de cadmium. La seconde population appelée "driver" correspond aux ARNm extraits de *P. involutus* cultivé dans les mêmes conditions que précédemment mais sans ajout de cadmium. Le kit nous permet de réaliser en parallèle la soustraction inverse où les ARNm extraits de *P. involutus* cultivé pendant 12 h sur milieu nutritif liquide contenant 0,05 ppm de cadmium constituent la population "driver" et les ARNm extraits de *P. involutus* cultivé pendant 12 h sur milieu nutritif sans ajout de cadmium constituent la population "tester". La figure 27 illustre les différentes étapes de cette technique.

2.2.9.1. Synthèse d'ADNc

Les ADNc sont synthétisés à l'aide des kit "SMART™ PCR cDNA Synthesis" et "PCR-Select™ cDNA Subtraction" en suivant les instructions du fournisseur. Le matériel de départ est constitué de 1,4 µg d'ARN totaux extraits du champignon cultivé en présence ou en absence de cadmium dans le milieu de culture.

Une amorce oligo$(dT)_{30}$ est utilisée pour initier la synthèse du premier brin d'ADNc par la transcriptase inverse. L'oligonucléotide SMART est utilisé comme matrice pour la réverse transcriptase lorsque celle-ci atteint l'extrémité 5' des ARNm. Les ADNc monocaténaires pleine longueur possèdent donc à leurs extrémités 5' l'extrémité 5' des ARNm leur correspondant ainsi que la séquence complémentaire à l'oligonucléotide SMART.

Les ADNc simples brins ainsi générés servent de matrice à une réaction de PCR longue distance qui utilise comme amorces les deux oligonucléotides SMART et oligo$(dT)_{30}$. Une étape

de chromatographie va permettre de purifier les ADNc doubles brins et d'éliminer les nucléotides non incorporés, les sels et l'ADN polymérase.

Les ADNc doubles brins sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction *Rsa* I qui génère de petits fragments d'ADNc à bouts francs qui permet à la soustraction de se faire dans des conditions optimales. A l'issue de cette digestion, la population "driver" est prête à l'emploi.

La population "tester" est répartie en 2 tubes: une partie est liguée à l'adaptateur 1, l'autre à l'adaptateur 2. Un contrôle est réalisé à ce niveau en liguant les deux adaptateurs à l'échantillon "tester". A l'issue de cette ligation, la population "tester" est prête à l'emploi.

Les deux adaptateurs n'ont pas de groupement phosphate à leurs extrémités, ils ne peuvent donc se liguer qu'à l'extrémité 5' des ADNc. D'autre part, les séquences des deux adaptateurs sont identiques dans leurs parties 5' sur 22 nucléotides, mais différentes dans leurs parties 3'. Cette particularité sera utilisée par la suite lors des deux réactions de PCR en gigogne (ou nested-PCR).

2.2.9.2. Première hybridation

Un excès de la population "driver" est additionnée à chaque population "tester", les mélanges sont dénaturés et l'hybridation est réalisée à 68°C. Quatre types de molécules sont obtenues (Figure 27). A ce stade de l'hybridation, parmi les molécules de type a (ADNc simple brin issus de la population "tester") la concentration en séquences fortement et faiblement représentées s'égalise. En effet, il a été montré que les molécules les plus abondantes se réhybrident les plus vite par suite d'une cinétique d'hybridation du second ordre (James & Higgins, 1985). En outre, la population de molécules de type a se trouve enrichie en séquences différentiellement exprimées car les séquences non différentiellement exprimées vont former les molécules de type c.

2.2.9.3. Deuxième hybridation

Les deux populations issues de la première hybridation sont mélangées sans étape de dénaturation préalable, et un excès de la population "driver" dénaturée est ajouté. Les molécules de type a peuvent alors se réassocier pour donner naissance aux molécules de type e. Ces molécules sont des ADNc doubles brins issus de la population "tester" ayant des extrémités différentes constituées d'un côté de l'adaptateur 1 et de l'autre côté de l'adaptateurs 2. Les extrémités des molécules de type e sont ensuite rendues franches grâce à l'action de l'ADN polymérase utilisée.

2.2.9.4. Réactions de PCR en gigogne (nested-PCR)

L'ensemble des molécules sert alors de matrice à deux réactions de PCR en gigogne pour amplifier spécifiquement les séquences différentiellement exprimées.

2.2.9.4.1. Première PCR

La première PCR utilise comme amorce l'oligonucléotide composé des 22 bases communes aux deux adaptateurs. Le remplissage des extrémités par l'action de l'ADN polymérase conduit à la présence de séquences complémentaires inversées aux extrémités des molécules de type b simples brins. Lors de chaque étape d'hybridation au cours des cycles de PCR, la formation de structures dites en épingle à cheveux est favorisée. Les amplifications non spécifiques sont donc supprimées pendant la PCR d'où le nom de PCR suppressive (Siebert *et al.*, 1995), alors que l'amplification des molécules ayant des adaptateurs différents aux deux extrémités (type e) a lieu normalement. D'autre part, les molécules de type a et d ne peuvent être amplifiées car elles n'ont pas à leurs extrémités les adaptateurs, et les molécules de type c qui n'ont qu'un seul adaptateur à une extrémité ne sont amplifiées que de façon linéaire.

2.2.9.4.2. Deuxième PCR

Cette seconde PCR utilise comme amorces les oligonucléotides correspondants aux extrémités différentes des deux adaptateurs. Elles portent le nom d'amorces gigognes. Cette deuxième PCR permet de réduire encore le bruit de fond et d'enrichir le produit PCR en séquences correspondant à des gènes différentiellement exprimés.

2.2.9.5. Construction d'une minibanque d'ADNc

Les deux produits PCR obtenus à l'issue de la soustraction, correspondant aux gènes préférentiellement exprimés lorsque le champignon est cultivé en présence et en absence de cadmium, ont été purifiés et clonés dans le plasmide pGEM-T (voir chapitre B.V.).

Le mélange de ligation précédent a été utilisé pour transformer la souche DH5αF' d'*E. coli* (voir chapitre B.VI.). Les colonies bactériennes sont prélevées à l'aide de cure-dents stériles, repiquées en plaque de microtitration dont les puits contiennent 100 µl de milieu LB liquide additionné d'ampicilline à 50 µg/ml. Les plaques sont alors incubées pendant 12 h à 37°C.

Afin de conserver les clones bactériens, aux 100 µl de culture sont ajoutés 100 µl de glycérol 70 % stérile. Les clones bactériens sont alors conservés à -70°C, ils constituent la banque physique d'ADNc.

2.2.10. Analyse sur filtre d'ADNc de l'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes à l'aide de filtres d'ADNc a consisté à déposer environ 180 ADNc amplifiés par PCR et dénaturés sur une membrane de nylon N^+. Ces ADNc ont ensuite été hybridés avec une sonde complexe constituée des ADNc issus d'une population d'ARN totaux, marquée radioactivement.

Cette étude a été réalisée avec la collaboration des Drs. C. Voiblet et S. Duplessis qui ont développé cette approche de génomique fonctionnelle chez les champignons ectomycorhiziens au sein de notre U.M.R.

2.2.10.1. Préparation des ADNc à déposer

Les ADNc sont issus de la minibanque d'ADNc conservée sous forme de clones bactériens à -70°C.

2.2.10.1.1. Culture bactérienne

Les plaques de microtitration stockées à -70°C sont repiquées à l'aide d'un réplicateur dans de nouvelles plaques dont les puits contiennent 100 µl de milieu LB liquide additionné d'ampicilline à 50 µg/ml. Les plaques sont alors incubées pendant 12 h à 37°C.

2.2.10.1.2. Amplification des ADNc par PCR

Les ADNc sont amplifiés par PCR à partir des cultures bactériennes. Pour ce faire, une réaction de PCR est réalisée sur 1,5 µl de culture bactérienne, en utilisant les amorces universelles SP6 et T7 du plasmide pGEM-T et les paramètres suivants:

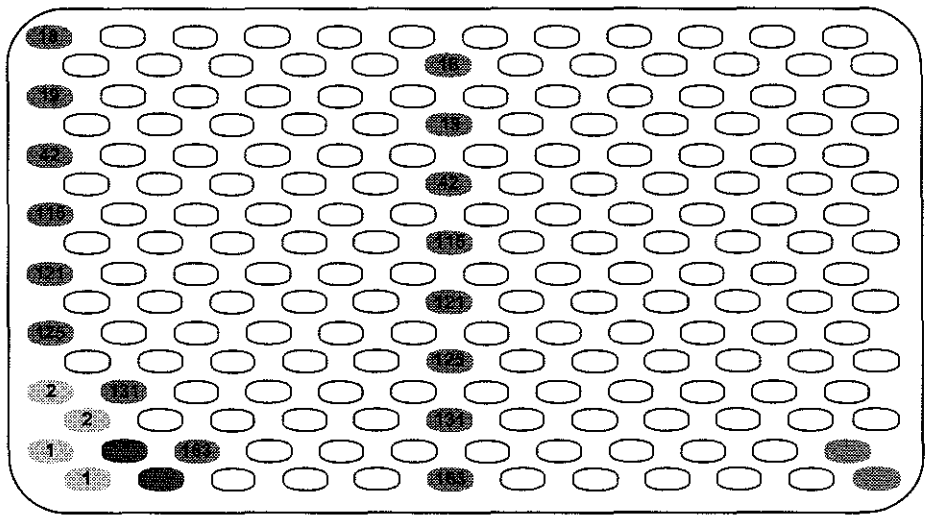
2 min à 94°C
1 min à 94°C
45 sec à 56°C } 35 cycles
2 min à 72°C
10 min à 72°C.

La présence, la taille et la concentration des inserts sont vérifiées par migration, en présence du marqueur de taille ΦX174 DNA/*Hae* III (MBI Fermentas), sur un gel d'agarose à 2 %, puis coloration au BEt. Dans ces conditions, une réaction PCR produit en moyenne 30 ng/µl d'ADN. Les produits d'amplification sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2.10.2. Préparation des filtres d'ADNc

2.2.10.2.1. Dénaturation des ADNc

Pour un dépôt, 10 µl de produit PCR dilué contenant environ 30 ng d'ADN sont utilisés. Ils sont dénaturés par l'addition de 20 µl d'une solution de 10X SSC, 0,2 N NaOH. Le milieu de dénaturation est coloré par l'addition de xylène cyanol (0,0005 %) afin de visualiser les dépôts sur filtres. Les ADNc dénaturés ne sont pas conservés plus d'une journée.



Dépôt du multisite de clonage du plasmide pKS

Dépôt de desmine (1) et de nébuline (2)

Dépôt de clones contrôles

18: acide gras désaturase delta-9
19: protéine MAP kinase
42: protéine ribosomale S27
115: polyphénol oxydase
121: lanostérol synthase
125: protéine ribosomale S27
131: superoxyde dismutase
163: protéine de choc thermique 67B2

Dépôt d'un oligonucléotide $(dT)_{20}$

Figure 28. Schéma de l'organisation du dépôt des clones d'ADNc sur les membranes de nylon N^+.
Chaque membrane supporte 192 dépôts d'ADNc dont 24 sont constitués de clones "contrôles".

2.2.10.2.2. Dépôt des ADNc

Le dépôt est réalisé manuellement à l'aide du système Minifold I Spot-Blot (Schleicher & Schuell) permettant le dépôt de deux fois 96 échantillons sur une membrane de nylon de 9 x 12 cm. Ce système fonctionne par aspiration à l'aide d'une pompe à vide. Une fois tous les échantillons passés, les membranes sont rincées brièvement dans du tampon 2X SSC, puis séchées. Les ADNc sont fixés à la membrane par irradiation aux U.V. pendant 2,5 min. Les membranes sont conservées dans des emballages scellés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.10.2.3. Clones contrôles et organisation des membranes

Afin de réaliser les normalisations indispensables à l'analyse des signaux d'hybridation, nous avons disposé sur chaque filtre d'ADNc 11 clones "contrôles":

- afin de réaliser les normalisations des signaux d'hybridations interfiltres, nous avons utilisé un clone de desmine correspondant à un ADNc isolé à partir d'une banque de muscle humain qui nous a été fourni par Thierry Desprez de l'INRA de Versailles. Pour cela, nous ajoutons dans chacune des sondes une quantité connue et identique (0,5 ng) de desmine. Cet ADNc n'hybride pas le génome de *P. involutus*. Ce n'est pas le cas de la nébuline, clone qui nous a été fourni par la même équipe, qui donne un signal d'hybridation avec le génome de *P. involutus*. Ce dernier clone ne peut donc être utilisé pour les normalisations,

- nous avons inclus dans notre jeu de marqueurs des ADNc correspondant à des gènes connus préalablement isolés chez le champignon *P. involutus*. Ces ADNc (au nombre de 8) correspondent aux gènes codant deux protéines ribosomales, une protéine de choc thermique, une Δ-9 désaturase d'acide gras, une protéine kinase de la famille MAP, une superoxyde dismutase, une phénol oxydase et une lanostérol synthase,

- nous avons également déposé sur chaque filtre des produits PCR correspondant au multisite de clonage des plasmides pKS$^+$ et pGEM-T, ainsi qu'une séquence polyT (20 nucléotides): ils nous renseignent sur l'intensité des hybridations aspécifiques.

Les membranes sont organisées selon le schéma décrit sur la figure 28.

2.2.10.3. Préparation des sondes radioactives

Les sondes radioactives sont préparées à partir d'ARN extraits de mycélium de *P. involutus* cultivé en présence ou en absence de 0,05 ppm de cadmium pendant 12 h (voir chapitre B.II.1.). Un µg d'ARN totaux est ensuite converti en ADNc à l'aide du kit "SMART™ PCR cDNA Synthesis" (Clontech) en suivant les instructions du fournisseur. Environ 200 ng d'ADNc de chacune des conditions sont additionnés de 0,5 ng de desmine, puis dénaturés par la

chaleur (10 min à 100°C) et marqués radioactivement (voir chapitre B.IV.4). Cette synthèse est réalisée en présence de [α-^{32}P]dCTP et de [α-^{32}P]dATP (110 TBq/mmol, Amersham). Les sondes ainsi marquées sont purifiées à l'aide du kit QIAquick Nucleotide Removal (Qiagen). La radioactivité incorporée est quantifiée en utilisant un compteur à scintillation. La radioactivité spécifique de la sonde varie de $1x10^9$ à $2x10^9$ cpm/µg d'ADN.

2.2.10.4. Conditions d'hybridation et de lavage

2.2.10.4.1. Conditions d'hybridation

Une étape préliminaire à l'hybridation est nécessaire pour saturer les sites libres des filtres de nylon où sont fixés les ADNc. Les filtres sont placés par 2 dans un tube à hybridation (faces acides nucléiques vers l'intérieur) en présence de 3 ml/10 cm^2 de tampon de préhybridation (5X SSC, 5X Denhardt, 0,5 % SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé). La préhybridation est réalisée pendant 3 heures à 65°C dans un four à hybridation à agitation rotative (Robbins Scientific).

La sonde marquée ($2x10^6$ cpm/ml de tampon) est dénaturée par chauffage à 100°C pendant 10 min puis refroidie dans la glace avant d'être ajoutée au tampon d'hybridation préchauffé à 65°C. Ce dernier est composé du tampon de préhybridation auquel sont ajoutés (pour 20 ml de tampon de préhybridation):

- 3,5 µg de plasmide pKS$^+$,
- environ 300 ng de polylinker des plasmides pKS$^+$ et pGEM-T fraîchement dénaturés,
- 2,5 µg de polyA (40-60 nucléotides) et polyT (16–18 nucléotides) (Amersham Pharmacia Biotech).

Le tampon de préhybridation est remplacé par 2 ml/10 cm^2 de tampon d'hybridation. L'hybridation est effectuée à 65°C pendant 20 h.

2.2.10.4.2. Conditions de lavages et d'exposition

Après hybridation, les filtres sont d'abord rincés 3 fois à température ambiante dans du 2X SSC, 0,05 % SDS pendant 20 min. Ensuite, les filtres sont lavés à 65°C successivement dans du 2X SSC, 0,1 % SDS; puis dans du 1X SSC, 0,1 % SDS; et enfin dans du 0,1X SSC, 0,1 % SDS. Chaque lavage est réalisé 2 fois dans un laps de temps de 40 min.

Après les lavages, les filtres sont séchés brièvement puis exposés avec un écran de PhosphorImager (Imaging Screen-K, Bio-Rad). Le temps d'exposition varie de 4 à 60 h de façon à faire apparaître le plus grand nombre de signaux.

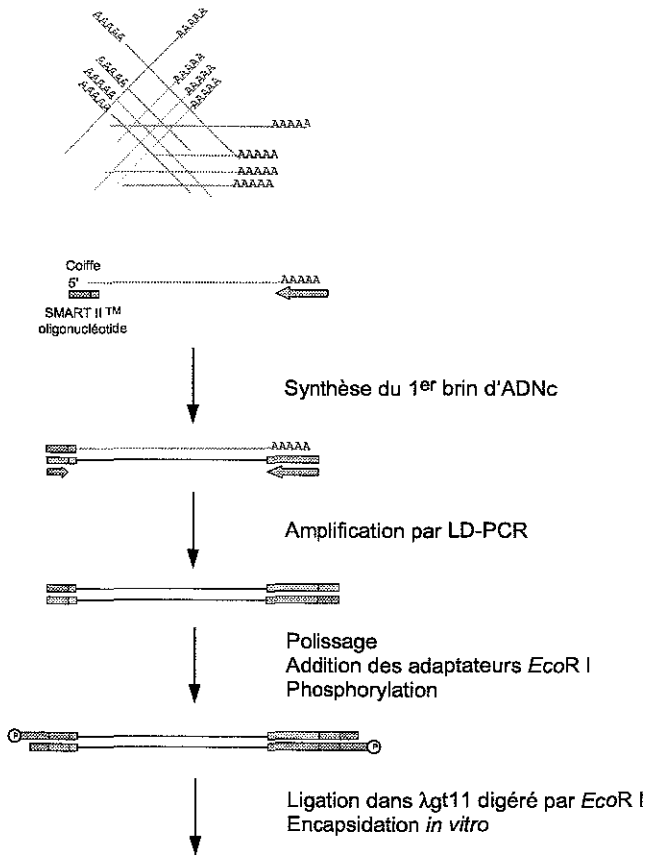


Figure 29. Construction de la banque d'ADNc de *P. involutus* dans le phage λgt11.

2.2.10.5. Numérisation et normalisation des signaux

2.2.10.5.1. Acquisition des données

L'écran activé est ensuite scanné à l'aide du laser Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad), puis les filtres sont numérisés avec une définition de 100 µm. La quantification de chaque signal est réalisée à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad) et les valeurs numériques obtenues sont ensuite transférées vers le logiciel Microsoft Excel en vue de leur traitement.

2.2.10.5.2. Normalisation des données

Le logiciel Quantity One nous donne les valeurs brutes d'intensité des signaux de chacun des ADNc déposés sur les filtres.

La première étape consiste donc à tenir compte du bruit de fond: pour cela, 18 zones sont choisies aléatoirement autour des zones de dépôts pour chaque filtre, sans interférer avec ces dernières. La moyenne de ces 18 valeurs est ensuite retranchée aux valeurs brutes des ADNc déposés sur le filtre considéré.

La deuxième étape est la normalisation interfiltre où les variations entre sondes sont éliminées: la valeur précédente est multipliée par le rapport de la moyenne globale des intensités des signaux du clone de desmine à la moyenne des intensités des signaux du clone de desmine du filtre considéré.

Enfin, pour obtenir une valeur normalisée centrée, la valeur précédente est rapportée à la moyenne globale des intensités des signaux des ADNc déposés sur les membranes. En résumé, nous pouvons établir la formule suivante:

$$\frac{(\text{V. brute} - \text{bckgd}) \times \dfrac{\text{Moy. globale}_{\text{DES}}}{\text{Moy.}_{\text{DES Mbre M}}}}{\text{Moy. globale}_{\text{signaux}}} = \text{V. normalisée centrée}$$

2.2.11. Construction et criblage d'une banque d'ADNc de P. involutus

La banque a été préparée en utilisant le kit "SMART™ PCR cDNA Library Construction" (Clontech) qui permet la synthèse d'ADNc doubles brins à partir d'ARN totaux et leur clonage dans le phage λgt11 (Figure 29). Dans cette méthode, l'oligonucléotide SMART est utilisé comme matrice pour la réverse transcriptase lorsque celle-ci atteint l'extrémité 5' des ARNm. Ce changement de matrice intervient dans la plupart des cas au niveau de la coiffe (7–méthylguanosine) présente en 5' de tous les ARNm eucaryotes (Furuichi & Miura, 1975). L'oligonucléotide SMART pourra ainsi servir d'amorce nucléotidique en 5' des ADNc simples brins pour les réactions de PCR.

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

2.2.11.1. Synthèse des ADNc simples brins

Dans un premier temps, 2 µg d'ARN totaux sont mélangés à 1 µM d'amorce oligo$(dT)_{30}$ additionnée de deux bases aléatoires en 3' et à 1 µM d'oligonucléotide SMART. L'hybridation est effectuée pendant 2 min à 72°C. Après un refroidissement dans la glace pendant 2 min, la synthèse du premier brin est réalisée en ajoutant au mélange précédent: 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 6 mM $MgCl_2$; 75 mM KCl; 2 mM DTT; 1 mM dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et 200 unités (U) de MMLV reverse transcriptase (Gibco BRL) et en incubant le tout 1 h à 42°C. Pour arrêter la réaction, le mélange réactionnel est maintenu dans la glace.

2.2.11.2. Amplification des ADNc par PCR longue distance

L'amplification des ADNc doubles brins est réalisée en mélangeant à 2 µl des ADNc simples brins: 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM 5' PCR primer (oligonucléotide SMART), 0,2 µM d'amorce oligo$(dT)_{30}$ utilisée pour la rétrotranscription, ainsi que le tampon de réaction de l'"Advantage® 2 Polymerase Mix" et l'enzyme proprement dite dans un volume réactionnel final de 100 µl. L'ensemble est placé dans un thermocycleur préchauffé à 95°C. Les conditions de dénaturation de la matrice sont de 1 min à 95°C lors du premier cycle et de 20 sec pour les cycles suivants. Les conditions d'hybridation et de polymérisation sont de 6 min à 68°C. Après 23 cycles, la phase aqueuse est récupérée et une partie aliquote de la réaction est analysée sur un gel d'agarose. Le reste de la réaction est utilisé dans l'étape de polissage des ADNc doubles brins.

2.2.11.3. Polissage des ADNc doubles brins

Cinquante µl de la réaction précédente sont traités par la protéinase K (20 µg/µl) à 45°C pendant 1 h pour inactiver l'ADN polymérase. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 10 min pour inactiver la protéinase K puis refroidi dans la glace. Dans un second temps, 15 U d'ADN polymérase T4 sont additionnées pour générer des extrémités à bouts francs et l'ensemble est incubé 30 min à 16°C. L'ADN polymérase T4 est inactivée par chauffage à 72°C pendant 10 min et les ADNc doubles brins sont précipités en présence de 0,4 M d'acétate d'ammonium et 3,75 volumes d'éthanol 95 %. Le précipité d'ADNc doubles brins est sédimenté par centrifugation à 12000 *g* pendant 20 min, lavé à l'éthanol à 70°C, séché et dissous dans 16 µl d'eau distillée stérile.

2.2.11.4. Fixation d'adaptateurs **Eco*R I*** *et phosphorylation des ADNc*

L'addition d'adaptateurs *Eco*R I à chaque extrémité de l'ADN est réalisée en incubant pendant 16 h à 16°C la solution d'ADN avec 1 mM d'ATP, 11,5 µM d'adaptateur *Eco*R I et 400 U d'ADN ligase T4 dans un tampon réactionnel de 30 µl final, composé de Tris-HCl 50mM,

pH 7,8; $MgCl_2$ 10 mM et DTT 10 mM. La réaction est arrêtée par l'ajout de 20 mM d'EDTA. Après une déprotéinisation au PCIA et au CIA, les acides nucléiques sont précipités par 2,5 volumes d'éthanol 95 % à -20°C en présence d'acétate de sodium 0,3 M. Après une centrifugation de 20 min à 12000 *g*, les acides nucléiques sont séchés et dissous dans 21 µl d'eau distillée stérile.

La phosphorylation des ADNc est réalisée en incubant pendant 30 min à 37°C la solution d'ADN avec 1 mM d'ATP et 30 U de polynucléotide kinase T4 dans un tampon réactionnel de 30 µl final, de même composition que précédemment. De la même façon, la réaction est arrêtée par l'ajout de 20 mM d'EDTA et le mélange est chauffé à 72°C pendant 15 min puis refroidi dans la glace pendant 2 min.

2.2.11.5. Fractionnement des ADNc selon leur taille

Une étape de chromatographie va permettre de fractionner les différentes molécules d'ADN en fonction de leur taille et de sélectionner les ADNc d'une taille supérieure à 400 pb. Cela permet également d'éliminer les adaptateurs résiduels, les nucléotides non incorporés, ainsi que les dimères d'adaptateurs et d'amorces nucléotidiques. La colonne est lavée deux fois avec 700 µl de tampon TNE (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 30 mM NaCl; 0,5 mM EDTA). La solution d'ADN précédente est additionnée d'un µl de xylène cyanol (1 %) et déposée sur la colonne. Après une première élution avec 170 µl de tampon TNE, 600 µl de tampon sont ajoutés sur la colonne et des fractions de 35 µl sont collectées. Une partie aliquote de chaque fraction est analysée sur un gel d'agarose et les deux fractions qui apparaissent les plus intenses sont récupérées ainsi que les deux fractions avant et après celles-ci. Les acides nucléiques contenus dans les fractions sont précipités par 2,5 volumes d'éthanol 95 % à -20°C en présence d'acétate de sodium 0,3 M pH 4,8 et de 26 µg de glycogène. Le précipité d'ADNc doubles brins est sédimenté par centrifugation à 12000 *g* pendant 20 min, séché et dissous dans 6 µl d'eau distillée stérile.

2.2.11.6. Ligation dans le phage λgt11

Les ADNc ainsi sélectionnés sont donc prêts pour être ligués entre les bras du phage λgt11 digérés par *Eco*R I et déphosphorylés. Pour cela, 1,5 µl d'ADNc sont mis en contact de 500 ng du phage λgt11 et 200 U d'ADN ligase T4 dans un tampon réactionnel de 5 µl final composé de Tris-HCl 50mM, pH 7,8; ATP1 mM; $MgCl_2$ 10 mM et DTT 10 mM. La ligation est réalisée pendant 16 h à 16°C.

2.2.11.7. Encapsidation in vitro

L'ADN phagique n'est pas nu mais entouré d'une coque protéique ou capside. Le principe de préparation de l'extrait d'encapsidation est le suivant: les protéines nécessaires à la

constitution du phage sont extraites de deux souches d'*E. coli* lysogènes. Dans chacune de ces souches, le phage est intégré dans le chromosome bactérien sous forme de prophage. Ces prophages sont mutés de telle façon que l'extrait protéique d'une seule souche n'est pas suffisant pour l'encapsidation d'ADN phagique, mais que le mélange des deux extraits contienne tous les composants nécessaires à l'encapsidation. Ils possèdent également une mutation température-sensible dans le gène *c*I. L'accumulation des protéines d'encapsidation est réalisée en induisant les fonctions lytiques du phage par augmentation de la température de culture bactérienne à 45°C, ce qui a pour conséquence d'inactiver la protéine répresseur virale *c*I.

En pratique, Stratagene commercialise un extrait d'encapsidation prêt à l'emploi: "Gigapack III Gold Packaging Extract". Les ADNc ligués à l'ADN du phage λgt11 sont mis en contact de 25 µl d'extrait contenant tous les constituants nécessaires à l'encapsidation et sont incubés 2 h à 22°C. L'ensemble est alors dilué dans 500 µl de tampon de dilution des phages (35 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM $MgSO_4$,$7H_2O$; 0,01 % gélatine (p/v)) et additionné de 20 µl de chloroforme. Les débris bactériens sont éliminés par une centrifugation rapide, et le surnageant contenant les phages est conservé à 4°C.

2.2.11.8. Préparation de cellules compétentes pour les phages

Une colonie isolée de Y1090r$^-$ est utilisée pour inoculer 15 ml de milieu LB contenant 10 mM $MgSO_4$ et 0,2 % maltose. Le maltose permet d'induire l'opéron maltose qui contient le gène *lamB* qui code des récepteurs de ce sucre. C'est sur ces récepteurs que s'adsorbent les phages λ. Le $MgSO_4$ permet une adsorption optimale des phages. La culture est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une absorbance à 600 nm de 2.

2.2.11.9. Titration de la banque d'ADNc et détermination du pourcentage de clones recombinants

Dans le but d'estimer le nombre de clones indépendants de la banque, une titration des phages est réalisée. Une série de quatre dilutions (5, 10, 15, 20) de la réaction d'encapsidation est effectuée dans le tampon de dilution des phages puis 1 µl de chaque dilution est alors incubé avec 200 µl de bactéries compétentes à 37°C pendant 15 min. Après adsorption des particules virales sur les bactéries, le mélange est additionné de 3 ml de top agarose fondu (composé de 7,2 g d'agarose pour 1 l de milieu LB) contenant 10 mM $MgSO_4$, 2,5 mM X-Gal et 2,5 mM IPTG. L'ensemble est ensuite étalé sur une boîte de LB/$MgSO_4$ gélosé préchauffée à 37°C et séchée et incubé à 37°C pendant 16 h. Le nombre de plages de lyse est déterminé dans chaque boîte où les plages ne sont pas confluentes, et le titre de la banque est calculée à partir de la formule suivante:

$$\frac{\text{nombre de plages de lyse x facteur de dilution x } 10^3}{\text{volume de dilution étalé}} = \text{ufp/ml}$$

Le pourcentage de clones recombinants est estimé à l'aide du rapport du nombre de plages de lyse blanches sur le nombre de plages bleues.

2.2.11.10. Amplification de la banque d'ADNc

L'amplification de la banque d'ADNc est réalisée pour augmenter la durée de conservation de la banque construite. Pour cela, 500 µl de bactéries compétentes sont ajoutés à un volume suffisant de réaction d'encapsidation pour obtenir environ 6-7.10^4 plages de lyse par boîtes de 150 mm de diamètre. Après adsorption des particules virales sur les bactéries, le mélange est additionné de 4,5 ml de top agarose fondu contenant 10 mM $MgSO_4$. L'ensemble est ensuite étalé sur une boîte de LB/$MgSO_4$ gélosé préchauffée à 37°C et séchée et incubé à 37°C pendant 16 h, jusqu'à ce que les plages de lyse deviennent confluentes. Pour récupérer la banque amplifiée, chacune de ces boîtes est recouverte de 12 ml de tampon de dilution des phages et incubée à 4°C pour la nuit. Après une incubation de 1 h à température ambiante sur un agitateur orbital, la solution de phages est récupérée, traitée au chloroforme [20 % (v/v)], et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 5000 *g* pendant 10 min. La banque amplifiée est conservée à 4°C ainsi qu'en fractions de 1 ml contenant 7 % DMSO à -70°C.

2.2.11.11. Criblage de la banque d'ADNc de **P.involutus**

2.2.11.11.1. Etalement des phages

La préparation des cellules compétentes ainsi que l'adsorption des phages est réalisée comme décrit précédemment en additionnant 200 µl de bactéries compétentes et une quantité appropriée de phages en fonction du titre de la banque et de la quantité souhaitée de plages de lyse par boîte. L'incubation est maintenue pendant 15 min à 37°C. Par la suite, 3 ml de top agarose sont additionnés au mélange et le tout est étalé sur une boîte de LB/$MgSO_4$ et incubé à 37°C pendant 16 h.

2.2.11.11.2. Réalisation d'empreintes des plages de lyse et hybridation moléculaire

La méthode a été décrite précédemment au chapitre B.III.

2.2.11.11.3. Récupération d'un clone recombinant positif

Le léger bruit de fond permet d'aligner l'autoradiogramme et les disques de nylon. D'autre part, à l'aide des repères réalisés sur les disques de nylon, il est possible de repérer sur

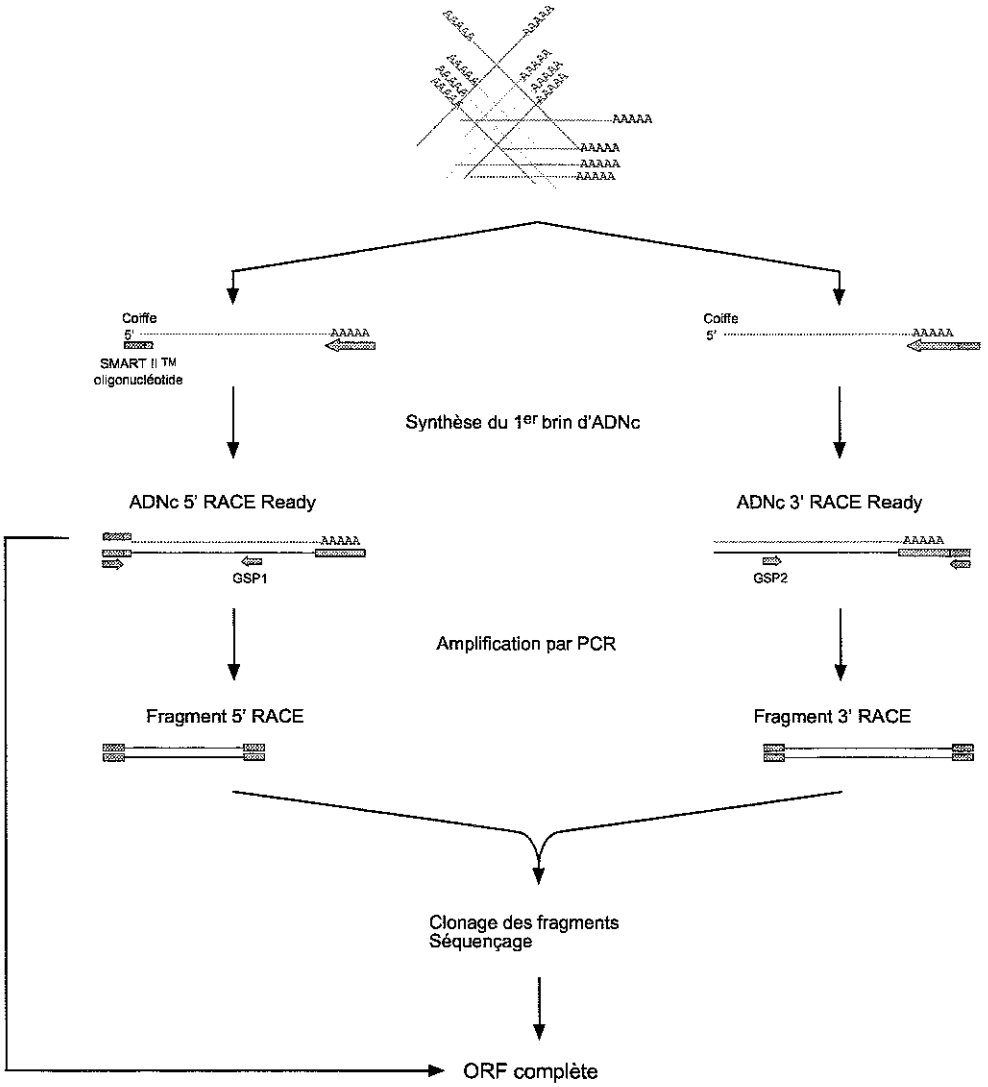


Figure 30. Principe de la technique SMART™ RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends). Les ARN totaux sont d'abord convertis en deux populations d'ADNc simple brins (5'- et 3'-RACE Ready) en utilisant la technologie SMART™ (Clontech). L'amplification des fragments RACE (5' ou 3') utilise une amorce universelle qui reconnaît une séquence nucléotidique commune à l'oligonucléotide SMART™ et à l'oligo$(dT)_{30}$ modifié et une amorce spécifique de l'ADNc étudié (GSP).Ces fragments peuvent ensuite être clonés et séquencés. L'analyse des séquences nucléotidiques permettra de concevoir des amorces spécifiques aux deux extrémités de l'ADNc étudié et de l'amplifier à partir de la population 5'-RACE Ready.

SCD Université Nancy 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

les boîtes de Pétri les plages de lyse qui donnent un signal d'hybridation avec la sonde utilisée. Ces plages de lyse sont prélevées par carottage et placées dans 1 ml de tampon de dilution des phages additionné d'une goutte de chloroforme pour permettre la diffusion des phages qu'elles contiennent. Si la plage de lyse n'était pas bien isolée, la solution de phages peut être utilisée pour infecter des bactéries compétentes afin de réétaler les clones sélectionnés et obtenir des plages de lyse bien individualisées. Lorsque la solution de phages est issue d'une plage de lyse et d'une seule, elle est utilisée comme matrice dans les réactions de PCR afin d'amplifier l'insert cloné dans les bras du phage. Le produit PCR pourra être soit séquencé directement ou bien cloné dans un vecteur approprié.

2.2.12. Technique d'amplification rapide des extrémités des ADNc ou RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends)

La technique RACE (Frohman *et al.*, 1988) permet d'amplifier des séquences d'ADNc inconnues à partir de séquences connues, soit du côté 5' de la séquence connue, soit du côté 3': on parle alors de 5'- ou de 3'-RACE. Par hybridation soustractive suppressive, nous avons obtenu des fragments d'ADNc. Cette technique nous permet d'obtenir les ADNc pleine longueur. Il existe plusieurs variantes de la technique RACE, nous avons utilisé celle proposée par le kit "SMART™ RACE cDNA Amplification Kit" commercialisé par Clontech (Figure 30). Cette méthode fait également appel à la technologie SMART™.

2.2.12.1. Conception d'amorces

Des amorces spécifiques du gène étudié (GSP pour gene specific primer) sont conçues pour les réactions de 5'- et 3'-RACE. Les amorces doivent répondre à certains critères comme une longueur d'environ 25 nucléotides, un pourcentage en bases guanine plus cytosine voisin de 60 % et une valeur de Tm supérieure à 70°C. Deux amorces sont nécessaires: une amorce antisens (GSP1) pour les réactions de PCR de 5'-RACE et une amorce sens (GSP2) pour les réactions de PCR de 3'-RACE. Les amorces répondent également aux règles énoncées au chapitre VII.1. Pour nous aider dans la conception de ces amorces, nous avons utilisé le serveur de Williamstone Enterprises (http://www.williamstone.com/primers) qui permet de définir des couples d'amorces sur une séquence nucléotidique donnée selon les critères que nous lui imposons.

2.2.12.2. Synthèse des ADNc simples brins

Dans un premier temps, les ADNc 5'-RACE Ready et 3'-RACE Ready sont préparés. A 1 µg d'ARN totaux sont ajoutés 1 µM d'amorce oligo$(dT)_{25}$ additionnée de deux bases aléatoires en 3' et 1 µM d'oligonucléotide SMART II pour la préparation de l'échantillon d'ADNc 5'-RACE Ready, ou bien 1 µM d'amorce oligo$(dT)_{30}$ greffée à une portion de l'oligonucléotide SMART II

en 5' et additionnée de deux bases aléatoires en 3' pour la préparation de l'échantillon d'ADNc 3'–RACE Ready. L'hybridation est effectuée pendant 2 min à 72°C. Après un refroidissement dans la glace pendant 2 min, la synthèse du premier brin est réalisée en ajoutant à chacun des mélanges précédents: 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 6 mM $MgCl_2$; 75 mM KCl; 2 mM DTT; 1 mM dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et 200 U de MMLV reverse transcriptase (Gibco BRL) et en incubant le tout 1,5 h à 42°C. Le produit de réaction est dilué dans 100 µl de tampon tricine-EDTA (10 mM Tricine-KOH pH 8,5; 1 mM EDTA) et chauffé pendant 7 min à 72°C.

2.2.12.3. Amplification rapide des extrémités des ADNc (RACE)

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

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

Une touchdown PCR est pratiquée afin d'augmenter la spécificité de l'amplification. La température d'hybridation des premiers cycles de PCR est supérieure au Tm de l'UPM, et donc seule l'élongation à partir de l'amorce GSP a lieu. Puis le température d'hybridation est baissée pour permettre à l'UPM de s'hybrider, ce qui conduit à une amplification très spécifique. Les conditions de réaction de PCR sont les suivantes: 5 cycles composés des 2 étapes suivantes: 94°C pendant 5 sec, 72°C pendant 3 min; suivis de 5 cycles composés des 3 étapes suivantes: 94°C pendant 5 sec, 70°C pendant 10 sec, 72°C pendant 3 min; puis 22 cycles composés des 3 étapes suivantes: 94°C pendant 5 sec, 67°C pendant 10 sec, 72°C pendant 3 min.

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

L'analyse sur gel d'agarose des produits de 5'-RACE PCR et de 3'-RACE PCR révèle la présence de bandes uniques. Les produits PCR ont été purifiés sur gel à l'aide du kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) et clonés dans le plasmide pGEM-T comme décrit au chapitre B.IV. Les minipréparations correspondant à chacun des fragments 5'- et 3'-RACE ont servi de matrice aux réactions de séquençage afin (1) de s'assurer que l'amplification a bien été spécifique du gène étudié et (2) de séquencer les régions voisines du codon ATG initiateur de la traduction et du codon stop.

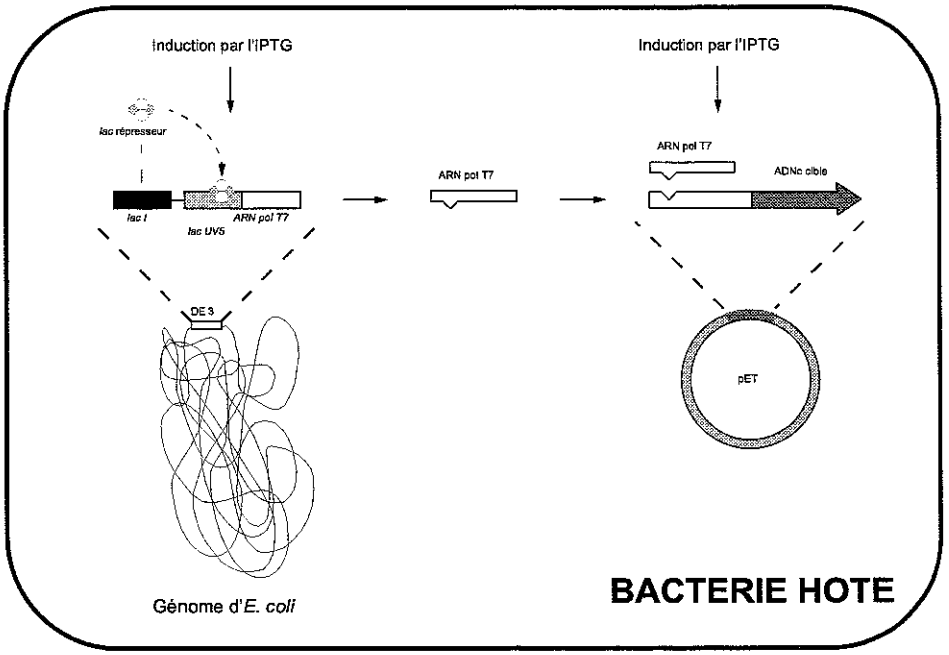


Figure 31. Description du système de surexpression pET.

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

2.2.12.5. Clonage du cadre ouvert de lecture (O.R.F.) de l'ADNc étudié

La connaissance des séquences nucléotidiques de ces deux régions (ATG et Stop) de l'ADNc va nous permettre de concevoir un nouveau couple d'amorces pour amplifier par PCR longue distance l'ORF entier. Pour faciliter le clonage orienté de cet ORF, chaque amorce est additionnée à son extrémité 5' d'un site de restriction différent.

L'ORF est généré en utilisant l'ADNc 5'-RACE Ready comme matrice et les deux amorces spécifiques des codons ATG et Stop dans les réactions de PCR RACE décrites au paragraphe précédent. Les conditions de réaction de PCR sont les mêmes que celles décrites précédemment.

L'analyse sur gel d'agarose du produit de PCR longue distance révèle la présence d'une bande unique. Cette bande a été purifiée sur gel à l'aide du kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Pharmacia Biotech), clonée dans le plasmide pKS$^+$ comme décrit au chapitre B.IV. et séquencée.

2.2.13. Surexpression d'une superoxyde dismutase manganèse-dépendante

2.2.13.1. Description du système d'expression pET

Ce système d'expression qui utilise le plasmide pET (plasmide d'expression dépendant de l'ARN polymérase T7) a été mis au point par Studier & Moffatt (1986). Ce plasmide résulte de l'addition de fragments d'ADN du phage T7 au niveau du site *Bam*H I du vecteur pBR322. Ces fragments contiennent le promoteur fort ϕ10 et le terminateur de transcription ϕ10 du gène codant la protéine P10 de la capside du phage T7. Ils possèdent également la région initiatrice de la traduction de cette protéine (séquence Shine-Dalgarno ou Ribosomes Binding Site). Les sites de restriction disponibles pour le clonage d'un fragment d'ADN sont, dans le cas du vecteur pET3d, *Nco* I et *Bam*H I. Le site de restriction *Nco* I (CCATGG) qui contient le triplet ATG (correspondant au codon initiateur de la traduction) est situé 10 pb en aval de la séquence Shine-Dalgarno. Ceci va permettre l'insertion de la séquence codante dans le vecteur dans le bon cadre de lecture et une traduction efficace.

Ce système de surexpression est illustré par la figure 31. La bactérie hôte utilisée est une bactérie de type *E. coli* dont le génome a été modifié: elle possède une copie chromosomique du gène codant l'ARN polymérase T7. Cette souche est lysogène pour le bactériophage DE3 qui porte un fragment d'ADN contenant le gène *lacI*, le promoteur *lacUV5*, et le gène pour l'ARN polymérase T7 (Studier & Moffatt, 1986). Ce dernier est sous le contrôle du promoteur *lacUV5* qui est inductible par l'IPTG. La présence d'IPTG dans le milieu de culture induit donc la production de l'ARN polymérase T7 qui va à son tour reconnaître le promoteur ϕ10 et transcrire le gène inséré dans le plasmide. Le terminateur ϕ10 permettra la formation d'une structure en épingle à cheveux dans la partie 3' terminale du transcrit, améliorant ainsi la stabilité de ce

dernier. Le messager sera alors traduit par le système bactérien grâce à la séquence Shine-Dalgarno. La stabilité de la lysogénie est assurée par l'insertion de l'ADN du bactériophage DE3 dans le gène *int*, ce qui empêche l'excision ou l'intégration du bactériophage dans le chromosome bactérien sans l'intervention d'un phage helper.

Dans notre étude, nous avons utilisé la bactérie hôte BL21 (DE3) préalablement transformée avec le plasmide pSBET qui contient le gène *arg*U codant l'ARN de transfert des codons AGA et AGG (codant pour l'arginine) ou $ARNt_{arg4}$(Schenk *et al.*, 1995). Ce codon est utilisé une fois dans la protéine superoxyde dismutase manganèse-dépendante et est considéré comme rare chez *E. coli*.

2.2.13.2. Surexpression de la protéine d'intérêt

2.2.13.2.1. Construction du vecteur d'expression pETsod

L'ADNc codant la superoxyde dismutase manganèse-dépendante de *P. involutus* a été isolé par criblage de la banque phagique d'ADNc. La solution de phages, issue d'une plage de lyse unique donnant un signal d'hybridation avec la sonde spécifique de la superoxyde dismutase, est utilisée comme matrice dans une réaction de PCR. Les amorces choisies pour cette amplification vont permettre de supprimer les extrémités 5' et 3' de l'ADNc transcrites mais non traduites (5' et 3' UTR) et d'ajouter aux extrémités des produits amplifiés les sites de restriction *Nco* I et *Bam*H I en vue d'un clonage orienté dans le vecteur de surexpression pET3d.

L'amorce en amont ou 5'*Pi*MnSOD est composée de 5 bases flottantes, du site de restriction *Nco* I et de 15 bases complémentaires du brin transcrit, non codant. L'amorce en aval ou 3'*Pi*MnSOD comporte dans sa partie 5' les mêmes 5 bases flottantes que l'amorce 5'*Pi*MnSOD puis le site de restriction *Bam*H I et 18 bases complémentaires du brin non transcrit, codant. Les bases aléatoires flottantes permettent une meilleure "assise" pour les digestions enzymatiques ultérieures des fragments de PCR. La séquence des deux amorces est donnée dans le paragraphe 3.2.

La réaction de PCR est réalisée dans les conditions décrites au chapitre B.VI.: l'ADN polymérase utilisée est l'"Advantage® 2 Polymerase Mix" (Clontech), l'amplification est réalisée dans les conditions décrites au paragraphe 2.2.7.3 avec une étape d'hybridation de 1 min à 68°C et une étape d'élongation de 1 min à 72°C.

L'insertion du produit PCR correspondant à l'ORF codant la superoxyde dismutase Mn-dépendante dans le plasmide pET3d est réalisée comme décrit précédemment (paragraphe 2.2.5). Des cellules DH5αF' préparées selon la méthode de Hanahan (1983) sont transformés par choc thermique avec les produits de ligation comme cela est détaillé dans le chapitre B.V.. Afin d'identifier le contenu plasmidique des colonies bactériennes obtenues, une réaction de PCR est effectuée en utilisant les amorces spécifiques de l'insert (5'*Pi*MnSOD et 3'*Pi*MnSOD) dans les conditions décrites ci-dessus. Les colonies qui répondent positivement sont mises en culture

liquide dans le but d'en extraire l'ADN plasmidique qui est alors digéré par les deux enzymes de restriction *Nco* I et *Bam*H I et analysé sur gel d'agarose afin de vérifier la qualité du clonage. Un de ces plasmides présentant le profil de restriction attendu a été appelé pETsod et utilisé dans la suite des expériences.

Le plasmide pETsod a été ensuite utilisé pour transformer la souche de surexpression BL21(DE3) pSBET d'*E. coli* par électroporation.

2.2.13.2.2. Conditions de surexpression

Une colonie isolée de BL21(DE3) pSBET contenant le plasmide pETsod est prélevée, placée dans 3 ml de milieu LB contenant 50 µg/µl d'ampicilline et la préculture est incubée à 37°C avec agitation. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance (DO à 600 nm = 0,5), 100 ml de milieu LB additionné de 50 µg/µl d'ampicilline sont ensemencés au 3/100ème par cette préculture. Quand l'absorbance à 600 nm atteint une valeur d'environ 0,5, l'induction est réalisée en additionnant 0,4 mM d'IPTG et l'agitation est maintenue pendant 5 h à 37°C. Pour estimer la surexpression de la protéine, les cellules sont collectées par centrifugation à 6500 *g* à 4°C pendant 10 min et stockées à -20°C.

*2.2.14. Complémentation fonctionnelle d'une souche SOD déficiente d'*E. coli

2.2.14.1. Description du système utilisé

Le système d'expression qui utilise le plasmide pTrc99A a été développé par Amann *et al.* (1988) et est un dérivé du plasmide pKK233-2 (Amann & Brosius, 1985). Les vecteurs pTrc contiennent le promoteur fort *trc* et les terminateurs de transcription T1 et T2 de l'opéron *rrnB* de part et d'autre d'un multisite de clonage provenant du plasmide pUC18 qui est situé en aval du codon ATG lui-même inclus dans le site de restriction unique *Nco* I situé 8 pb en aval de la séquence Shine-Dalgarno. Le promoteur fort *trc* est un hybride des promoteurs *trp* (région -35) et *lacUV5* (région -10 et séquence Shine-Dalgarno) pour lequel l'espacement entre les séquences consensus -10 et -35 est de 17 pb (Brosius *et al.*, 1985). Le gène *rop* du plasmide pBR322 a été délété lors de la construction des plasmides pTrc, ce qui leur confère un plus grand nombre de copies par chromosome. Le gène *lac* I^q a été inséré dans le plasmide pTrc99A afin que le vecteur produise son propre répresseur. Le promoteur *trc* peut donc être réprimé par le répresseur *lac* et induit par l'IPTG. La présence d'IPTG dans le milieu de culture induit donc la transcription du gène inséré dans le plasmide. Les terminateurs permettront la formation de structures en épingle à cheveux dans la partie 3' terminale du transcrit, améliorant ainsi la stabilité de ce dernier. Le messager sera alors traduit par le système bactérien grâce à la séquence Shine-Dalgarno.

La bactérie utilisée est une bactérie de type *E. coli* dont le génome a été modifié. La délétion Δ(*rha-pfkA*)15 contenant Δ*sodA* de la souche CGSC 6740 d'*E. coli* a été transférée à la

souche sauvage MG1655 par transduction à l'aide du bactériophage P1. Les bactéries tétracycline-sensibles ont été isolées et la délétion Δ*sodB* a été introduite en remplaçant le gène *sodB* par une cassette codant la résistance à la kanamycine par recombinaison homologue. La souche Δ*sod*A, Δ*sod*B obtenue est nommée OX326A (Steinman, 1992). Cette souche nous a été fournie par le Pr. Howard Steinman (Albert Einstein College of Medicine, New-York).

2.2.14.2. Complémentation fonctionnelle

2.2.14.2.1. Construction du vecteur pTrcsod

L'ADNc codant la superoxyde dismutase manganèse-dépendante de *P. involutus* a été amplifié par PCR dans les mêmes conditions qu'au paragraphe 2.2.13.2.1., en utilisant le même couple d'amorces.

L'insertion du produit PCR correspondant à l'ORF codant la superoxyde dismutase Mn-dépendante dans le plasmide pTrc99A est réalisée comme décrit précédemment (paragraphe 2.2.5). Des cellules DH5αF' préparées selon la méthode de Hanahan (1983) sont transformées par choc thermique avec les produits de ligation comme cela est détaillé dans le paragraphe 2.2.6.1.1. Afin d'identifier le contenu plasmidique des colonies bactériennes obtenues, une réaction de PCR est effectuée en utilisant les amorces spécifiques de l'insert (5'*Pi*MnSOD et 3'*Pi*MnSOD) dans les conditions décrites au paragraphe 2.2.13.2.1. Les colonies qui répondent positivement sont mises en culture liquide dans le but d'en extraire l'ADN plasmidique qui est alors digéré par les deux enzymes de restriction *Nco* I et *Bam*H I et analysé sur gel d'agarose afin de vérifier la qualité du clonage. Un de ces plasmides présentant le profil de restriction attendu a été appelé pTrcsod et utilisé dans la suite des expériences.

Les plasmides pTrc99A et pTrcsod ont été utilisés pour transformer la souche OX326A d'*E. coli* selon la méthode de Hanahan (1983).

2.2.14.2.2. Traitement au paraquat

Le paraquat (ou methyl viologen) est un composé bipyridylique (1,1'–diméthyl–4,4'–bipyridinium chloride) qui possède un potentiel rédox très bas. C'est un accepteur d'électrons artificiel de différentes sources (comme de la NADPH cytochrome P450 réductase) dont la réoxydation en présence d'oxygène moléculaire (O_2) produit des radicaux libres ($O_2^{\cdot-}$) qui sont à la base de son activité cytotoxique.

Une colonie isolée de la souche OX326A, de la souche OX326A contenant le plasmide pTrc99A et de la souche OX326A contenant le plasmide pTrcsod sont prélevées, placées dans 3 ml de milieu LB contenant 50 µg/µl de kanamycine plus 50 µg/µl d'ampicilline, pour les souches contenant l'un ou l'autre des deux plasmides, et la préculture est incubée à 37°C avec agitation. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance (DO à 600 nm = 0,5),

Tableau 25. Composition du tampon d'extraction des protéines à partir de mycélium.

Composants	
Tris-HCl pH 7,8	100 mM
MgSO4	5 mM
EDTA	2 mM
Glycérol	10 % (v/v)
PVP-40	2 % (p/v)
PVPP	50 % (p/p)
Triton X-100	0,8 %

l'induction est réalisée en additionnant 1 mM d'IPTG et l'agitation est maintenue pendant 6 h à 37°C. Pour chaque culture, une même quantité de cellules est ensuite étalée sur les boîtes de sélection. Les cultures induites par l'addition de 1 mM d'IPTG sont étalées sur des boîtes de milieu LB contenant l'antibiotique approprié, 1 mM d'IPTG et 50 µM de paraquat. Des contrôles sans paraquat sont effectués simultanément. Les cultures non induites sont étalées sur des boîtes de milieu LB contenant l'antibiotique approprié en présence ou en absence de 50 µM de paraquat.

Les cellules d'une fraction aliquote de chaque culture bactérienne sont collectées par centrifugation à 6500 *g* à 4°C pendant 10 min puis conservées -20°C. Pour chaque culture, la production de MnSOD sera estimée sur gel d'acrylamide.

2.2.15. Techniques d'analyse des protéines

2.2.15.1. Préparation des échantillons protéiques et dosages

2.2.15.1.1. A partir de mycélium

Toutes les opérations d'extraction sont effectuées à une température de 4°C. Une suspension à 6 % de DEAE-Cellulose (Merck Eurolab) est préalablement préparée dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8, NaCl 1 M. Le mycélium (100 mg) est broyé au mortier, en présence de sable de Fontainebleau (0,5 g/g de matière fraîche) dans 10 volumes de tampon d'extraction donné dans le tableau 25. L'extrait est ensuite centrifugé à 16000 *g* pendant 20 min. La concentration en NaCl de 500 µl de surnageant est ajustée à 1 M, et 1,3 ml de suspension de DEAE-Cellulose préalablement préparée sont ajoutés. Le mélange est ensuite centrifugé à 16000 *g* pendant 20 min. Le surnageant est collecté et concentré en utilisant une colonne Microsep 10 kDa (Pall Filtron Corp.) jusqu'à un volume résiduel de 150 µl. Cet extrait purifié est utilisé par la suite pour doser l'activité SOD.

2.2.15.1.2. A partir de cellules bactériennes

– Préparation des protéines totales

Ce protocole permet d'estimer la production de protéine directement sur les cellules bactériennes: il donne accès aux protéines totales. Le culot bactérien correspondant à 1 ml de culture est resuspendu dans 100 µl de tampon KP (50 mM tampon phosphate,1 mM EDTA, pH 7.8) et lysé par traitement aux ultrasons à 0°C sous une puissance de 200 W pendant 1,5 min par périodes de 1 s d'ultrasons et 1 s d'arrêt à l'aide de l'appareil Branson Sonifier 250. Le lysat obtenu contient les protéines bactériennes totales et est conservé à -20°C.

– *Préparation des protéines solubles*

Le culot bactérien issu de la culture à analyser est repris dans le tampon KP additionné de 100 µg/ml de lysozyme et de 1 mM PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride) et incubé à 30°C pendant 15 min. Cette étape permet de fragiliser la paroi bactérienne grâce à l'action du lysozyme au niveau de la couche de peptidoglycane, le PMSF assurant un environnement exempt d'activité protéasique. Le mélange est alors lysé par traitement aux ultrasons dans les mêmes conditions que précédemment. Après une centrifugation de 30 min à 12000 *g*, le surnageant obtenu constitue l'extrait protéique soluble qui est conservé à -20°C.

– *Préparation des protéines insolubles*

Le culot bactérien issu de la culture induite est repris dans le tampon TET (20 mM Tris–HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 1 % Triton-X100) et lysé par traitement aux ultrasons. Après une centrifugation de 10 min à 10000 *g*, le culot est repris dans le tampon TET et centrifugé à nouveau. Cette étape de lavage est répétée une fois, le culot obtenu repris dans du SDS 1 % et conservé à -20°C.

2.2.15.1.3. Détermination de l'activité SOD

La méthode de mesure de l'activité SOD dérive de celle décrite par Beauchamp & Fridovich (1971) et consiste à suivre l'inhibition de la photoréduction du nitroblue tetrazolium (NBT) par la superoxyde dismutase en présence d'oxygène. La riboflavine photoréduite va être capable de réduire le NBT *via* O_2^- comme porteur d'électrons, qui est le substrat de la réaction catalysée par la superoxyde dismutase. La présence de superoxyde dismutase dans le milieu réactionnel se traduit donc par une inhibiton de la réduction du NBT.

Le milieu réactionnel est composé de tampon phosphate 50 mM, pH 7,8; 0,1 mM EDTA; 13 mM méthionine; 75 µM NBT; 2 µM riboflavine et de l'extrait protéique. La riboflavine est ajoutée en dernier, et la réaction est initiée en plaçant les tubes sous une source de lumière intense. Après 10 min, le produit de la réaction est dosé à 560 nm. Des témoins non éclairés et éclairés sans extrait protéique sont réalisés en parallèle.

Le volume d'extrait protéique correspondant à 50 % d'inhibition de la réaction équivaut à une unité d'enzyme (Beauchamp & Fridovich, 1971).

2.2.15.1.4. Dosage des protéines

– *Méthode développée par Bradford (1976)*

Cette technique de dosage repose sur le déplacement d'absorption de 465 nm à 595 nm

qui se produit lorsque le bleu de Coomassie se lie aux protéines. Le dosage utilise le réactif de Pierce (Bleu de Coomassie G 250) qui ne nécessite ni dilution, ni filtration et qui peut se conserver intact pendant plusieurs mois. Cette méthode est très sensible et la détection n'est pas affectée par de nombreuses substances susceptibles d'interférer lors de l'utilisation d'autres réactifs.

Aux 500 µl d'extrait protéique dilué ou non sont ajoutés 500 µl de réactif de dosage. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la densité optique est lue au spectrophotomètre (Uvikon 941, Kontron Instruments) à 595 nm contre un témoin sans protéines. La quantité de protéines de la prise d'essai est déterminée par référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations croissantes en sérum albumine bovine de 0 à 25 µg/ml de mélange réactionnel.

– Dosage des protéines bactériennes insolubles

La technique de dosage utilisée repose sur la réduction d'ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} par les protéines en milieu alcalin. Un complexe coloré en pourpre est formé par la chélation d'un ion Cu^{+} par deux molécules de BCA (bicinchoninic acid). Le dosage utilise le kit "BCA-200 Protein Assay" (Pierce) qui est compatible avec les détergents couramment utilisés pour solubiliser les protéines (par exemple: 1 % SDS).

A 1 ml de réactif de dosage fraîchement préparé sont ajoutés 50 µl d'extrait protéique des fractions insolubles. Après 30 min d'incubation à 37°C, la densité optique est lue au spectrophotomètre (Uvikon 941, Kontron Instruments) à 562 nm contre un témoin sans protéines. La quantité de protéines de la prise d'essai est déterminée par référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations croissantes en sérum albumine bovine de 0 à 25 µg/ml de mélange réactionnel.

2.2.15.2. Techniques électrophorétiques

2.2.15.2.1. Electrophorèse non-dénaturante sur gel de polyacrylamide

– Principe

Cette technique possède un haut pouvoir résolutif pour la séparation des protéines et surtout pour la détection d'isoformes d'une même enzyme. En effet, ces macromolécules sont soumises simultanément à une filtration moléculaire sur le tamis constitué par l'acrylamide et à une migration dans un champ électrique dépendante de leur charge. La technique employée est celle de Davis (1964), modifiée.

Tableau 26. Composition des gels de concentration et de séparation pour électrophorèse en conditions non-dénaturantes.

Pour 10 ml de gel	*Gel de concentration*	*Gel de séparation*
Acrylamide	3% (p/v)	7,96% (p/v)
N,N' méthylène bisacrylamide	0,75% (p/v)	0,213% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM	
Tris-HCl pH 8,8		374 mM
APS	0,075% (p/v)	0,075% (p/v)
TEMED	16,6 mM	6,63 mM
H_2O	qsp 10 ml	

Tableau 27. Composition du tampon de révélation de l'activité SOD sur gel d'électrophorèse.

Composants	
KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,8	50 mM
EDTA	1 mM
TEMED	28 mM
Riboflavine	30 mM
NBT	245 µM

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

– Protocole

Les gels sont généralement réalisés à la concentration de 8 % sur plaque de 8,2 x 10,1 cm contenant 4,5 ml de gel. Les compositions des gels de séparation et de concentration sont indiquées dans le tableau 26, respectivement. L'échantillon à déposer est additionné de bleu de bromophénol (1 %) qui permet de visualiser le front de migration, et de glycérol (1/5 du volume) pour augmenter la densité.

L'électrophorèse est réalisée sur le système Miniprotean II de Bio-Rad. L'ampérage est fixé à 25 mA et l'électrophorèse se déroule à 4°C dans le tampon Tris 16,5 mM; Glycine 128 mM

– Révélation de l'activité SOD

La méthode de révélation de l'activité SOD repose sur sa capacité à inhiber la photoréduction du NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971; Fridovich, 1986) (voir paragraphe 2.2.15.1.3).

Aussitôt après électrophorèse, le gel est incubé 30 min à l'obscurité dans le milieu réactionnel présenté dans le tableau 27. L'activité SOD est révélée par l'apparition de bandes achromatiques sur un fond bleu violet (bleu formazan) après quelques minutes d'incubation à la lumière intense.

Les trois isoformes de SOD qui diffèrent par leur cofacteur métallique (Cu/Zn, Mn et Fe) peuvent être détectées par cette méthode. Par contre, l'addition au milieu réactionnel de 5 mM de cyanure de potassium (KCN) inhibe l'activité des Cu/ZnSODs, alors que l'ajout de 5 mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) inhibe l'activité des FeSODs et des Cu/ZnSODs. Seules les MnSODs ne sont pas inhibées par le KCN ou l'H_2O_2. Cette méthode de révélation nous permet donc de distinguer les trois isoformes de SOD.

– Révélation des protéines par le bleu de Coomassie

Après électrophorèse, les gels sont colorés par immersion dans une solution de méthanol 45,5 % (v/v); acide acétique 9 % (v/v); bleu de Coomassie R-250 0,25 % (p/v) pendant 45 min puis décolorés dans une solution de méthanol 5 % (v/v); acide acétique 7,5 % (v/v). Les incubations sont réalisées sous agitation douce à température ambiante.

Tableau 28. Composition des gels de concentration et de séparation pour électrophorèse en conditions dénaturantes.

Pour 10 ml de gel	*Gel de concentration*	*Gel de séparation*
Acrylamide	3% (p/v)	12,45% (p/v)
N,N' méthylène bisacrylamide	0,75% (p/v)	0,332% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM	
Tris-HCl pH 8,8		377 mM
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
APS	0,075% (p/v)	0,075% (p/v)
TEMED	16,6 mM	6,63 mM
H_2O	qsp 10 ml	

2.2.15.2.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes

– *Principe*

L'électrophorèse en condition dénaturante permet de séparer les protéines selon leur taille. En effet, les charges propres des protéines sont neutralisées par le SDS, détergent anionique qui leur confère une charge globalement négative. Les protéines, qui sont dissociées en sous-unités sous l'action conjuguée de la chaleur, du β-mercaptoéthanol et du SDS, migrent alors en fonction de leur taille dans le tamis moléculaire constitué par le gel d'acrylamide.

– *Protocole*

Les gels sont généralement réalisés à la concentration de 12,5 % sur plaque de 8,2 x 10,1 cm contenant 4,5 ml de gel. Les compositions des gels de concentration et de séparation sont données dans le tableau 28, respectivement, en accord avec celles préconisées pour l'analyse des protéines du champignon pathogène *Sphaerostilbe repens* (Hilbert & Botton, 1986) et des champignons ectomycorhiziens (Hilbert & Martin, 1988).

Environ 5 µg de protéines sont additionnés de tampon de Laemmli (1970) composé de Tris-HCl 62,5 mM pH 8,8; SDS 2 %; glycérol 10 %; β-mercaptoéthanol 5 % et bleu de bromophénol 0,003 %. Les échantillons sont ensuite placés pendant 5 min dans l'eau bouillante puis centrifugés avant d'être déposés sur le gel. L'étalonnage du gel est réalisé à l'aide du kit de protéines marqueurs de bas poids moléculaire (Pharmacia; Phosphorylase b, 94,0 kDa; Serum albumine bovine, 67,0 kDa; Ovalbumine, 43,0 kDa; Anhydrase carbonique, 30,0 kDa; Inhibiteur de la trypsine de soja, 20,1 kDa; α-Lactalbumine, 14,4 kDa).

L'électrophorèse est conduite à 18 mA, voltage et puissance étant non limitants dans le tampon Tris 25 mM; glycine 192 mM; SDS 3,5 mM. Les gels sont ensuite révélés par le bleu de Coomassie.

2.2.15.3. Détermination de la masse moléculaire de la protéine native

Les protéines extraites des bactéries OX326A contenant le plasmide pTrcsod induites par l'IPTG ont été utilisés afin de déterminer la masse moléculaire de la MnSOD active.

2.2.15.3.1. Electrophorèse sur gradipore

– *Principe*

La méthode consiste à effectuer une électrophorèse de l'enzyme en gel de polyacrylamide dont la porosité varie suivant un gradient. Les gels dont la concentration en polyacrylamide varie

Tableau 29. Composition des gels de concentration et de séparation pour électrophorèse sur gradipore 4-30%.

Pour un gel	*Gel de concentration*	*Gel de séparation*	
Acrylamide	4% (p/v)	4% (p/v)	30% (p/v)
N,N' méthylène bisacrylamide	0,04% (p/v)	0,04% (p/v)	0,3% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	375 mM	375 mM	375 mM
APS	0,069% (p/v)	0,069%	0,069% (p/v)
TEMED	7,62 mM	7,62 mM	7,62 mM
H_2O	qsp 2 ml	qsp 2 ml	qsp 2 ml

de 4 à 30 % permettent de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, entre 30 et 700 kDa. La migration de la protéine s'arrête lorsque celle-ci atteint la zone de concentration en acrylamide correspondant à sa taille.

– Protocole

Les gels sont généralement réalisés sur plaque de 8,2 x 10,1 cm avec un gradient d'acrylamide de 4 à 30 %. Les compositions des gels de séparation et de concentration sont indiquées dans le tableau 29.

Les gels ont été étalonnés à l'aide du kit de protéines de masse moléculaire élevée (Pharmacia; Thyroglobuline, 669 kDa; Ferritine, 440 kDa; Catalase, 232 kDa; Lactate déshydrogénase, 140 kDa; Sérum albumine bovine, 67 kDa).

Le gel est prééquilibré pendant 20 min à 70 volts dans le tampon d'électrophorèse Tris 90 mM; acide borique 80 mM; EDTA 3 mM. Environ 5 µg de protéines sont déposés sur le gel après addition de bleu de bromophénol (1 %) et de glycérol (1/5 du volume) et l'électrophorèse se déroule pendant 15 à 20 min à 70 volts jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel. Elle se poursuit ensuite pendant 15 à 16 heures à 150 volts (voltage constant).

A la fin de la migration, les protéines sont révélées, soit par le bleu de Coomassie, soit par leur activité enzymatique.

– Expression des résultats

La courbe de calibration est obtenue en portant le logarithme décimal de la masse moléculaire des protéines marqueurs en fonction de leur mobilité électrophorétique (*R*f).

2.2.15.3.2. Filtration moléculaire

– Principe

Au cours d'une séparation sur support chromatographique, deux facteurs influencent le comportement des molécules de l'échantillon: le débit volumétrique de la phase mobile et le mouvement provoquant la diffusion des molécules à l'intérieur et à l'extérieur de la phase stationnaire.

Le principe de la filtration sur gel est basé sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les petites molécules entrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement. Les molécules sont donc éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

– Protocole

La colonne de chromatographie Superose 12 (HR 10/30) (LKB Pharmacia) couplée au système FPLC est équilibrée dans du tampon phosphate 50 mM, pH 8,2; KCl 150 mM.

Le support chromatographique de cette colonne est constitué de particules d'agarose réticulé de 10 µm de diamètre. Les pores représentent 55 % du volume et la gamme de séparation s'étend de 1 à 100 kDa. L'injection de l'échantillon protéique se fait grâce à une boucle d'injection avec un débit de tampon (tampon phosphate 50 mM, pH 8,2; KCl 150 mM) de 0,2 ml/min. La colonne, d'une contenance de 23 ml, a été étalonnée avec le kit de protéines marqueurs (Bio-Rad; Vitamine B-12, 1,35 kDa; Myoglobine, 17 kDa; Ovalbumine, 44 kDa; IgG 150 kDa; Thyroglobine, 669 kDa).

Un échantillon de 200 µg de protéines (dans 200 µl) est déposé sur la colonne puis élué à un débit de 0,2 ml/min en fractions de 0,5 ml.

– Expression des résultats

L'élution des protéines marqueurs suivie par l'enregistrement de l'absorbance à 280 nm permet de déterminer le volume mort (V_o) et le volume total (V_t), respectivement 6,9 et 18,2 ml, de la colonne, ainsi que le volume d'élution (V_e) de chaque protéine marqueur. La courbe de calibration est obtenue en portant le logarithme décimal de la masse moléculaire des protéines marqueurs en fonction du coefficient de partition K_{av} qui est déterminé de la façon suivante:

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

Le volume d'élution de l'enzyme étudiée est déterminé par localisation du pic d'activité dans les fractions d'élution. La masse moléculaire de l'enzyme est alors estimée à partir de l'équation de la courbe de calibration, il existe en effet une relation linéaire entre le coefficient K_{av} et le logarithme décimal de la masse moléculaire des protéines natives.

2.2.15.4. Détermination de la séquence primaire de la protéine

Le séquençage de la partie N-terminale de la *Pi*MnSOD a été rendu possible grâce à la collaboration de Jean-Louis Hilbert et Pierre-Eric Sautière de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

L'extrait protéique insoluble issu des bactéries surexprimant la MnSOD est séparé sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (voir paragraphe 2.2.15.2.2). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF, selon le protocole que nous verrons dans le paragraphe 2.2.16.2. Une fois le transfert réalisé, la protéine à séquencer est colorée au bleu de

Coomassie pour être visualisée, puis découpée à l'aide d'une lame de scapel. La languette de membrane est alors placée dans un Eppendorf contenant une solution de méthanol à 80 % et agitée pendant 3 min au vortex pour éliminer le colorant. La membrane est ensuite directement placée dans la chambre de couplage du séquenceur automatique de peptides et protéines couverte d'un filtre zittex (LF 3000 sequencer, Beckman Instruments). Le séquençage automatique de l'extrémité N-terminale de la protéine est réalisé en phase gazeuse sous atmosphère inerte selon la méthode de dégradation d'Edman. Les acides aminés phénylthiohydantoïnes (PTH-AA) libérés sont séparés et identifiés par chromatographie sur une colonne micro-PTH ODS Sphérogel (2 mm x 150 mm) couplé au système HPLC (Gold analytical microbore system).

2.2.16. Transfert des protéines et détection immunologique

2.2.16.1. Production de l'immunsérum

La synthèse d'anticorps anti-PiSOD a été réalisée chez 2 lapins. En vue des injections, une fraction aliquote de l'extrait protéique insoluble issu des bactéries BL21 (DE3) contenant le plasmide pETsod cultivées en présence d'IPTG est déposée sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et légèrement colorée au bleu de Coomassie. La bande correspondant à la MnSOD surproduite est découpée et envoyée à la Société Eurogentec qui prend en charge l'immunisation des lapins et les quatre prélèvements sanguins.

Le protocole d'immunisation est le suivant:

Jour	0	14	28	38	56	66	80
Injection	1ère	2ème	3ème		4ème		
Saignée	préimmune			Petite		Grosse	Finale

La saignée finale est conservée à -80°C, elle constitue l'immunsérum anti-MnSOD.

2.2.16.2. Empreintes immunoélectrophorétiques

2.2.16.2.1. Principe

Pour déterminer la spécificité de l'immunsérum anti-MnSOD, nous avons réalisé des empreintes immunoélectrophorétiques (ou Western blot), par transfert des protéines sur une membrane d'Immobilon de type polyvinylidène difluoride (PVDF, Millipore), les protéines ayant été préalablement séparées sur gel d'acrylamide.

Après reconnaissance spécifique des protéines par leur anticorps (qui constituent l'immunsérum "primaire"), le complexe antigène-anticorps formé est visualisé par l'utilisation d'un deuxième immunsérum, dit immunsérum "secondaire", dont les immunoglobulines sont

couplées à la phosphatase alcaline. La présence du marqueur sera alors visualisée par révélation de son activité enzymatique.

Une membrane d'immobilon de type PVDF a été utilisée préférentiellement aux membranes de nitrocellulose ou de nylon car elle permet d'établir des liaisons hydrophobes très fortes, avec une grande capacité de fixation des protéines. Elle est également compatible avec la plupart des techniques de coloration des protéines couramment utilisées, ainsi qu'avec la plupart des systèmes de détection immunochimiques.

2.2.16.2.2. Protocole

Après migration, le gel d'acrylamide est incubé en même temps que la membrane d'Immobilon, pendant 10 min dans le tampon d'électrotransfert [48 mM Tris-HCl, pH 8,3; 39 mM glycine; 0,0375 % SDS (p/v); 20 % méthanol (v/v)]. Le transfert est ensuite réalisé sur le système Multiphor II Novablot (Pharmacia), en condition semi-sèche, à raison de 80 mA par gel, pendant 1,5 h.

Après transfert, les sites de fixation libres de la membrane sont bloqués par incubation pendant une nuit, à 4°C, dans le tampon TBST composé de Tris-HCl 10 mM, pH 8; NaCl 150 mM et Tween 20 0,05 % (v/v) contenant 10 % (p/v) de lait en poudre (demi-écrémé). Après mise en contact pendant 4 h à température ambiante avec l'immunsérum "primaire" dilué au 1/2500ème dans le tampon TBST/lait, la membrane est lavée pendant environ 20 min dans 3 bains successifs de tampon TBST/lait, puis 3 fois 5 min dans du tampon TBST de façon à éliminer l'excès d'anticorps, avant d'être incubée pendant 1 h à température ambiante dans ce même tampon TBST contenant alors l'immunsérum "secondaire" (anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin marqués à la phosphatase alcaline), à la dilution de 1/7500. Après cette incubation, la membrane est rincée abondamment dans du tampon TBST puis est équilibrée dans le tampon substrat de la phosphatase alcaline ($NaHCO_3$ 100 mM, pH 9,8; $MgCl_2$ 1 mM). Les complexes antigène-anticorps sont visualisés par incubation de la membrane pendant 10 à 20 min dans le milieu de révélation de l'activité enzymatique phosphatase alcaline, constitué du tampon précédent auquel sont ajoutés 0,03 % NBT (p/v) et 0,015 % BCIP (Bromochloroindolylphosphate). Le BCIP et le NBT, insolubles dans l'eau, sont préalablement solubilisés dans une fraction aliquote de diméthylformamide.

La présence d'un complexe antigène-anticorps couplé à la phosphatase alcaline est mise en évidence par l'utilisation d'un substrat de l'enzyme, le BCIP, en association avec le NBT qui détecte les groupes indoxyles précipités et donne une couleur bleu-violet. La réaction est arrêtée en rinçant la membrane dans de l'eau.

2.2.16.3. Purification de l'immunsérum

Les sérums d'animaux immunisés à l'aide de protéines surproduites chez un hôte bactérien contiennent un certain taux d'anticorps dirigés contre des antigènes bactériens (Gruber & Zingales, 1995). Ceci peut être la cause de bruit de fond, en particulier lors de réactions immunocytochimiques.

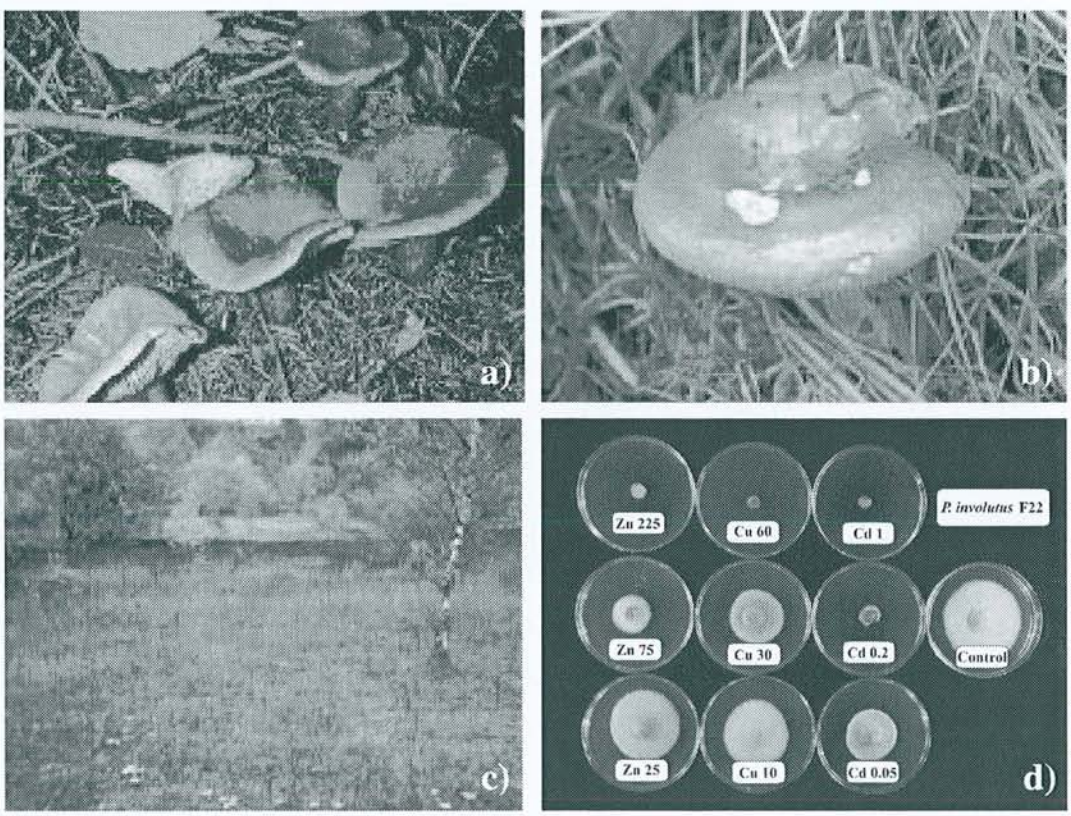
L'immunsérum anti-MnSOD a été purifié grâce à l'antigène fixé sur une membrane d'Immobilon selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989) modifiée. Environ 10 µg de protéines issues de la fraction insoluble des protéines des bactéries exprimant la MnSOD sont déposés sur gel d'acrylamide et soumis à une électrophorèse en condition dénaturante. Après migration, le gel d'acrylamide est transféré sur une membrane d'Immobilon comme décrit dans le paragraphe précédent. La région de la membrane contenant la protéine surexprimée est découpée et incubée pendant 2 h dans 50 ml de tampon TBS (10 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl) contenant 5 % (p/v) de lait en poudre (demi-écrémé), puis pendant environ 20 min dans 2 bains successifs de 50 ml de tampon TBST/lait à 37°C. La bandelette contenant les protéines est ensuite incubée dans 6 ml de ce même tampon TBST/lait contenant l'immunsérum " primaire" dilué au 1/20ème pendant 12 h à 37°C. Après cette incubation, la bandelette est rincée 3 fois 20 min dans 50 ml de tampon TBST/lait puis 5 min dans 50 ml de tampon TBS à 37°C de façon à éliminer l'excès d'anticorps. La bandelette est alors incubée dans 1 ml de Glycine-HCl 0,2 M pH 2,5 pendant 2 min à température ambiante pour éluer les IgG fixées. L'éluat est immédiatement neutralisé par l'addition de 170 µl de Tris-HCl 1 M pH 8,8, contenant 6,9 % BSA (p/v) et conservé à 4°C après l'ajout de 0,05 % NaN_3 (p/v).

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

Chapitre 3

Résultats et discussions

3.1. Etude de la réponse différentielle des champignons ectomycorhiziens aux métaux lourds in vitro



a) Fructification de *Lactarius rufus*.

b) Fructification de *Paxillus involutus*.

c) Site de Villerupt pollué par les métaux lourds. Fructifications de *L. pubescens*.

d) Test de tolérance *in vitro*.

Résumé – La tolérance de 39 isolats de champignons ectomycorhiziens issus de 5 espèces différentes (*Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Suillus bovinus*, *S. luteus* et *S. variegatus*) a été déterminée par la mesure de la réduction de biomasse produite sur milieu gélosé supplémenté avec l'un des 4 métaux suivants, le cadmium, le cuivre, le nickel et le zinc. Les isolats se répartissent de la façon suivante: 21 proviennent de sites pollués par les métaux lourds, les autres (18) ont été récoltés sur des sites non pollués. La tolérance aux métaux est caractérisée par une forte variation interspécifique. Les trois espèces *S. luteus*, *S. variegatus* et *P. tinctorius* sont plus tolérantes au cuivre, cadmium et zinc que *P. involutus*, alors que l'inverse est vrai dès lors que l'on considère la tolérance au nickel. Une forte hétérogénéité intraspécifique de la tolérance aux métaux a également été mise en évidence. Les valeurs d'EC_{50} (valeur effective de la concentration en métal qui inhibe de 50 % la production de biomasse fongique) des isolats provenant des sites pollués ne sont pas statistiquement différentes de celles des isolats provenant de sites non pollués. Les résultats sont discutés en ce qui concerne le bénéfice potentiel de l'association ectomycorhizienne dans la protection de leur partenaire végétal vis-à-vis d'une pollution métallique.

Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*

D. BLAUDEZ[1], C. JACOB[1], K. TURNAU[2], J. V. COLPAERT[3], U. AHONEN-JONNARTH[4], R. FINLAY[4], B. BOTTON[1] and M. CHALOT[1]*

[1] *Laboratory of Forest Biology, UA INRA 977, University Henri Poincaré Nancy I, Faculty of Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre Cedex, France.*
[2] *Institute of Botany, Jagiellonian University Krakow, Lubicz 46, 31-512 Cracow, Poland.*
[3] *Laboratory of Environmental Biology, Limburgs Universitair Centrum, Universitaire Campus, B 3590 Diepenbeek, Belgium.*
[4] *Department of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7026, S-75007 Uppsala, Sweden.*
E-mail: chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Received 2 July 1999; accepted 10 February 2000.

Thirty-nine ectomycorrhizal isolates of *Paxillus involutus, Pisolithus tinctorius, Suillus bovinus, S. luteus* and *S. variegatus* were tested on cadmium, copper, nickel and zinc amended media to determine their *in vitro* tolerance, measured as inhibition of biomass production. Twenty-one isolates were from heavy metal polluted sites, whereas the others were from non-contaminated soils. There was a strong interspecific variation in metal tolerance. *S. luteus, S. variegatus* and *P. tinctorius* were more tolerant of Cu, Cd and Zn when compared with *P. involutus*, whereas the reverse was true for Ni. A high intraspecific heterogeneity in metal tolerance was also found. EC_{50} values for isolates originating from polluted sites were not statistically different from EC_{50} values for isolates originating from non-contaminated sites. The findings are discussed in relation to the potential benefits of ectomycorrhizal fungi in protecting their host plants from metal contamination.

INTRODUCTION

Ectomycorrhizal fungi play an important role in enhancing uptake of mineral nutrients for many plant species (Smith & Read 1997). While enhancement of nutrient uptake is likely to be beneficial, both essential and non-essential elements may be toxic at high concentrations and in some circumstances enhanced uptake could be deleterious for both hosts and symbionts (Brown & Wilkins 1985a). Moreover, accumulation of heavy metals in soils could adversely affect formation and development of ectomycorrhizas of tree species growing in contaminated soils (McCreight & Schroeder 1982).

Some ectomycorrhizal fungi can occupy industrially-degraded habitats which are often contaminated by heavy metals such as lead, zinc, cadmium, copper and nickel. The isolation of metal-tolerant ectomycorrhizal fungi from polluted sites has been well documented (Brown & Wilkins 1985b, Jones & Hutchinson 1986, Colpaert & van Assche 1987). It is uncertain, however, whether the presence of ectomycorrhizal fungi is related to their capacity to evolve metal tolerance when growing on metal-contaminated soils (Colpaert & van Assche 1992a, 1993, Egerton-Warburton & Griffin 1995), or whether they have an innate metal tolerance throughout their different ecotypes (Denny & Wilkins 1987).

Axenic screening provides a rapid evaluation of the metal tolerance in ectomycorrhizal fungi and has demonstrated differential tolerances to metals (McCreight & Schroeder 1982, Jones & Hutchinson 1986, Colpaert & van Assche 1987, 1992b). There is some evidence that significant intra- and interspecific variation exists in the metal sensitivity of ectomycorrhizal fungi (Brown & Wilkins 1985b, Colpaert & van Assche 1987, Jones & Hutchinson 1988, Egerton-Warburton & Griffin 1995, Hartley, Cairney & Meharg 1997a, Hartley *et al.* 1997b). There may, however, be no correlation between metal tolerance of mycorrhizal fungi and the toxicity of the soil of origin (Brown & Wilkins 1985b, Denny & Wilkins 1987, Jones & Hutchinson 1988). Thus, it appears that, in many cases, soil fungi have not developed metal-tolerant ecotypes and any screening programme should test ectomycorrhizal fungi from a range of sites (Jones & Hutchinson 1988). Conversely, tolerance to zinc and cadmium (Colpaert & van Assche 1987, 1992b) or to aluminium (Leski, Rudawska & Kieliszewska-Rokicka 1995, Egerton-Warburton & Griffin 1995) was higher in ectomycorrhizal isolates from metal-contaminated soils compared with those from non-contaminated soils.

Responses of ectomycorrhizal fungi to toxic metals are of importance in view of interest in the reclamation of polluted sites and influence on plant growth and productivity. Although there appears to be a wide diversity in responses between

* Corresponding author.

different plant-fungal combinations, the decrease of metal phytotoxicity by ectomycorrhizal fungi has been widely demonstrated (Brown & Wilkins 1985a, Jones & Hutchinson 1986, Dixon & Buschena 1988, Colpaert & van Assche 1993). It has been suggested that tolerance of the mycobiont may be an important factor in conferring plant tolerance (Colpaert & van Assche 1987), but few studies have addressed the diversity of metal tolerance responses among ectomycorrhizal species. Moreover, the relation between metal tolerance of an ectomycorrhizal isolate and metal concentration at its collection site has never been investigated.

The purpose of this study was to investigate metal tolerance in ectomycorrhizal isolates to ascertain: (1) intra- and inter-specific variation; and (2) the relationship between metal tolerance of a single isolate and the metal concentration at its collection site. Axenic culture was used to assess tolerance to cadmium, copper, nickel and zinc in 39 ectomycorrhizal isolates collected from contaminated and non-contaminated sites in Europe.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates and culture conditions

Sporocarps of ectomycorrhizal fungi were collected from several sites in Europe and thirty-nine isolates were obtained (Table 1). Of the sites, nine are uncontaminated, whereas others are contaminated to various degrees by heavy metals. The following species were used in the experiments: *Paxillus involutus, Pisolithus tinctorius, Suillus bovinus, S. luteus* and *S. variegatus*. Stock cultures were maintained at 23 °C in the dark on solid modified Melin–Norkrans (MMN) medium containing (mg l^{-1}): KH_2PO_4 (500), $(NH_4)_2HPO_4$ (250), $CaCl_2$ (50), NaCl (25), $MgSO_4 . 7(H_2O)$ (150), thiamine hydrochloride (0.1), and $FeCl_3 . 6(H_2O)$ (1). A glucose concentration of 10 g l^{-1} was used and 10 g l^{-1} agar was added.

Tolerance tests

The response of isolates to various concentrations of cadmium, copper, nickel and zinc was assessed by growing pure mycelial cultures on MMN medium, pH 4.3. The screening experiment was usually performed 6 mo after isolation of the fungus, so that it produced a regular growth. pH 4.3 was chosen in order to have a maximal metal availability and to avoid metal precipitation. As the medium may affect metal speciation and solubility (Hartley *et al.* 1997a), MMN medium, which allowed the growth of all strains used in this study, was chosen for consistency. Plugs (8 mm) were cut from the actively growing edge of 10 d-old colonies and placed on solid MMN medium amended with three concentrations of each metal. Although Gadd (1983) reported various problems associated with agar media when studying fungal sensitivity to metals, we found in preliminary experiments that metal toxicity was not reduced when growing fungi on solid MMN compared with liquid cultures. Moreover, it is important to state that mycelial growth in liquid medium is unlikely to reflect mycelial growth in soil, and changes in the differen-

Table 1. Details of sites from which ectomycorrhizal isolates were collected.

Sites: location, details and metal content (mg kg^{-1} dry soil)	Isolates
Polluted sites	
Chrzanow. Poland. Soil originally rich in zinc and copper ores, at close proximity to zinc wastes. Cd: 50; Cu: 44-200; Ni: 0.15; Zn: 9795.	*Paxillus involutus* (P18, P19, P20, P21), *Suillus luteus* (P11,, P41)
Gusum. Sweden. Site of a disused brass mill. Atmospheric deposition of copper and zinc. Cd: 2–5; Cu: 100–2000; Ni: 5–15; Zn: 500–2000.	*P. involutus* (I16, I28), *S. bovinus* (I43, I95), *S. variegatus* (I59)
La Calamine (Kelmis). Belgium. Superficial ore bodies, mining activities since 9th century. Cd: 2; Cu: 20; Zn: 4101.	*P. involutus* (B07),
Maatheide (Lommel). Belgium. Strongly cadmium, copper and zinc contaminated soil. Site of a disused zinc smelter. Cd: 39; Cu: 1300; Zn: 11425.	*P. involutus* (B08, B10, B12, B13)
Villerupt-D. France. Polluted soil. Site of a disused iron smelter. Cd: 2.88; Cu: 117; Ni: 103; Zn: 1648.	*S. luteus* (F10), *P. involutus* (F11)
Plombières. Belgium. Superficial ore bodies, mining activities since 9th century. Disused zinc smelter. Cd: 41; Cu: 738; Zn: 20961.	*P. involutus* (B06)
We1-nowiec (Katowice). Poland. Industrial zinc wastes. Cd: 43; Cu: 882; Ni: 1794; Zn: 800-3333.	*Pisolithus tinctorius* (Pa, Pb)
Non-polluted sites	
Istaby (Lund). Sweden.	*S. bovinus* (86.007)
Arvidsjaur. Sweden.	*S. variegatus* (H43, H44)
Manskogstjarn. Sweden.	*Paxillus involutus* (S02)
Villerupt-E. France. Cd: 0.04; Cu: 2.1; Ni: 74.9; Zn: 249.	*S. luteus* (F02, F05, F07, F09)
Midlothian. Scotland.	*P. involutus* (Sc01)
Montpellier. France.	*P. involutus* (F22)
Paal (Beringen). Belgium. Cd: 0.5; Cu: 18; Zn: 100.	*Paxillus involutus* (B14, B15, B17), *S. luteus* (B01, B03)
Tübingen. Germany.	*Pisolithus tinctorius* (Y7, IK)
Zmiaca (Limanowa). Poland.	*S. variegatus* (P17)

Table 2. Mean growth (mg D.W.) of 39 ectomycorrhizal isolates, at different concentrations (ppm)[a] of cadmium, copper, lead, nickel and zinc. Mycelia were grown on solid MMN medium and harvested during the late exponential growth phase. Results are the mean of at least 5 replicates.

		Cadmium			Copper			Nickel			Zinc		
	Control	0.05	0.2	1	10	30	60	1	10	50	25	75	225
Paxillus involutus													
B06	16.1	0.0***	0.0***	0.0***	23.1*	15.2	13.3	25.7***	0.0***	0.0***	24.5***	2.8***	0.0***
B07	27.0	9.9***	0.0***	0.0***	6.3***	4.1***	0.0***	23.0	13.6**	2.8***	5.5***	0.0***	0.0***
B08	40.4	15.4***	7.2***	0.0***	15.0***	10.2***	9.1***	27.7	25.9*	18.3**	9.9***	6.2***	4.9***
B10	13.0	7.0***	0.0***	0.0***	7.6	3.1*	0.0***	8.5**	0.0***	0.0***	7.7*	0.0***	0.0***
B12	49.4	17.1***	6.5***	0.0***	3.6***	4.4***	7.8***	33.9	33.1*	11.5***	8.4***	4.2***	0.0***
B13	20.1	8.7***	5.2***	0.0***	3.9***	4.1***	3.5***	18.3	14.0	6.6***	7.0***	4.2***	2.5***
B14	29.8	8.6***	0.0***	0.0***	12.0**	0.0***	0.0***	18.6	12.9**	0.0***	20.3	0.0***	0.0***
B15	25.4	13.1***	3.3***	1.5***	12.3**	10.8**	8.9***	27.7	23.8	2.3***	10.6***	7.5***	0.0***
B17	22.5	4.7**	3.8***	0.0***	9.4**	3.0***	0.0***	27.6	12.9	0.0***	14.7	10.6**	0.0***
F11	16.0	10.9**	3.5***	1.8***	14.7	9.7**	9.1**	18.8	11.9	0.5***	nd	nd	nd
F22	42.8	29.0**	12.0***	0.0***	52.5*	36.8	2.6***	43.5	33.7	2.1***	47.7	19.9***	0.0***
I16	24.0	15.1*	2.8***	0.2***	10.4*	8.4**	5.4***	9.9**	2.3***	0.0***	nd	nd	nd
I28	9.9	10.5	4.6**	2.1***	3.5**	0.5***	0.0***	0.7***	3.9***	0.0***	nd	nd	nd
P18	26.0	14.6***	5.7***	0.0***	4.9***	0.9***	1.3***	30.9	22.0	14.0**	9.2***	5.4***	0.9***
P19	28.4	16.0***	5.4***	0.0***	8.7***	7.3***	9.1***	20.3***	8.8***	8.8***	9.2***	6.1***	2.5***
P20	23.7	21.6	6.2***	0.0***	11.6***	11.8***	11.3***	29.1*	21.4	12.9***	10.7***	9.1***	4.9***
P21	21.9	15.4*	5.4***	0.0***	12.8*	8.0***	10.2**	21.7	15.4	0.0***	11.1***	6.6***	2.0***
S02	34.8	0.0***	0.0***	0.0***	23.9	21.2*	19.2*	26.4**	0.0***	0.0***	22.0***	5.8***	0.0***
Sc01	50.2	33.4***	12.8***	4.6***	30.0**	17.5***	8.0***	39.1**	34.2***	15.0***	18.9***	2.5***	0.0***
Pisolithus tinctorius													
Y7	32.5	25.3	23.9	18.5**	25.6	25.7	18.6**	14.1***	2.0***	0.0***	31.0	25.4	35.8
1K	91.9	79.5*	53.0***	21.9***	91.8	80.7	74.9**	75.2**	0.0***	0.0***	96.3	91.2	98.0
Pa	54.5	51.2	44.3	42.6	49.5	38.4	22.0**	56.3	41.8	5.5***	53.8	39.3	45.5
Pb	59.6	74.4	60.1	40.2*	63.5	43.3*	36.0***	72.1	59.0	9.1**	71.1	66.8	60.6
S. bovinus													
86007	39.7	12.9**	2.6***	1.5***	0.0***	0.0***	0.0***	4.0***	0.9***	0.0***	nd	nd	nd
I43	26.0	3.1***	0.1***	0.1***	0.0***	0.0***	0.0***	0.8***	0.3***	0.0***	nd	nd	nd
I95	42.1	8.0***	1.0***	0.9***	0.0***	0.0***	0.0***	1.0***	0.0***	0.0***	nd	nd	nd
S. luteus													
B01	59.6	55.1	46.6	42.1*	53.9	41.5**	19.0***	65.8	3.4***	0.0***	67.4	51.8	31.6***
B03	60.5	66.1	48.0	33.6***	56.6	45.6	17.7***	61.8	4.2***	0.0***	66.7	59.2	34.5***
F02	53.2	47.2	18.5***	10.8***	44.7	36.1*	25.4**	25.4	3.1***	1.7***	nd	nd	nd
F05	50.2	28.1**	8.8***	6.2***	20.8***	13.2***	0.0***	32.1***	0.0***	0.0***	50.4	13.4***	3.8***
F07	56.4	60.6	49.4	42.9	66.2	45.7	41.8	36.0***	0.9***	0.0***	nd	nd	nd
F09	70.3	44.2**	19.4***	12.9***	59.8	48.0	36.7**	39.9	3.7***	2.0***	nd	nd	nd
F10	42.2	27.0**	19.3***	13.1***	32.5	27.9*	23.4**	6.4***	2.0***	1.9***	nd	nd	nd
P11	47.4	58.5*	27.3***	13.4***	49.6	44.8	23.5***	54.7	0.0***	0.0***	47.7	8.5***	0.0***
P41	72.5	38.3***	35.3***	26.3***	20.3***	19.1***	6.5***	4.5***	0.0***	0.0***	46.9***	32.1***	23.1***
S. variegatus													
H43	65.4	31.2**	13.1***	9.3***	18.5**	0.0***	0.0***	36.8*	0.0***	0.0***	nd	nd	nd
H44	44.8	25.6*	9.8***	2.6***	43.1	0.0***	0.0***	44.3	0.4***	0.0***	nd	nd	nd
I59	44.2	20.0**	5.8***	0.5***	39.9	0.0***	0.0***	15.1**	0.0***	0.0***	nd	nd	nd
P17	45.2	46.6	14.0***	6.2***	48.3	16.0**	0.0***	6.4***	0.0***	0.0***	37.6	12.8***	0.0***

[a] Mole equivalent, 1 ppm: Cadmium, 8.89 μM; Copper, 15.7 μM; Nickel, 17.0 μM; Zinc, 15.3 μM.
Significance levels between metal treatment and control: ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$; nd, not determined.

tiation of fungal mycelia in the absence of a solid substrate may affect the sensitivity to metals (Hartley *et al.* 1997a).

Metal solutions were added after autoclaving under sterile conditions by filtration on a 0.45 μm membrane (Millipore, USA) to avoid formation of precipitates. The concentrations used were: Cd^{2+} 0, 0.05, 0.2, 1 ppm as $CdSO_4$; Cu^{2+} 0, 10, 30, 60 ppm as $CuSO_4$; Ni^{2+} 0, 1, 10, 50 ppm as $NiSO_4$; Zn^{2+} 0, 25, 75, 225 ppm as $ZnSO_4$. These metal concentration ranges were those giving growth inhibition for most of the ectomycorrhizal isolates in preliminary experiments. Colonies were harvested in the late exponential phase of growth after 1 min microwave exposure to melt the agar. The mycelium was then blotted dry with 3 changes of Whatman paper until no further liquid was released with moderate application of hand pressure. This procedure allowed us to collect the entire colony without any agar. Colonies were dried to a constant weight at 60 °C and then weighed. There were at least five replicates for each isolate and metal treatment.

Expression of tolerance results

Differences in growth between control and metal treatments were analysed using one-way ANOVA. For each isolate and each metal, growth data were curve-fitted to calculate the EC_{50}, the effective concentration inhibiting growth by 50%. The lower the EC_{50} value is, the greater is the metal toxicity.

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

The metal concentrations in soils were classified as low, medium and high according to Ewers (1991). Low refers to a metal content less than 0.5, 20, 30 and 300 mg kg^{-1} dry soil for Cd, Cu, Ni and Zn, respectively. Medium refers to a metal content of [2–4], [100–200], [50–120] and [1000–4000] mg kg^{-1} dry soil for Cd, Cu, Ni and Zn, respectively. High refers to a metal content of [35–50], [700–2000] and [9000–21000] mg kg^{-1} dry soil for Cd, Cu and Zn, respectively. A one-way ANOVA was performed to test differences between EC_{50} values of isolates originating from these three categories of soils. This latter test was performed with *P. involutus* and *S. luteus*, for which enough isolates were available. Statistical analyses were performed using STATVIEW (version 4.02) for Macintosh.

RESULTS

The biomass production (expressed as mean D.W.) of all isolates grown on various concentrations of Cd, Cu, Ni and Zn is summarized in Table 2.

Cadmium tolerance

Paxillus involutus and *Suillus bovinus* isolates were less tolerant to Cd than those of other species, growth of most of them being completely inhibited at the highest Cd concentration used (Table 2). Moreover, most *Pisolithus tinctorius* and *Suillus luteus* isolates were not affected at 0.05 ppm Cd. There was, however, a high intraspecific variation in Cd tolerance among the isolates of all species. For instance among the *Paxillus involutus* isolates, S02 and B06 were completely inhibited by 0.05 ppm, whereas some had EC_{50} values > to 0.08 ppm Cd. This was more pronounced among the *S. luteus* isolates whose EC_{50} values ranged from 0.04 to > 1 ppm Cd.

Copper tolerance

All *S. bovinus* isolates were very sensitive to Cu, as shown by the absence of any growth even at the lowest concentration (10 ppm Cu). Although *S. variegatus* isolates could normally grow at 10 ppm Cu, there was no growth, except for P17, at higher concentrations. Some isolates had a significantly higher growth at 10 ppm Cu, when compared with the control (Table 2). This was the case in *P. involutus* B06 and F22, with an increased growth of 43 and 22%, respectively. The lack of inhibition at 10 ppm Cu did not, however, imply that those isolates were the most tolerant. For instance, *P. involutus* F22 and *S. variegatus* P17 were not inhibited at the lowest Cu concentration, but had EC_{50} of 40 and 20 ppm respectively, much lower than that of the most tolerant isolates (EC_{50} > 60 ppm). The most tolerant isolates were found in *P. involutus*, *Pisolithus tinctorius* and *S. luteus*. A significant intraspecific variation was also found among species.

Nickel tolerance

The *S. bovinus*, *S. luteus* and *S. variegatus* isolates were strongly inhibited by Ni (Table 2). Most of the isolates did not grow at all at 50 ppm Ni. *S. bovinus* isolates I43 and I95 were the most sensitive isolates, with more than 95% inhibition at the lowest Ni concentration (1 ppm). Growth of most *Paxillus involutus* and *Pisolithus tinctorius* isolates was not affected by 1 ppm Ni, or was even stimulated, for instance by 60 and 23% for *Paxillus involutus* B06 and P20, respectively. Among the nineteen *P. involutus* isolates, only three were completely inhibited by 10 ppm Ni, whereas the others showed little or no inhibition. There was thus a marked variation in Ni tolerance among the *P. involutus*, *Pisolithus tinctorius* and *S. luteus* isolates whereas most of the *S. bovinus* and *S. variegatus* isolates had similar EC_{50} values.

Table 3. Influence of soil origin on metal tolerance of ECM isolates.

Metal concentrations in soils[a]	Mean EC_{50} (ppm) ± S.E.[b]	
	P. involutus	*S. luteus*
Cd		
Low	nd	0.31 ± 0.26 a
Medium	0.040 ± 0.013 a	0.71 ± 0.35 a
High	0.064 ± 0.016 a	0.20 ± 0.09 a
Cu		
Low	13.3 ± 6.8 a	49.7 ± 10.5 a
Medium	22.3 ± 18.6 a	61.7 ± 40.0 a
High	17.6 ± 2.1 a	nd
Ni		
Low	nd	1.92 ± 0.80 a
Medium	nd	0.78 ± 0.37 a
Zn		
Low	38.3 ± 9.6 a	165 ± 73.5 a
Medium	nd	nd
High	17.8 ± 4.7 b	56.4 ± 36.2 a

[a] See Materials and Methods for definition of metal concentration levels.
[b] Means inside a species-metal combination followed by the same letter do not significantly differ at $P = 0.05$; nd, not determined.

Zinc tolerance

The lowest Zn concentration (25 ppm) significantly inhibited growth of most *Paxillus involutus* isolates, whereas isolates of other species (except *S. luteus* P41) were not significantly affected. As already found for Cu or Ni, some isolates (*P. involutus* B06 and *Pisolithus tinctorius* Pb) had a significantly higher growth in the presence of Zn (Table 2). The highest Zn concentration (225 ppm) completely or very strongly inhibited (more than 80% inhibition) all *Paxillus involutus* isolates. *S. luteus* isolates were more or less inhibited at this concentration, showing a large variation of Zn tolerance. *Pisolithus tinctorius* was not inhibited at the highest Zn concentration.

Metal tolerance and soil origin

Table 3 summarizes the mean EC_{50} values for Cd, Cu, Ni and Zn of isolates according to the metal concentration of the soil of origin. Results were analysed by a one-way ANOVA and the test was performed either with *Paxillus involutus* or *S. luteus* isolates, for which there were enough isolates to perform the test. There were no significant differences between EC_{50} values of isolates from different soil categories (low, medium or high metal concentration), whatever the metal and the

fungal species (Table 3), except for a higher tolerance for *P. involutus* isolates originating from non-polluted soils when compared to those from Zn-polluted soils.

DISCUSSION

There was a strong interspecific variation in metal tolerance. *Suillus luteus* and *Pisolithus tinctorius* were more tolerant to Cu, Cd and Zn than *Paxillus involutus*, while the reverse was true for Ni tolerance. Interspecific variations have been demonstrated in a number of studies of axenically cultured ectomycorrhizal fungi. In one study all isolates of *P. involutus* were less tolerant to Zn than any of those of *Amanita muscaria* (Brown & Wilkins 1985b). A similar response was observed for Cu: *P. involutus* and *Laccaria laccata* grew at 2.5 mM Cu, whereas the concentration had to be decreased 10-fold before any growth of *Scleroderma citrinum* occurred (Howe, Evans & Ketteridge 1997). *Laccaria proxima* appeared to be less sensitive to Ni than *Scleroderma flavidum* (Jones & Hutchinson 1988), and *Suillus granulatus* had a Cd-EC_{50} value 1500 times higher than that of *S. variegatus* (Hartley *et al.* 1997b).

Moreover, a high intraspecific heterogeneity in metal tolerance was found. Isolates within one species exhibited different tolerance levels, for all metals tested. For instance, there was a 8- and 60-fold variation among EC_{50} values of the 19 *P. involutus* isolates towards Cd and Cu, respectively. Among the *S. luteus* isolates, there was a 20-fold variation of Cd EC_{50} values and a 5-fold average variation for Cu, Ni and Zn EC_{50} values. These intraspecific variations have been previously obtained by Egerton-Warburton & Griffin (1995) for Al among *Pisolithus tinctorius* isolates and by Brown & Wilkins (1985b) for Zn among *P. involutus* isolates. Some isolates had an increased growth in the presence of low concentrations of Cu, Ni and Zn. This was never observed for Cd, and is certainly due to the features of the Cd^{2+} ion, considered as a non-essential element. Such growth stimulations of ectomycorrhizal isolates by Cu and Ni have already been demonstrated by Jones & Hutchinson (1988) and McCreight & Schroeder (1982).

From the present data, we can state that tolerance to a metal did not imply tolerance to all metals. It seemed, however, that Cu and Zn tolerance ($r^2 = 0.70$, $P < 0.001$) as well as Cd and Zn tolerance ($r^2 = 0.49$, $P < 0.05$) were positively correlated. Possible mechanisms for passive binding, or metabolic detoxification which can lead to metal tolerance in ectomycorrhizal fungi are discussed by several authors (see Jones & Hutchinson 1986, Gadd 1993, Hartley *et al.* 1997a, Leyval, Turnau & Haselwandter 1997). It has been suggested that Cu and Cd tolerance are governed by independent genes in *Mimulus guttatus* (Tilstone, Macnair & Smith 1997), suggesting that tolerance to one metal does not automatically confer tolerance to others in plants.

EC_{50} values for isolates originating from soils with a low degree of metal pollution were not statistically different from EC_{50} values for isolates originating from polluted sites. Although there is much controversy in the literature about this point, our findings are in agreement with those of Jones & Hutchinson (1986) who reported that isolates from the metal contaminated site did not outperform those from the uncontaminated site on Ni or Cu amended media. Brown & Wilkins (1985b) also failed to find metal-tolerant ecotypes of two ectomycorrhizal fungi. Duxbury (1985) reported that there is seldom correlation between metal tolerance of microbes under laboratory conditions and metal concentrations at their site of origin, unless extremely high metal concentrations are used. Copper tolerance of isolates of *P. involutus*, *Scleroderma citrinum* and *L. laccata* was not related to whether they were taken from copper-contaminated or uncontaminated sites (Howe *et al.* 1997). Conversely, it has been indicated that isolates originating from carpophores collected from non-polluted soils were strongly inhibited by metals, whereas most of the strains derived from polluted soils were strongly tolerant to metals (Leski *et al.* 1995, Egerton-Warburton & Griffin 1995). Most of these studies, however, compared isolates from either a polluted or a non-polluted soil whereas the present screening programme concerned a range of sites (Table 1), as recommended by Jones & Hutchinson (1988).

Yamamoto, Tatsuyama & Uchiwa (1985) reported that there were both Cu-resistant and Cu-sensitive fungi on both metal amended or non-amended soils, but that there were larger numbers of Cu-resistant fungi from a Cu-amended soil than from an unamended soil. The edaphic conditions of polluted sites could also influence the distribution of fungal species. Rühling *et al.* (1984) and Rühling & Söderström (1990) found that the total fungal biomass in soil, sporocarp production, and the species composition of mycorrhizal populations are affected by heavy metal soil pollution. It is well known that sporocarp production does not always accurately reflect the species composition of fungal communities present in the soil (Gardes & Bruns 1996).

It has been suggested that tolerant behaviour of the mycobiont may be an important factor in conferring plant tolerance (Colpaert & van Assche 1987). Although there appears to be a wide diversity in responses between different plant-fungal combinations, the amelioration of metal phytotoxicity by ectomycorrhizal fungi has been widely demonstrated (Brown & Wilkins 1985a, Jones & Hutchinson 1986, Colpaert & van Assche 1992a, 1993). The higher metal concentrations which inhibit growth of non-mycorrhizal tree species are, however, generally far lower than those which inhibit growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture, and consequently this axenic screening could in some cases predict which fungi will increase host tolerance.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the Commission of the European Communities (projects FAIR3-CT961377 and IC20-CT970002) is gratefully acknowledged. This work was supported by grants from the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) to D. Blaudez, and from the Région Lorraine to C. Jacob. We thank D. Godbold for helpful discussions, and P. Canet, H. Hallingbäck and M.-M. Kytöviita for technical assistance.

REFERENCES

Brown, M. T. & Wilkins, D. A. (1985a) Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula*. *New Phytologist* **99**: 101–106.

Brown, M. T. & Wilkins, D. A. (1985b) Zinc tolerance of *Amanita* and *Paxillus*. *Transactions of the British Mycological Society* **84**: 367–369.

Colpaert, J. V. & van Assche, J. A. (1987) Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. *Functional Ecology* **1**: 415–421.

Colpaert, J. V. & van Assche, J. A. (1992a) Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant and Soil* **143**: 201–211.

Colpaert, J. V. & van Assche, J. A. (1992b) The effects of cadmium and the cadmium–zinc interaction on the axenic growth of the ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **145**: 237–243.

Colpaert, J. V. & van Assche, J. A. (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* **123**: 325–333.

Denny, H. J. & Wilkins, D. A. (1987) Zinc tolerance in *Betula* spp. I. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. *New Phytologist* **106**: 535–544.

Dixon, R. K. & Buschena, C. A. (1988) Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Plant and Soil* **105**: 265–271.

Duxbury, T. (1985) Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. *Advances in Microbial Ecology* **8**: 185–235.

Egerton-Warburton, L. M. & Griffin, B. J. (1995) Differential responses of *Pisolithus tinctorius* isolates to aluminum *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* **73**: 1229–1233.

Ewers, U. (1991) Standards, guidelines, and legislative regulations concerning metals and their compounds. In *Metals and their Compounds in the Environment: occurrence, analysis and biological relevance* (E. Merian, ed.): 687–711. VCH, Weinheim.

Gadd, G. M. (1983) The use of solid medium to study effects of cadmium, copper and zinc on yeasts and yeast-like fungi: applicability and limitations. *Journal of Applied Bacteriology* **54**: 57–62.

Gadd, G. M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* **124**: 25–60.

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

Hartley, J., Cairney, J. W. G. &. Meharg, A. A. (1997a) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant and Soil* **189**: 303–319.

Hartley, J., Cairney, J. W. G., Sanders, F. E. & Meharg, A. A (1997b) Toxic interactions of metal ions (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} and Sb^{3-}) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **137**: 551–562.

Howe, R., Evans, R. L. & Ketteridge, S. W. (1997) Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **135**: 123–131.

Jones, M. D. & Hutchinson, T. C. (1986) The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytologist* **102**: 429–442.

Jones, M. D. & Hutchinson, T. C. (1988) The effects of nickel and copper on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* **66**: 119–124.

Leski, T., Rudawska, M. & Kieliszewska-Rokicka, B. (1995) Intraspecific aluminium response in *Suillus luteus* (L.) S. F. Gray, an ectomycorrhizal symbiont of Scots pine. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **64**: 97–105.

Leyval, C., Turnau, K. & Haselwandter, K. (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139–153.

McCreight, J. D. & Schroeder, D. B. (1982) Inhibition of growth of nine ectomycorrhizal fungi by cadmium, lead, and nickel *in vitro*. *Environmental and Experimental Botany* **22**: 1–7.

Rühling, A., Bååth, E., Nordgren A. & Söderström, B. (1984) Fungi in metal-contaminated soil near the Gusum Brass Mill, Sweden. *AMBIO* **13**: 34–36.

Rühling, A. & Söderström, B. (1990) Changes in fruitbody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in north Sweden. *Water, Air and Soil Pollution* **49**: 375–387.

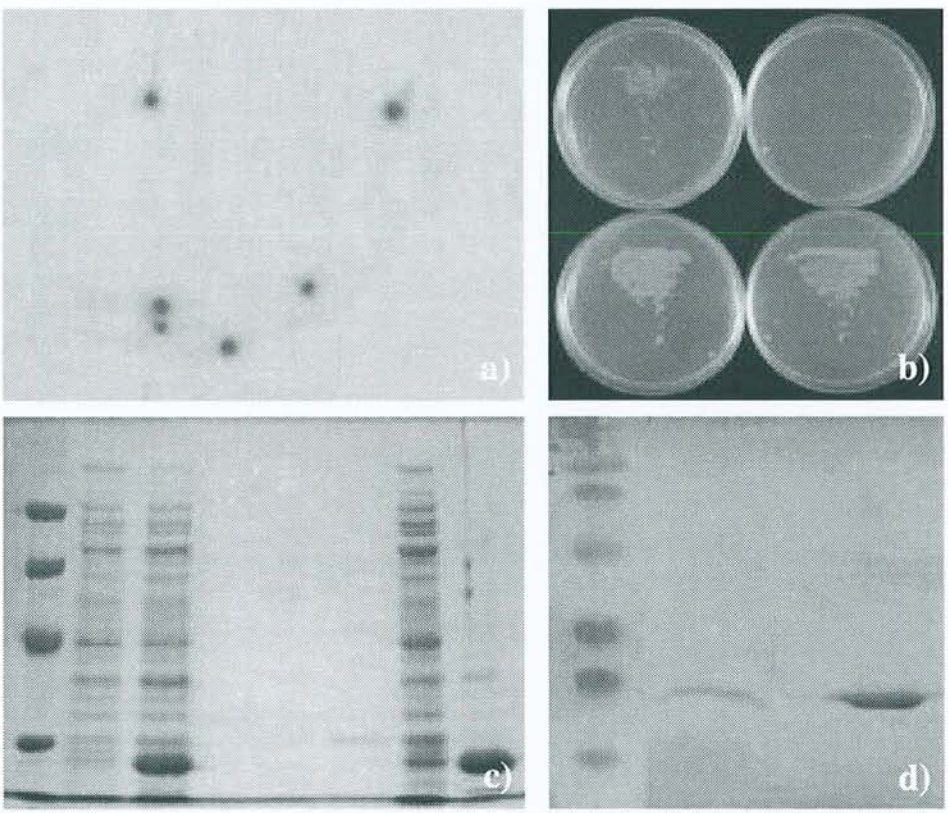
Smith, S. E. & Read, D. J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis* 2nd edn. Academic Press, London

Tilstone, G. H., Macnair, M. R. & Smith S. E. (1997) Does copper tolerance give cadmium tolerance in *Mimulus guttatus*? *Heredity* **79**: 445–452.

Yamamoto, H., Tatsuyama, K. & Uchiwa, T. (1985) Fungal flora of soil polluted with copper. *Soil Biology and Biochemistry* **6**: 785–790.

Corresponding Editor: B. Hock

3.2. Clonage, caractérisation et régulation par le cadmium d'une superoxyde dismutase chez le champignon ectomycorhizien P. involutus



a) Autoradiographie illustrant le criblage de la banque phagique d'ADNc à l'aide d'une sonde marquée, constituée d'un fragment d'ADNc codant une SOD.

b) Complémentation fonctionnelle d'une souche d'*E. coli* déficiente en SOD.

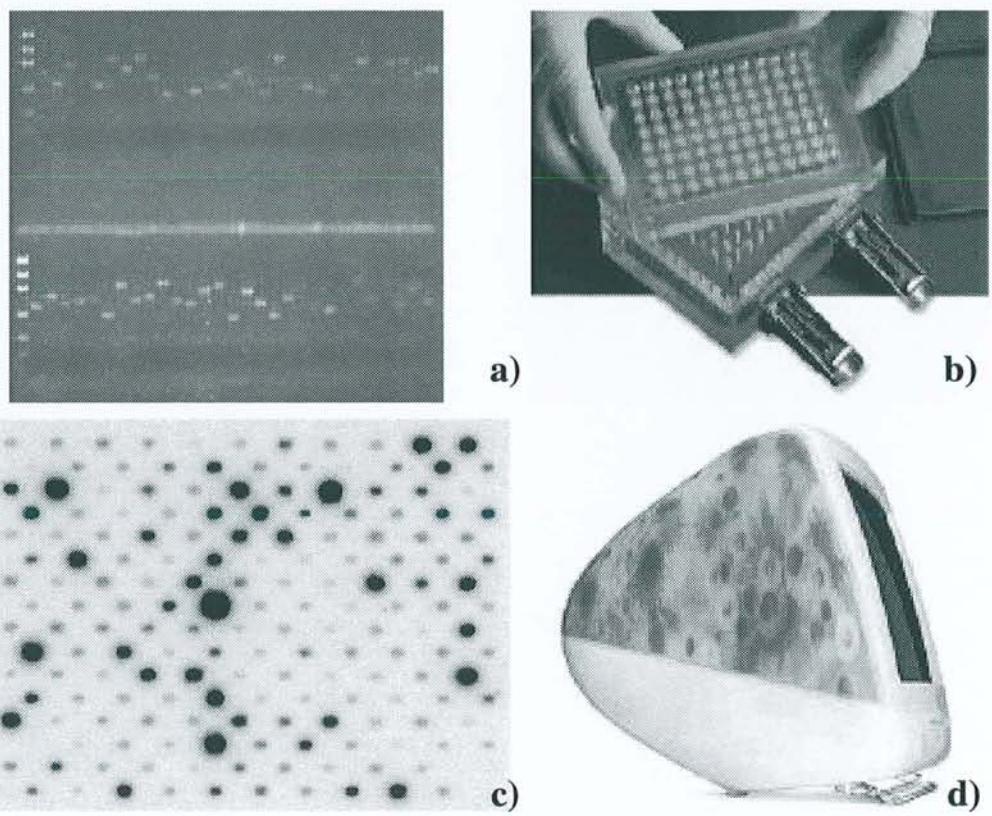
c) Expression hétérologue et purification partielle de l'enzyme PiSOD.

d) Analyse par western-blot de la spécifité des anticorps anti-PiSOD obtenus.

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

Résumé - Le gène codant une superoxyde dismutase a été obtenu par la technique d'hybridation soustractive et suppressive et cloné à partir d'une banque d'ADNc du champignon ectomycorhizien cultivé en présence de cadmium. Cette protéine est vraisemblablement localisée dans les peroxysomes car elle contient un tripeptide d'adressage au peroxysome dans sa partie C-terminale (SKL) et ne contient pas de peptide de transit N-terminal d'adressage aux mitochondries. La complémentation fonctionnelle d'une souche d'*E. coli* déficiente en SOD incapable de pousser en présence de paraquat ou de cadmium montre que l'ADNc cloné (*Pi*sod) code une superoxyde dismutase fonctionnelle. De plus, l'insensibilité de l'activité de la protéine *Pi*SOD vis-à-vis de l'H_2O_2 et du KCN, ainsi que les homologies de séquences avec les autres SOD suggèrent que c'est une superoxyde dismutase manganèse dépendante. Le suivi des taux de transcrits, de polypeptides et de l'activité superoxyde dismutase suite à un stress au cadmium suggèrent que le principal niveau de régulation est post-traductionnel. Cette étude constitue, à notre connaissance, la première investigation dans la caractérisation des événements moléculaires mis en jeu chez un champignon ectomycorhizien lors de la mise en présence de métaux lourds.

3.3. Identification de gènes régulés par le cadmium chez le champignon ectomycorhizien P. involutus *en combinant l'hybridation soustrative par suppression et l'hybridation différentielle de filtres d'ADNc.*



a) Vérification sur gel d'agarose des produits d'amplification des ADNc.

b) Système d'aide au dépôt utilisé pour fabriquer les membranes d'ADNc.

c) Exemple de signaux obtenus après hybridation et numérisation d'une membrane d'ADNc.

d) Utilisation de l'outil informatique pour l'analyse des signaux d'hybridation et les comparaisons de séquences.

Résumé - Les mécanismes moléculaires de la réponse des champignons ectomycorhiziens aux métaux lourds en général, et au cadmium en particulier sont encore mal compris. L'identification de gènes différentiellement exprimés a été entreprise, en vue d'identifier les gènes impliqués dans la réponse au cadmium du champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus*. Dans notre étude, l'hybridation soustractive et suppressive (SSH) combinée à l'hybridation de filtres d'ADNc a été utilisée dans le but de mettre en évidence les gènes dont l'expression est modulée par le cadmium. Les ADNc des mycélia cultivés en absence ou en présence de cadmium dans le milieu de culture ont été soustraits l'un l'autre, et 1291 clones d'ADNc ont été déposés sur membrane de nylon N^+. Afin d'identifier ceux qui répondent au cadmium, deux jeux de 8 membranes ont été hybridées à l'aide de sondes synthétisées à partir des ARN totaux extraits de mycélium cultivé en présence ou en absence de cadmium. Les différences d'intensité des signaux entre les deux hybridations varient entre −10,3 et +5,1. La comparaison des intensités des signaux révèle des différences d'expression d'un facteur ± 2 pour 14% des clones analysés, soit 178 clones. Parmi ces clones, 43 sont sur-exprimés alors que 135 sont sous-exprimés. Parmi les 178 clones, 51 ont été séquencés et 49% d'entre eux ne présentent pas d'homologie avec les séquences présentes dans les banques de données.

Manuscrit en préparation

Identification of cadmium-regulated genes in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by differential screening of cDNA arrays.

Christophe JACOB[1], Annick BRUN[1], Sébastien DUPLESSIS[2],
Francis MARTIN[2], and Michel CHALOT[1]*

[1]*Université Henri Poincaré Nancy I, Faculté des Sciences, UMR INRA-UHP 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, BP 239, 54506 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France.*
[2]*Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches de Nancy, UMR INRA-UHP 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, 54280 Champenoux, France.*

Running title: Cadmium-regulated genes in *Paxillus involutus*.

Correspondence to M. Chalot
Université Henri Poincaré Nancy I,
Faculté des Sciences
UMR INRA-UHP 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes
F-54506 Vandœuvre-Les-Nancy Cedex, France
Tel : +33 3-83 91 27 38
Fax : +33 3-83 91 22 43
E-mail : Michel.Chalot@scbiol.uhp-nancy.fr

Manuscript in preparation

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

ABSTRACT

The molecular mechanisms underlying the response of ectomycorhizal fungi towards heavy metals in general and cadmium in particular remain poorly understood. The identification of differentially expressed genes has been used as a tool to recognize genes that are regulated during cadmium stress in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. In this study we combined suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA array hybridization to identify genes whose expression was modulated by cadmium. cDNAs from cadmium-treated and control mycelia were subtracted from each other and 1291 subtracted clones were arrayed onto nylon membranes. We screened arrayed cDNAs to identify cadmium-responsive genes by using differential hybridization. Differences in signal intensity between control and Cd-treated mycelia hybridizations were distributed between –10.3 and + 5.1. Comparisons of signals from cadmium-treated and control mycelia revealed significant differences in expression levels (differential expression ratio > 2 or < -2) for 14% (178 clones) of the clones analysed. Among them, 43 clones were upregulated whereas 135 were down-regulated. Fifty-one clones were further sequenced and based on the absence of a database match, 49% of them are coding for novel genes.

INTRODUCTION

Cadmium is an abundant, non-essential element that is generating concern due to its accumulation in the environment as a result of industrial practices. Cadmium is a pollutant of the environment resulting from diverse activities with no known biological function (Babich and Stotzky, 1978). Though cadmium is very toxic, the biological effects of this metal and the mechanisms of its toxicity are not yet clearly understood. It has been proposed that Cd^{2+} ions might displace Zn^{2+} and Fe^{2+} in proteins (Stohs and Bagchi, 1995), resulting in their inactivation and in release of free iron, which might generate highly reactive hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) (Halliwell and Gutteridge, 1984). In support of this hypothesis, a major effect of cadmium is the induction of oxidative stress (Brennan and Schiestl, 1996). Intracellular damage associated with cadmium exposure includes protein denaturation, lipid peroxidation and DNA strand breaks. To prevent cadmium-induced intracellular damage, cells respond to metal exposure by inducing the transcription of genes that encode defense and repair proteins. These proteins chelate the metal to prevent further damage (glutathione, phytochelatins, metallothioneins), remove reactive oxygen species, repair membrane and DNA damage.

High concentrations of heavy metals in soils, which are the result of human industrial and agricultural activities, are toxic to bacteria and fungi (Trevors *et al.*, 1986). Interactions of metals with fungi in general (Gadd, 1993) and with mycorrhizal fungi in particular (Galli *et al.*, 1994; Leyval *et al.*, 1997) have been reviewed. Mycorrhizal associations are almost ubiquitous, and the

effects of this symbiosis on plant fitness and health have been largely demonstrated (Smith and Read, 1997). The study of the interaction of mycorrhizal fungi with heavy metals seems also of great interest. Moreover, mycorrhizal fungi provide a unique tool in phytoremediation programs (Leyval *et al.*, 1997). Mycorrhizal fungi can occupy industrially-degraded habitats which are often contaminated by heavy metals such as lead, zinc, cadmium, copper and nickel (Rühling *et al.*, 1984). The isolation of metal tolerant ectomycorrhizal fungi from polluted sites has been well documented (Brown and Wilkins, 1985a; Jones and Hutchinson, 1986; Colpaert and Van Assche, 1987; Blaudez *et al.*, 2000b). A decrease in metal phytotoxicity by ectomycorrhizal fungi has been widely demonstrated and it has been suggested that tolerant behaviour of the mycobiont may be an important factor in conferring plant tolerance (Brown and Wilkins, 1985a, b; Jones and Hutchinson, 1986; Colpaert and Van Assche, 1993; Colpaert and Van Assche, 1987). However, ectomycorrhizas do not universally ameliorate metal toxicity (Godbold *et al.*, 1998; Meharg and Cairney, 2000). Amelioration is dependant upon the species and strain of the ectomycorrhiza and the metal being considered.

Resistance to heavy metals can be achieved either by avoidance (restriction of metal uptake or increased efflux, extracellular formation of complexes) or by tolerance (intracellular chelation of metals, compartmentation in vacuoles) (Leyval *et al.*, 1997). Metal uptake and compartmentation mechanisms in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* were recently examined and it was demonstrated that cadmium is partly retained by cell wall components and partly actively taken up by fungal cells and further distributed between cytosolic and vacuolar compartments (Blaudez *et al.*, 2000a). However, metal stress may also induce other cellular changes such as formation of abnormal proteins (Ochiai, 1987; Jungmann *et al.* 1993), damage to membrane constituents (Prasad, 1995) and overproduction of reactive oxygen species (Gadd, 1993). It is also likely that signalling pathways play a role in response to metal stress, since they are involved in transmission of signals for many biotic and abiotic stress (Jonak *et al.*, 1996; Hirt, 1997). Moreover, an altered growth of mycorrhizal species was found when metals were added to the culture medium (Hartley *et al.*,1997).

Changes in gene expression are important determinants of normal cellular physiology but also for the adaptation of organisms to environmental stress. In this context, the identification, cloning, and characterization of differentially expressed genes should provide information about the molecular determinants of heavy metal tolerance processes. Because of the wide spectrum of genes and signals involved, we have used a combination of suppression subtractive hybridization (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996) and cDNA array analysis to identify differentially expressed genes.

This paper present a differential expression analysis of 1291 cDNA obtained by SSH from the ectomycorrhizal basidiomycete *P. involutus* cultivated in the presence or not of 0.05 mg/l Cd in the culture medium. mRNA levels for 178 clones (14%) were regulated by a factor at least ± 2,. Fifty-one of them were sequenced and further compared with databases for homologies.

MATERIALS AND METHODS

Culture conditions and cadmium application.

The ectomycorrhizal fungus used was an isolate of *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. (ATCC 200175) which was originally isolated from a fruitbody associated with 15-30-year-old *Betula pendula* trees growing on coal waste in Midlothian, Scotland. It was grown on cellophane covered agar medium containing modified Melin-Norkrans medium (MMN) (Blaudez *et al.*, 2000b). The MMN medium contained (mg/l): KH_2PO_4, 500; $(NH_4)_2HPO_4$, 250; $CaCl_2$, 50; NaCl, 25; $MgSO_47(H_2O)$, 15; thiamine hydrochloride, 0.1; and $FeCl_36(H_2O)$, 1. A glucose concentration of 10 g/l was used. Ten-day-old colonies were transferred for 12 h to a liquid modified MMN medium (pH 4.3) supplemented or not with $CdSO_4$. Metal solution was added at a concentration of 0.05 mg/l of Cd^{2+} under sterile conditions by filtration on a 0.2 μm membrane (Millipore Co, Bedford, MA) to avoid formation of precipitates. Previous experiments have shown that this Cd concentration was a sub-lethal dose for *P. involutus* (Blaudez *et al.*, 2000b).

RNA isolation.

At the end of the growing period, Cd-stressed and control fungal colonies were washed with deionized water and fixed in liquid nitrogen. Total RNA isolation was performed with the RNeasy Plant Total RNA kit (Qiagen S.A., France) from approximately 100 mg of frozen mycelium. According to the manufacturer's recommendations, a buffer containing guanidine hydrochloride was used instead of a buffer containing guanidine isothiocyanate to avoid solidification of samples due to secondary metabolites in mycelia of filamentous fungi. This procedure led to the obtention of an average 800 ng total RNA per mg frozen material. RNA from control and Cd-stressed mycelia were stored in DEPC-treated water at -70°C until further use.

Suppression subtractive hybridization.

The starting material consisted of two double-stranded cDNA populations synthetized from total RNAs of Cd-stressed and control (unstressed) fungi using the Smart™ PCR cDNA Synthesis kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA). Suppression subtractive hybridization (SSH) was performed with the Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction kit (Clontech) as described by the manufacturer. A population enriched for differentially-expressed cDNAs under Cd stress (Treatment I) was obtained after the SSH procedure when the Cd-stressed and control cDNA populations were considered as tester and driver, respectively. Conversely, a population enriched for differentially-expressed cDNAs under unstressed growth conditions (Treatment II) was obtained. PCR products from SSH were directly ligated into plasmid vector pGEM-T (Promega, Madison, WI) and transferred into DH5αF' competent cells. Bacterial clones were stored at

–70°C in 35% glycerol.

Production of cDNA arrays and hybridization conditions.

cDNA inserts of bacterial clones were amplified by PCR with the primers SP6 and T7 using the following parameters: 92°C for 2 min; 35 cycles at (92°C for 1 min; 56°C for 45 sec; 72°C for 2 min); and a final extension at 72°C for 10 min, in 50 µl reaction volumes. PCR products (20-30 ng) were diluted in 20 µl 10X SSC, denatured with NaOH (0.2 N final concentration), and then spotted onto positive nylon membranes (8 x 12 cm) (Appligene-Oncor, Illkirch, France) using a Schleicher & Schuell 96-well spot-blot apparatus. A total of 192 cDNA were arrayed on each filter. cDNAs spotted on the two sets of eight arrayed filters were then fixed by UV irradiation for 2.5 min. Control clones were spotted on each filter: amplified pBluescript and pGEM-T polylinker to assess unspecific hybridization; a cDNA encoding human desmin (provided by T. Desprez, INRA-Versailles, France) as internal quantification standard and eight previously cloned and identified cDNAs.

Complex probes were prepared by reverse transcription using total RNA from control and cadmium-incubated mycelia and SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and the SMART PCR cDNA Synthesis kit (Clontech). Labelling of cDNA probes was done using the random priming procedure (Feinberg and Vogelstein, 1983; Feinberg and Vogelstein, 1984) using the NonaPrimer™ kit (Appligene-Oncor) with 50 µCi [α-^{32}P]dCTP and 50 µCi [α-^{32}P]dATP as labelled nucleotides. The two sets of eight arrayed filters were then prehybridized for 3 h at 65°C in a buffer consisting of (5X SSC, 5X Denhardt, 0.5% SDS and 100 μg/ml of denaturated sonicated salmon sperm DNA) on the basis of 3 ml per 10 cm^2 of membrane. Prehybridized filters were then hybridized with the denatured labelled probe in the buffer described above containing 0.1 μg/ml polyA and polyT and 15 ng/ml pGEM-T polylinker on the basis of 2 ml of buffer per 10 cm^2 of membrane, for 20 h at 65°C. Hybridized filters were subjected successively to three washes in large volumes of 2X SSC/0.5% SDS at room temperature for 20 min, two washes in 2X SSC/0.1% SDS at 65°C for 40 min, two washes in 1X SSC/0.1% SDS at 65°C for 40 min and two washes in 0.1X SSC/0.1% SDS at 65°C for 40 min. The membranes were then dried, wrapped in plastic bags and exposed to a phosphor screen for varying period (1 h to 65 h), after which the imaging plate was scanned by Personal Molecular Imager FX (Bio–Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at a maximum resolution of 100 μm per pixel and stored.

Data analysis.

Detection and quantification of the signals of hybridized cDNA were performed as described in Voiblet *et al.* (2001). The intensity values of each of the spots were then exported as a data table to the Excel 98 program (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Local background value for each membrane was calculated on the basis of eighteen positions with no DNA-spotted

area. Net signal was determined by subtraction of this mean background from the intensity for each spot. The probe-to-probe variance was filtered out using signal intensities of the human desmin spotted on the filters and added to the complex probes prior to labelling procedure (0.5 ng per probe) as internal standard. In addition, to take into account of experimental variations in specific activity of the cDNA probe preparations or exposure time that might alter the signal intensity, the data obtained were centered, normalized according to Eisen *et al.* (1998).

Sequencing and cDNA sequence analysis.

Cadmium-reponsive clones, according to array hybridization, were sequenced. The cDNA inserts were amplified under the PCR conditions described above and purified with MultiScreen-PCR plates (Millipore Co, Bedford, MA). Sequencing reactions were performed with universal primers (T3 or SP6) and the Prism™ Ready Reaction AmpliTaq (R)FS kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Data collection was done with an ABI 310 Genetic Analyser. Homology searches in databases were performed by using BLAST program (Altschul *et al.*, 1990) of the National Center for Biotechnology Information and BEAUTY post-processing program provided by the Baylor College of Medicine (Worley *et al.*, 1998; Worley *et al.*, 1995).

Sequence accession number.

To be done.

RESULTS

cDNA from control and cadmium-incubated mycelia were used in suppression subtractive hybridization (SSH). Mycelia were grown on control- or cadmium-containing medium for 12 hrs. The two treatments (I and II) obtained after SSH should contain sequences enriched for cadmium-responsive, either up- or down-regulated, genes. These two subtracted cDNA populations were cloned and the resulting cDNA library was plated and 1325 colonies were picked, of which 1291 (97%) contained an insert.

To investigate changes in gene-expression profile, cDNA clones containing an insert were subsequently arrayed onto N^+-nylon membranes in duplicate. Two sets of eight filters were prepared and cDNA macro-arrays were assembled with 1291 clones from the subtracted library. The arrayed cDNAs included several controls for signal corrections and the normalized values were obtained according to Eisen *et al.* (1998). Of two sets of eight filters: one was hybridized with control mycelia, and the second with Cd-incubated mycelia-derived ^{32}P-labelled cDNAs synthesized from total RNA of the two mycelia. The changes in spot intensity between the two sets of filters were quantified by phosphorimaging and image analysis (see "Materials and Methods"). After 12 hrs of Cd incubation a change in the global pattern of expression of clones from the subtracted library was observed (Figure 1). Differences in signal intensity between

control and Cd-treated mycelia hybridizations were distributed between –10.3 and + 5.1. In the further study we chose to take into account only genes that were regulated by a factor ± 2. Based on this criterion, mRNA levels for 178 clones (14%) were regulated by a factor ± 2. Despite the sublethal concentration of cadmium used, the expression level of 86% of clones was non- or weakly altered during the 12 hrs of cadmium incubation. A total of 51 clones corresponding to cadmium-responsive genes, according to array hybridization, were sequenced. Database search results using WU-BLASTX search at the Baylor College of Medicine Web server (Worley *et al.*, 1998) were indicated in Table 1.

The transcript showing the highest up-regulation (5.1-fold increase) coded for a 40S ribosomal protein S0. The highest down-regulation detected (-10.3-fold) was for an hypothetical protein. Within sequenced clones with a up-regulated expression (16 clones), 6 (about one-third) have no apparent homology to any gene whose function is known and one shared homology with an hypothetical protein. Within the known genes (9 clones), 5 showed homology with ribosomal proteins. The arginine N-methyltransferase also showed an increased expression (4.9-fold) in the cadmium-treated mycelium. An increase (2.6-fold) was observed for the transcripts coding for the nuclear transport factor 2, suggesting an increased in protein import into the nucleus of cadmium-treated mycelium. The increase (2.3-fold), observed for the transcripts coding for the translocation protein sec62, indicated that translocation components for endoplasmic proteins might be transcriptionally activated during cadmium stress.

Within the genes with a down-regulated expression (35 sequenced clones), 19 (more than 50%) have no apparent homology to any gene whose function is known and two shared homology with hypothetical proteins. Within the known genes (14 clones), 3 showed homology with ribosomal proteins. Interestingly, transcripts coding for polyphenol oxydase and metallothionein were down-regulated, suggesting that these two mechanisms are not involved in cadmium-detoxification in *Paxillus involutus*. In opposite to a previous study (Lemaire *et al.*, 1999) showing that cadmium activates the thioredoxin messager accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*, a thioredoxin exhibited inhibition (-2.2-fold) in cadmium-treated mycelium. The MAP protein kinase also showed a reduced expression (-3.0-fold) in the cadmium-treated mycelium.

DISCUSSION

To gain insight into the biological effects of cadmium and to identify global gene activities involved in cadmium response, we have analysed the relative abondance of transcripts corresponding to sets of clones in the control and cadmium-treated mycelium. A previous study indicated that the cadmium concentration used (0.05 mg/l) was sublethal for *P. involutus* (Blaudez *et al.*, 2000b). When exposed to a 0.05 µM Cd concentration, *P. involutus* was able to take up and accumulate Cd in cytoplasm and vacuole (Blaudez *et al.*, 2000a). In this study, a

combination of SSH and cDNA library array hybridization was used to identify genes differentially expressed in the ectomycorrhizal fungus *P. involutus* as a result of cadmium treatment. The array data reflect the relative abundance of the transcripts, which is influenced by both transcriptional activity and mRNA stability. It does not detect any regulation at the translational and post-translational levels. The number of genes whose expression was down-regulated by cadmium was higher than the number of cadmium stimulated genes. This approach resulted in a number of clones composed of both known cDNAs and novel cDNAs. Although SSH has greatly improved the efficiency of subtraction analysis, there are still a high percentage of false positive clones. Yang *et al.* (1999) used a combination of SSH and cDNA microarrays to compare patterns of gene expression between two breast cancer cell lines. The data revealed that 23% of 332 cDNA clones were considered differentially expressed with a differential ratio of three. The use of SSH and differential screening to identify defense-related rice genes led to 18% of clones (140 among 768) showing stronger hybridization with one of the two probes (Xiong *et al.*, 2001). However, the use of SSH to isolate genes over-expressed in ER-positive MCF7 cells compared with ER-negative MDA-MB-231 cells, led to the obtention of 70% of cloned inserts representing differentially expressed genes (Kuang *et al.*, 1998). In this study, about 14% (178 among 1291) of the arrayed clones were regulated by a factor ± 2 during cadmium stress, 135 were down-regulated whereas 43 were upregulated.

The highest increased expression detected was for the ribosomal protein S0. Although ribosomal proteins are proportionally required for the assembly of ribosomes, large differences were observed in the induction (and repression) of the ribosomal proteins. Each ribosome contains some 50 distinct proteins that must be made exactly at the same rate (Nomura *et al.*, 1984). It is known that the primary control of ribosomal protein synthesis is on translational of the mRNA, not on its synthesis (Nomura *et al.*, 1984). Thus the level of translational regulation is quite dramatic.

A number of genes, the expression of whose was described as being cadmium-induced in other studies, were down-regulated upon cadmium exposure of *P. involutus* mycelium. The expression of the *P. involutus* polyphenol oxidase was reduced 2.2-fold. This enzyme is implied in extracellular melanin synthesis (Gadd, 1993). Fungal melanins possess many potential metal-binding sites, eg. phenolic units, carbohydrates, aliphatic hydrocarbons (Gadd, 1993). The order of binding ability of fungal melanins followed the sequence Cu>Ca>Mg>Zn (Zunino and Martin, 1977). Non-pigmented *Cladosporium cladosporoides* are capable of removing around 8.8 $mM.kg^{-1}$ Cd^{2+} from solution after 2 days growth, whereas early melanized *C. cladosporoides* is capable of removing approximately 21.5 $mM.kg^{-1}$ Cd^{2+} (Fogarty and Tobin, 1996). The presence of melanin in pigmented cell walls is unmistakably responsible for the higher levels of biosorption in comparison with albino cells (Fogarty and Tobin, 1996). Although in *P. involutus* binding of Cd onto cell walls may be regarded as an essential metal-detoxification mechanism (Blaudez *et al.*, 2000a), it could be due to other compounds than

melanins or the constitutive level of melanins is large enough to trap Cd^{2+}. According to the latter, cDNA macro-arrays and Northern-blot (data not shown) analyses revealed a high expression of the melanin gene whatever the presence or the absence of cadmium in the culture medium.

The expression of the *P. involutus* metallothionein is reduced 2.4-fold. Metallothioneins (MTs) are small, cysteine-rich polypeptides that can bind essential metals, e.g. Cu and Zn, as well as nonessential metals such as Cd. A Cd-resistant strain of *S. cerevisiae* synthesized a cytoplasmic Cd-binding protein when grown in Cd-containing medium (Gadd, 1993). This protein exhibits the characteristics of a metallothionein and its production is controlled by the amplification of the *CUP1* gene and by a transcriptional regulation (Tohoyama *et al.*, 1995). However in the yeast *Candida glabrata*, metallothioneins and phytochelatins are produced in response to copper and cadmium, respectively (Mehra *et al.*, 1988). Kneer *et al.* (1992) reported that the unrelated fungi *S. cerevisiae* and *Neurospora crassa*, already known to synthesize MTs (Butt and Ecker, 1987; Mehra and Winge, 1991) also produce phytochelatins when exposed to cadmium. In agreement with these reports and the down-regulation of the metallothionein gene expression, metallothioneins are probably not the only metal-binding proteins implied in cadmium detoxification in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*.

The expression of the *P. involutus* thioredoxin was reduced 2.2-fold. In general, thioredoxin is strongly overproduced in stress conditions, as observed in oxidative stress in yeast (Kuge and Jones, 1994). Moreover, the toxicity of cadmium in *S. cerevisiae* is caused by oxidative stress (Brennan and Schiestl, 1996). It is also non surprisingly that proteome analysis of the cadmium response in the yeast *S. cerevisiae* reveals thioredoxin as essential for cellular defense against cadmium (Vido *et al.*, 2001). It has been shown that a strong accumulation of both messengers of thioredoxin *h* and *m* was induced by heavy metals, and cadmium in particular, in *Chlamydomonas reinhardtii* (Lemaire *et al.*, 1999). In *P. involutus*, *Pisod* gene encoding a manganese-dependent superoxide dismutase is not transcriptionally regulated, but cadmium stimulated the activity of the corresponding protein PiSOD (Jacob *et al.*, 2001). These results seems to indicate that cadmium induce an oxidative stress in *P. involutus*. Moreover, this increase in PiSOD activity and not in transcript level could be a more general response of the fungus to overcome Cd deleterious effects. Such a mechanism could explain the high proportion of genes the expression of whose was not affected during cadmium incubation.

The present work also underlined the effectiveness of the combination of SSH and cDNA macroarrays to detect genes differentially expressed. It will help considerably in the elucidation of the events that are taking place during exposure to heavy metals, and analysis of the regulation of these genes will help to identify the controlling factors. Further studies are now needed to delineate the functions of both known and novel genes that are differentially expressed during heavy metal exposure. The isolation of genes and proteins involved in the response to cadmium-induced stress open new perspectives in the understanding of molecular mechanisms that

promote tolerance in mycorrhizal fungi, which are key organisms in remediation programmes (Jasper, 1994).

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial supports from the European Commission (project FAIR3-CT961377) and from the Région Lorraine are gratefully acknowledged. We would like to thank Catherine Voiblet for valuable discussions at the beginning of this work. Many thanks to Christine Delaruelle and Annegret Köhler for their helpfull assistance in sequencing.

REFERENCES

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-10.

Babich, H., and G. Stotzky. 1978. Effects of cadmium on the biota: influence of environmental factors. Advances in Applied Microbiology 23: 55-117.

Blaudez, D., B. Botton, and M. Chalot. 2000a. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology 146: 1109-1117.

Blaudez, D., C. Jacob, K. Turnau, J. Colpaert, U. Ahonen-Jonnarth, R. Finlay, B. Botton, and M. Chalot. 2000b. Differential responses of ectomycorrhizal fungal isolates to heavy metals *in vitro*. Mycological Research 104: 1366-1371.

Brennan R.J., and R.H. Schiestl. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. Mutation Research 356: 171-178.

Brown, M.T., and D.A. Wilkins. 1985a. Zinc tolerance of *Amanita* and *Paxillus*. Transactions of the British mycological Society 84: 367-369.

Brown, M.T., and D.A. Wilkins. 1985b. Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula.* New Phytolologist 99: 101-106.

Butt, T.R., and D.J. Ecker. 1987. Yeast metallothionein and applications in biotechnology. Microbiology Review 51: 351-364.

Colpaert, J.V., and J.A. Van Assche. 1987. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. Functional Ecology 1: 415-421.

Colpaert, J.V., and J.A. Van Assche. 1993. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. New Phytologist 123: 325-333.

Diatchenko, L., Y.-F.C. Lau, A.P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. lukyanov, N. Gurskaya, E.D. Sverdlov, and P.D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 6025-6030.

Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown, and D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 14863-14868.

Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochemistry 132: 6-13.

Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1984. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. Analytical Biochemistry 137: 266-267.

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

Fogarty, R.V., and J.M. Tobin. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. Enzyme and Microbial Technology 19: 311-317.

Gadd, G.M. 1993. Tansley review N° 47: Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist 124: 25-60.

Galli, U., H. Schuepp, and C. Brunold. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. Physiologia Plantarum 92: 364-368.

Godbold, D.L., G. Jentschke, S. Winter, and P. Marschner. 1998. Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. Chemosphere 36: 757-762.

Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge. 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press: Oxford.

Hartley, J., J.W.G. Cairney, F.E. Sanders, and A.A. Meharg. 1997. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment ? Plant and Soil 189: 303-319.

Hirt H. 1997. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. Trends in Plant Science 2: 11-15.

Jacob, C., M. Courbot, A. Brun, H.M. Steinman, J.-P. Jacquot, B. Botton, and M. Chalot. 2001. Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. European Journal of Biochemistry 268: 3223-3232.

Jasper, D.A. 1994. Management of mycorrhizas in revegetation. In *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry* (Robson, A.D., Abbott, L.K. and Malajczuk, N., eds), pp. 211-219. Kluwer Academic Publishers, Norwell MA.

Jonak, C., S. Kiegerl, W. Ligterink, P.J. Barker, N.S. Huskisson, and H. Hirt. 1996. Stress signalling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 11274-11279.

Jones, M.D., and T.C. Hutchinson. 1986. The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. New Phytologist 102: 429-442.

Jungmann, J., H.A. Reins, C. Schobert, and S. Jentsch. 1993. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. Nature 361: 369-371.

Kneer, R., T.M. Kutchan, A. Hochberger, and M.H. Zenk. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. Archives in Microbiology 157: 305-310.

Kuang, W.W, D.A. Thompson, R.V. Hoch, and R.J. Weigel. 1998. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. Nucleic Acids Research 26: 1116-1123.

Kuge S., and N. Jones. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. EMBO Journal 13: 655-664.

Lemaire S., E. Keryer, M. Stein, I. Schepens, E. Issakidis-Bourget, C. Gérard-Hirne, M. Miginiac-Maslow, and J.-P. Jacquot. 1999. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology 120: 773-778.

Leyval, C., K. Turnau, and K. Haselwandter. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7: 139-153.

Meharg, A.A., and J.W.G. Cairney .2000. Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. Advances in Ecological Research 30: 69-112.

Mehra, R.K., and D.R. Winge. 1991. Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. Journal of Cell Biochemistry 45: 30-40.

Mehra, R.K., E.B. Tabet, W.R. Gray, and D.R. Winge. 1988. Metal-specific synthesis of two metallothioneins and γ-glutamyl peptides in Candida glabrata. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85: 8815-8819.

Nomura, M., R. Gourse, and G. Baughman. 1984. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. Annual Review of Biochemistry 53: 75-117.

Ochiai, E.I. 1987. General principles of biochemistry of the elements. Plenum press, New York, N.Y.

Prasad, M.N.V. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. Environmental and Experimental Botany 35: 525-545.

Rühling, A., E. Baath, A. Nordgren, and B. Söderström. 1984. Fungi in metal-contaminated soil near the Gusum Brass Mill, Sweden. AMBIO 13: 34-36.

Smith, S.E., and D.J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd ed. Academic Press Limited, London.

Stohs, S.J., and D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Biology and Medicine, **18**, 321-336.

Tohoyama, H. M. Inouhe, M. Joho, and T. Murayama. 1995. Production of metallothionein in copper- and cadmium-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Industrial Microbiology 14: 126-131.

Trevors, J.T., G.W. Stratton, and G.M. Gadd. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Canadian Journal of Microbiology 32: 447-464.

Vido K., D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M.B. Toledano, and J. Labarre. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 276: 8469-8474.

Voiblet, C., S. Duplessis, N. Encelot, and F. Martin. 2001. Identification of symbiosis-regulated genes in Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. Plant Journal 25: 181-191.

Worley, K.C., P. Culpepper, B.A. Wiese, and R.F. Smith. 1998. BEAUTY-X: enhanced BLAST searches for DNA queries. Bioinformatics. 14: 890-891.

Worley, K.C., B.A. Wiese, and R.F. Smith. 1995. BEAUTY: an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. Genome Research 5: 173-184.

Xiong, L., M-W Lee, M. Qi, and Y. Yang. 2001. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 685-692.

Yang, G.P., D.T. Ross, W.W. Kuang, P.O. Brown, and R.J. Weigel. 1999. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. Nucleic Acids Research 27: 1517-1523.

Zunino, H., and J.-P. Martin. 1977. Metal binding by organic macromolecules in soil. I. Hypothesis interpreting the role of soil organic matter in the translocation of metal ions from rocks to biological systems. Soil Sciences 123: 65-76.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Expression profiling of 1291 clones of the subtracted cDNA library between Cd-treated *Paxillus involutus* mycelium and control mycelium. For each clone, transcript level (in arbitrary units) were calculated for the Cd-treated mycelium (y-axis) and the control mycelium (x-axis) and displayed on a scatter plot. If the clones were not affected by cadmium treatment, their transcript level will fall on the 45° line. Solid lines indicate 2-fold expression differences between the two culture conditions; dotted lines, 5-fold expression differences.

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

TABLE 1. Differential gene expression in cadmium-treated versus non-treated mycelium. Fifty-one genes with the highest and lowest cadmium-/non-treated mycelia expression ratio are listed.

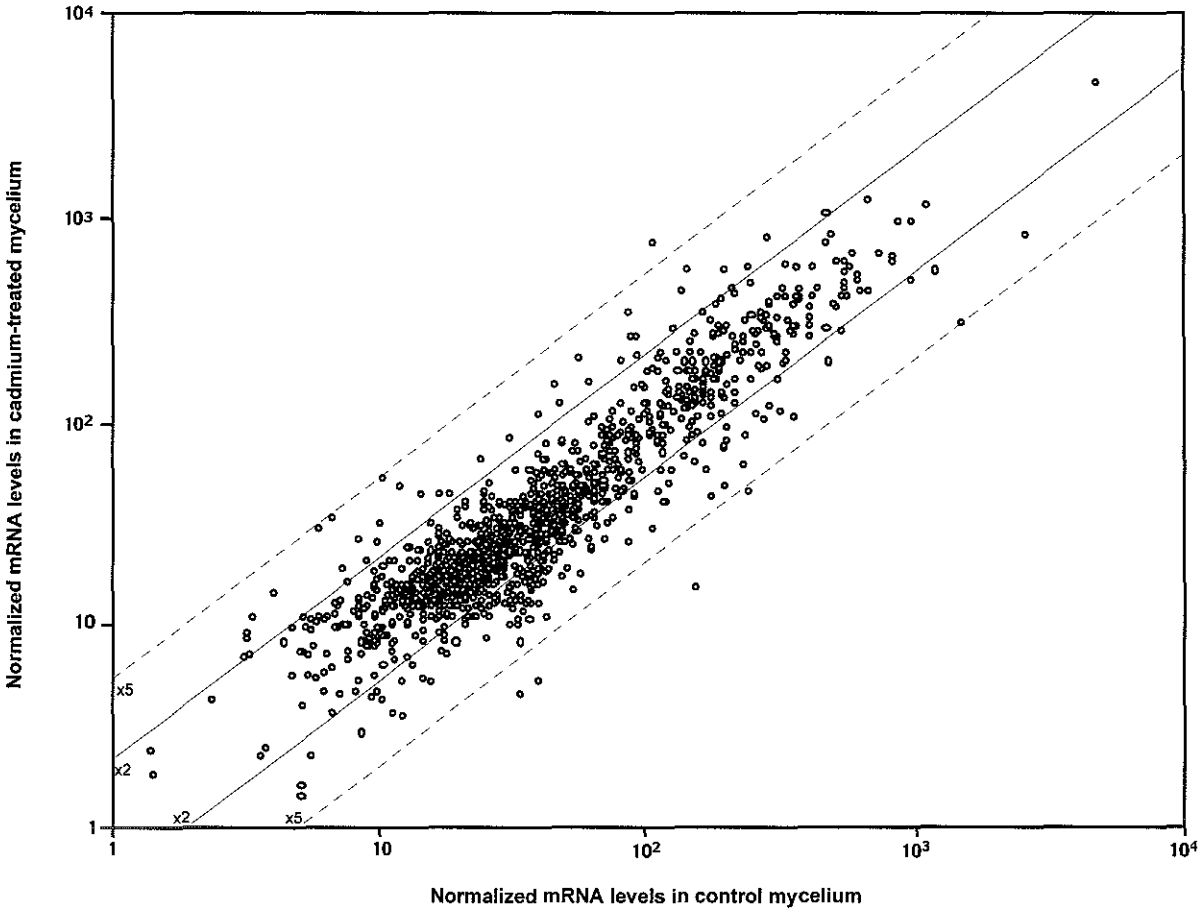
Clone	Accession #	Highest homology (organism)[a]	P value	Ratio Cd/N[b]
Cd23c4		40S ribosomal protein S0 (Schizosaccharomyces pombe)	$7\ e^{-5}$	5.1
Cd12d2		Arg N-methyltransferase (S. pombe)	$2\ e^{-11}$	4.0
Cd23d3		No match		3.1
N21f8		No match		3.0
N21g6		No match		2.8
Cd12e9		Nuclear Transport Factor NTF2 (Saccharomyces cerevisiae)	$1.4\ e^{-17}$	2.6
Cd21a11		Leucotriene hydrolase (Cavia porcellus)	$4.7\ e^{-7}$	2.6
Cd21a3		60S ribosomal protein L2 (Arabidopsis thaliana)	$7\ e^{-21}$	2.5
N21e9		No match		2.5
N21d10		No match		2.5
Cd123c12		40S ribosomal protein S9 (Podospora anserina)	$2.8\ e^{-19}$	2.4
Cd123h8		Translocation protein Sec62 (Yarrowia lipolytica)	$2.8\ e^{-17}$	2.3
N21g7		60S acidic ribosomal protein P2 (Alternaria alternata)	$6.3\ e^{-20}$	2.3
N21g2		No match		2.3
Cd23c7		40S ribosomal protein S17 (S. pombe)	$2.5\ e^{-16}$	2.2
N11f11		Hypothetical protein (A. thaliana)	$2.4\ e^{-5}$	2.0
Cd15		Translation elongation factor 1a (Schizophyllum commune)	$3.1\ e^{-15}$	- 2.0
Cd21f8		Ketol-acid reductoisomerase (Neurospora crassa)	$5\ e^{-6}$	- 2.0
Cd22b5		Hypothetical protein (S. pombe)	$3.6\ e^{-8}$	- 2.1
Cd12c1		No match		- 2.1
Cd22c6		No match		- 2.1
Cd106		No match		- 2.2
Cd11e9		Polyphenol oxidase (A. bisporus)	$1\ e^{-10}$	- 2.2
N23d3		Thioredoxin (Coprinus comatus)	$1.1\ e^{-11}$	- 2.2
Cd21h5		DnaJ protein homolog (Zea Mays)	$4\ e^{-9}$	- 2.2
Cd11h4		Pheromone receptor	$1\ e^{-17}$	- 2.3
Cd123d5		Metallothionein (Agaricus bisporus)	$3\ e^{-6}$	- 2.4
Cd66		No match		- 2.4
Cd123f3		No match		- 2.4
Cd95		No match		- 2.5
Cd134		No match		- 2.5
Cd30		Transcription initiation factor TFIID (A. thaliana)	$1\ e^{-4}$	- 2.5

Cd12b11	60S ribosomal protein P0 (Drosophila melanogaster)	1 e^{-8}	- 2.5
Cd11d12	No match		- 2.6
Cd11f7	40S ribosomal protein S17 (S. pombe)	2 e^{-32}	- 2.7
Cd32	No match		- 2.7
N11f5	No match		- 2.8
Cd21f7	No match		- 2.8
N22f2	No match		- 2.9
Cd23f1	Cytoskeletal P17 protein (Dictyostelium discoideum)	4 e^{-9}	- 3.0
Cd19	MAP Protein kinase (S. cerevisiae)	4 e^{-31}	- 3.0
Cd21e8	No match		- 3.1
Cd12c1	No match		- 3.1
Cd42	40S ribosomal protein S27 (S. pombe)	9 e^{-20}	- 3.3
Cd44	No match		- 3.7
Cd37	Actin depolymerizing factor (S. pombe)	1.5 e^{-17}	- 3.8
Cd41g6	No match		- 4.2
Cd107	No match		- 5.1
Cd52	No match		- 5.5
N23f9	No match		- 7.5
Cd12e3	Hypothetical protein (S. cerevisiae)	2.9 e^{-8}	- 10.3

[a] Derived from WU-BLASTX score; P value, probability that the observed similarity had occurred by chance. Low P values indicate a high probability of two proteins being structurally related.

[b] Ratio for normalized hybridization values of transcripts expressed in the cadmium-treated mycelium and in the non-treated mycelium.

U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LÈS-NANCY


Normalized mRNA levels in cadmium-treated mycelium
Normalized mRNA levels in control mycelium
10⁴
10³
10²
10
1
x5
x2
x2
x5

Chapitre 4

Discussion générale

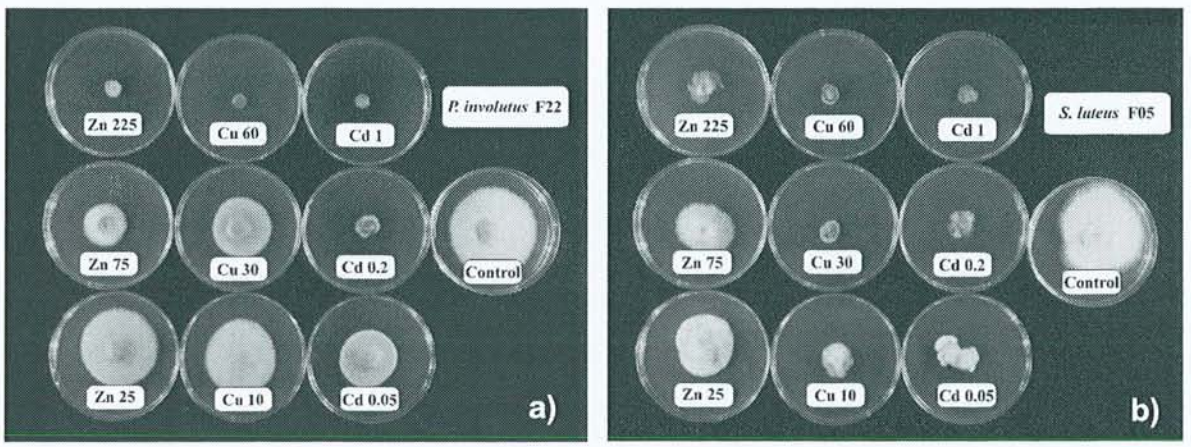


Figure 32. Tests de tolérance *in vitro* d'isolats fongiques aux métaux lourds. L'inoculum fongique est placé au centre de la boîte de Pétri contenant du milieu de culture additionné de métaux (de gauche à droite: Zn, Cu ou Cd) à différentes concentrations (de bas en haut: Zn 25, 75 et 225 ppm; Cu 10, 30 et 60 ppm; Cd 0,05, 0,2 et 1 ppm). En fin de phase exponentielle de croissance, le mycélium est récolté, séché et pesé. **a)** Isolat F22 de *Paxillus involutus*. **b)** Isolat F05 de *Suillus luteus*.

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

L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre du projet européen "Metal Tolerance of Ectomycorrhizal Fungi" (METOLEF). Mes travaux de thèse ont plus particulièrement porté sur:

- **l'isolement et l'identification de souches tolérantes aux métaux,**
- **et la mise en évidence de gènes impliqués dans la réponse au cadmium du champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus*.**

4.1. Réponse des champignons ectomycorhiziens aux métaux lourds in vitro

Cette étude a porté sur 39 isolats appartenant à 5 espèces de champignons ectomycorhiziens. Les tests de tolérance à quatre métaux lourds (Cu, Cd, Ni, Zn) ont été réalisés en conditions axéniques (Figure 32). L'utilisation d'un grand nombre d'isolats provenant de plusieurs sites pollués et non pollués nous a permis de mettre en évidence une forte variation interspécifique de la tolérance aux différents métaux. Les études antérieures, n'utilisant qu'un nombre réduit d'isolats ne montraient pas aussi clairement cet effet. En 1988, Jones & Hutchinson ont montré que les tests de tolérance en conditions axéniques ne sélectionnaient pas nécessairement les partenaires fongiques qui allaient augmenter la tolérance de l'hôte végétal. Cette observation remettait alors en question l'utilité des tests de tolérance en conditions axéniques. Cependant, un paramètre qui n'était pas pris en compte par ces auteurs est la compatibilité d'association entre les deux partenaires de la symbiose. De plus, une forte hétérogénéité intraspécifique a été mise en évidence lors des tests de tolérance.

Nous avons également montré l'absence de relation entre le degré de tolérance des isolats et le niveau de pollution de leur site d'origine (concentration en métaux dans le sol), le métal considéré et l'espèce fongique. Les données bibliographiques sur ce point étaient alors très controversées. Toutefois l'utilisation dans notre étude de nombreux isolats provenant de plusieurs sites pollués et non pollués nous a permis d'avoir une vision globale de cette relation sol pollué/tolérance des isolats.

4.2. Caractérisation de gènes impliqués dans la réponse au cadmium du champignon ectomycorhizien Paxillus involutus

4.2.1. Choix du modèle

Le champignon ectomycorhizien *P. involutus* est étudié au laboratoire depuis 1994. Sa culture en condition axénique ainsi que la synthèse de mycorhizes (bouleau et peuplier) sont bien maîtrisées. D'autre part, *P. involutus* est une espèce abondante dans de nombreux écosystèmes forestiers et est très souvent retrouvé sur les friches industrielles polluées par les métaux lourds. D'autre part, ce champignon, et en particulier l'isolat Sc01 (ATCC 200175), a fait l'objet de nombreuses études concernant les mécanismes d'absorption du cadmium et les effets de la mycorhization sur la croissance et la physiologie de plantes soumises à un stress métallique. Ces études ont été menées au laboratoire dans le cadre d'une thèse (Blaudez, 2000).

Le métal lourd cadmium a été choisi, d'une part à cause de son caractère non-essentiel et toxique même à de très faibles concentrations. De plus ce métal est trouvé de façon ubiquitaire dans les boues, les déchets industriels et les anciens sites miniers. D'autre part, nous avons mené de front au laboratoire les études moléculaires et les études biochimiques. Les études des flux et d'absorption des métaux lourds nécessitaient l'utilisation d'un radioélément de dangerosité raisonnable. Le choix s'est porté sur le ^{109}Cd. Afin d'avoir une vision intégrée des mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans la réponse aux métaux lourds, nous avons donc choisi de travailler sur le même élément, le cadmium. Le caractère non essentiel du cadmium nous permettait d'étudier spécifiquement les mécanismes moléculaires de la réponse au cadmium développée par le champignon.

4.2.2. L'hybridation soustractive et suppressive

Pour générer des banques d'ADNc correspondant à des gènes dont l'expression est modifiée suite au traitement par le cadmium, nous avons fait le choix d'utiliser une technique nouvelle développée par Diatchenko *et al.* (1996): l'hybridation soustractive et suppressive (SSH). Lorsque nous avons choisi d'appliquer cette technique à notre thème de recherche, seule une demi-douzaine d'articles étaient parus dans la banque de données PubMed, disponible sur le site du NCBI. Aujourd'hui beaucoup de laboratoires surtout dans le monde animal, emploient cette technique (une cinquantaine de travaux utilisant cette procédure ont été publiés en 2001).

L'hybridation soustractive et suppressive représente une technique alternative pour rechercher des modifications dans l'expression génique. C'est un outil pour les biologistes qui présente, comme toutes les techniques, des avantages et des inconvénients:

i) avantages de l'hybridation soustractive et suppressive:

- la SSH combine une étape d'hybridation soustractive avec une amplification par PCR afin d'obtenir une population de fragments PCR enrichis en ADNc correspondants à des gènes différentiellement exprimés. Cependant, l'originalité de la méthode réside dans le processus dit de normalisation. Ce processus égalise les différences d'abondance entre les différents ARNm (Diatchenko *et al.*, 1996). De ce fait, les gènes différentiellement exprimés dont les transcrits sont présents en forte quantité dans la cellule ne sont pas isolés en excès,

- la SSH peut être combinée avec d'autres méthodes afin d'augmenter ses capacités. Elle peut être combinée avec une analyse des profils d'expression sur puce d'ADNc (Yang *et al.*, 1999),

- cette technique permet d'utiliser des quantités très faibles d'ARNm (0,5-2 µg), ce qui autorise à travailler sur des échantillons délicats à obtenir. Le couplage avec un autre produit de la gamme Clontech permet de réaliser la SSH directement à partir d'ARN totaux, sans purification préalable des messagers,

- la SSH permet d'obtenir un produit d'amplification dont les fragments peuvent être clonés directement dans des vecteurs de type T/A, pour constituer une banque d'ADNc soustraits.

ii) inconvénients de l'hybridation soustractive et suppressive:

- une étape de digestion enzymatique est incluse dans le protocole de SSH. Cette restriction par l'enzyme *Rsa*I conduit à l'obtention de courts fragments d'ADNc qui seront soustraits et amplifiés plus efficacement. Les gènes ne comportant pas de site de restriction correspondant à cette enzyme ou générant, après digestion, des fragments de grande taille ne seront pas soustraits aussi efficacement,

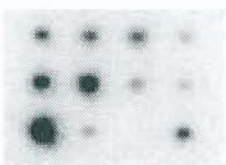
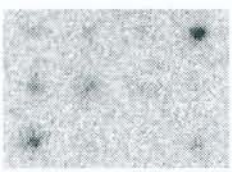
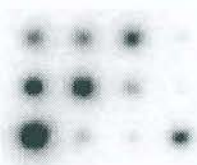
- la SSH peut conduire à isoler des ADNc provenant de régions différentes du même gène, de ce fait, nous ne pouvons pas être certains que chaque clone issu de la SSH représente un gène unique,

- la SSH permet la comparaison de seulement deux échantillons. D'autre part, lorsque les populations d'ARN comparées sont très voisines, les banques d'ADNc issues de la SSH sont susceptibles de contenir un nombre non-négligeable de faux positifs (Ye & Connor, 2000).

L'utilisation de cette technique sur des ARN extraits de mycélium fongique témoin et de mycélium cultivé pendant 12 heures en présence de 0,05 ppm de cadmium nous a permis d'obtenir des populations d'ADNc soustraites correspondant à des gènes régulés par le cadmium.

L'analyse des profils d'expression obtenus après criblage différentiel de filtres d'ADNc a mis en évidence une différence d'expression supérieure ou égale à 2 ($\geq +2$ et ≤ -2) pour 14 %

Tableau 30. Améliorations des conditions d'hybridation des filtres d'ADNc.
Références: a: Voiblet *et al.*, 2001; b: Southern, 1975.

Fixation des ADNc	*Tampon Formamide*	*Tampon HSB*[a]	*ExpressHyb (Clontech)*	*Tampon (SSC, Denhardt)*[b]
Cuisson des filtres			Non testé	Non testé
① Exposition aux UV			Non testé	Non testé
②	Non testé			

des clones déposés sur filtres. Ce pourcentage est peu différent de celui obtenu dans les études de régulation d'expression des gènes ne comportant pas d'étape d'enrichissement préalable. L'étude du transcriptome d'*Arabidopsis* lors d'une résistance systémique acquise (SAR), portant sur 7000 gènes, a révélé que 4,3 % des gènes sont impliqués dans la réponse SAR (induction ≥ 2,5) (Maleck *et al.*, 2000). D'autre part, les travaux de Yang *et al.* (1999) qui utilisent la même approche méthodologique (combinaison SSH/filtres d'ADNc), ont montré que 23 % des clones d'ADNc, obtenus après SSH, ont un rapport d'expression supérieur à 2. Ceci nous inciterait à penser que l'étape d'enrichissement n'a pas été aussi efficace qu'il aurait été souhaitable.

Le criblage des clones obtenus par SSH en utilisant une analyse de type northern-blot s'est très vite révélée fastidieuse et très coûteuse. C'est pourquoi dans la suite de mes travaux de thèse, nous avons utilisé une approche utilisant le criblage différentiel de filtres d'ADNc pour identifier les gènes différentiellement exprimés. Nous avons choisi de cloner en masse les populations d'ADNc enrichies, afin de constituer une banque d'ADNc enrichie en gènes dont l'expression est régulée par le cadmium. Plus de 1200 clones bactériens ont ainsi été générés (constituant la banque physique).

4.2.3. Construction et analyse des filtres à moyenne densité en ADNc

Pour cette étude, nous avons utilisé la technique de filtres d'ADNc développée et adaptée par Voiblet (1999) et Duplessis (2001) aux champignons ectomycorhiziens et aux ectomycorhizes, au sein de notre UMR. L'utilisation de cette approche a l'avantage de permettre l'analyse de l'expression de nombreux clones lors d'une seule hybridation.

Nous avons dû cependant adapter les techniques d'hybridation jusqu'alors utilisées au laboratoire, en améliorant en particulier les conditions d'hybridation (Tableau 30) et de lavages. Ces améliorations nous ont permis d'obtenir des signaux d'hybridation détectables pour la majorité des clones et différents du bruit de fond des membranes. Le tampon (SSC, Denhardt) a présenté un bon compromis facilité d'utilisation/qualité des résultats avec les membranes de nylon N^+, et a été sélectionné pour la suite de notre travail.

Nous avons déposé manuellement des séries de 192 produits PCR provenant de l'amplification des clones bactériens correspondant aux banques d'ADNc soustraits obtenues. Deux séries de 8 filtres ont ainsi été générées portant au total plus de 1200 fragments d'ADNc et les clones contrôles nécessaires. L'expression des ADNc a été suivie chez le champignon cultivé sur milieu MMN additionné ou non de 0,05 ppm de cadmium pendant 12 heures. Nous avons ainsi obtenu les profils d'expression génique de 1291 clones, générant ainsi les premiers résultats concernant la réponse moléculaire d'un champignon ectomycorhizien soumis à un stress métallique. L'analyse comparative des filtres d'ADNc nous a permis de mettre en évidence la régulation d'environ 14 % des clones déposés (178) sur filtres (niveau de régulation supérieur ou égal à 2 ou inférieur ou égal à - 2). Donc, le niveau d'expression de 86 % des clones n'est pas modifié après 12 heures de culture sur milieu contenant 0,05 ppm de cadmium.

Il se peut que le faible nombre de gènes régulés soit dû, comme chez *A. thaliana*, à une régulation dynamique du taux de transcrits, et qu'après 12 heures de culture en présence de cadmium, le nombre de gènes dont l'expression est régulée soit faible. En effet, lors d'une blessure mécanique des feuilles d'Arabidopsis, des modifications à la fois importantes et dynamiques de l'expression génique sont initiées. Le taux de transcrits de nombreux gènes augmente jusqu'à un maximum, 90 à 120 min après la blessure, puis diminue jusqu'à l'expression de base (Reymond *et al.*, 2000). Le nombre de gènes dont l'expression est régulée positivement 90 min après la blessure est de 39, il n'est plus que de 13 après 9 h et de 7 au bout de 24 h (Reymond *et al.*, 2000). De plus, puisque le niveau d'expression de la majorité des clones n'est pas affecté par le cadmium (dans les conditions utilisées dans cette étude), cela pourrait signifier que la physiologie générale du champignon n'est pas altérée. Des mécanismes de piégeage intracellulaire et/ou de compensation (par l'augmentation de la synthèse de protéines) pourraient expliquer ce faible pourcentage de gènes régulés.

Parmi les 178 clones régulés, 51 ont été d'ores et déjà séquencés, d'autres sont en cours de séquençage. Les gènes ne présentant pas d'homologie avec les séquences présentes dans les banques de données représentent 50 % des séquences obtenues jusqu'à présent. Ces gènes sont particulièrement intéressants car ils pourraient coder des protéines jusqu'alors non identifiées et régulées par un stress cadmium. Le gène le plus fortement stimulé (x 5,1) code la protéine ribosomique S0. Le gène le plus fortement réprimé (x 10,35) code une protéine hypothétique probablement localisée au niveau de la membrane.

Parmi les 5 gènes de *P. involutus* les plus exprimés, 4 correspondent à des gènes nouveaux qui n'ont encore jamais été répertoriés dans les banques de données publiques. Le cinquième correspond à une polyphénol oxydase impliquée dans la synthèse de mélanine extracellulaire. Les gènes fortement exprimés dans le champignon cultivé sur milieu sans ajout de cadmium sont pour l'essentiel les gènes fortement exprimés dans le champignon cultivé sur milieu additionné de cadmium. Certains clones fortement exprimés sont actuellement en cours de séquençage.

Parmi les gènes dont l'expression augmente en présence de Cd dans le milieu de culture, deux gènes codent des protéines impliquées dans les phénomènes de transport intracellulaire: facteur de transport nucléaire (NTF2) ou protéine de translocation sec62. Sec62 est une sous-unité essentielle du complexe Sec impliqué dans la translocation de préprotéines au travers de la membrane du réticulum endoplasmique. NTF2 est une protéine impliquée dans les transports nucléaires et plus particulièrement, elle semble jouer un rôle dans l'importation de protéines (en particulier Ran) dans le noyau.

Parmi les gènes dont l'expression diminue en présence de Cd, un ADNc codant un petit polypeptide d'environ 170 acides aminés appelé protéine Mago-Nashi a été identifié. Cette protéine jouerait un rôle dans la localisation intracellulaire des ARN chez les plantes et les animaux (Swidzinski *et al.*, 2001).

En outre, parmi ces gènes réprimés par le cadmium, on note la présence d'ADNc codant une polyphénol oxydase, une thiorédoxine et une métallothionéine. L'enzyme polyphénol oxydase est impliquée dans la synthèse de mélanine extracellulaire (Gadd, 1993). Chez le champignon *Cladosporium cladosporoides*, il a été démontré que la forme mélanisée du champignon est capable de piéger 2,5 fois plus de cadmium dans ses parois que la forme albinos, non mélanisée (Fogarty & Tobin, 1996). Chez *P. involutus*, l'expression de ce gène est réprimée. En revanche, son taux d'expression reste élevé en présence ou en absence de cadmium dans le milieu de culture. Il est donc possible que la quantité de mélanine synthétisée soit suffisante pour piéger le Cd.

L'implication possible des thiorédoxines dans les mécanismes de défense contre les métaux lourds, et en particulier le cadmium, a été démontrée chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Lemaire *et al.*, 1999). Une augmentation des taux de transcrits des deux formes de thiorédoxines (TRX *h* et *m*) a été mise en évidence lorsque les cellules sont mises en présence de cadmium. D'autre part, les travaux de Vido *et al.* (2001) utilisant une approche protéomique, ont montré que les deux systèmes redox thiols de *S. cerevisiae*, glutathion et thiorédoxine, sont essentiels aux défenses cellulaires contre le cadmium. En revanche, nos résultats sont opposés à ceux décrits par Lemaire *et al.* (1999), puisque l'expression d'un gène codant une thiorédoxine de *P. involutus* est réprimée d'un facteur 2,2 dans nos conditions de culture.

Les métallothionéines sont de petits polypeptides riches en cystéine, capables de complexer des métaux essentiels comme le Cu et le Zn, mais aussi des métaux non-essentiels comme le Cd. Toutefois, leur implication dans la réponse au cadmium chez les micro-organismes n'est pas claire. Une souche de *S. cerevisiae*, Cd-résistante, synthétise une protéine cytoplasmique présentant les caractéristiques d'une métallothionéine qui fixe le Cd lorsque la levure est cultivée sur un milieu contenant du Cd (Tohoyama *et al.*, 1995). Cependant, dans la levure *Candida glabrata*, les métallothionéines et les phytochélatines sont produites en réponse au Cu et au Cd, respectivement (Mehra *et al.*, 1988). Dans notre étude, le taux de transcrits codant une métallothionéine est réduit de 2,2 fois en présence de cadmium dans le milieu de culture. Si cette protéine est impliquée dans la détoxication du cadmium intracellulaire, la régulation de son expression pourrait s'effectuer à un niveau post-transcriptionnel.

Il est intéressant à noter ici les résultats obtenus dans l'article 2, quant au niveau de régulation de la protéine PiSOD. En effet, au bout de 12 heures de culture en présence ou en absence de cadmium dans le milieu de culture, le taux de transcrits codant cette protéine ne varie pas, alors que l'activité superoxyde dismutase est fortement stimulée. La mise en jeu de mécanismes de régulation post-traductionnels pourrait intervenir dans la régulation d'autres protéines impliquées dans la réponse cellulaire au cadmium.

4.2.4. Isolement, caractérisation et étude de l'expression d'une superoxyde dismutase manganèse-dépendante chez le champignon ectomycorhizien **Paxillus involutus** *(Jacob* **et al.,** *2001)*

L'analyse au hasard de gènes isolés par hybridation soustractive a mis en évidence un gène codant une superoxyde dismutase. Ces protéines sont très importantes car elles sont impliquées dans les mécanismes de défense vis-à-vis des fortes concentrations en espèces réactives de l'oxygène en catalysant la conversion des radicaux superoxydes ($^{\cdot}O_2^-$) en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Scandalios, 1997). De plus, il a été démontré que le cadmium est impliqué dans l'induction d'un stress oxydatif chez *S. cerevisiae* (Brennan & Schiestl, 1996) et dans les germinations de haricot (Somashekaraiah *et al.*, 1992). D'autre part, il a été montré au laboratoire que du cadmium était retrouvé dans le cytoplasme du champignon *P. involutus* lors d'expériences d'analyses de flux de ^{109}Cd (Blaudez *et al.*, 2000a), compartiment cellulaire où il pourrait induire un stress oxydatif comme cela a été démontré pour *S. cerevisiae* (Brennan & Schiestl, 1996).

L'ADNc codant une superoxyde dismutase a été obtenu par criblage d'une banque phagique en utilisant un fragment de cet ADNc obtenu par hybridation soustractive. La séquence nucléotidique est constituée de 618 paires de bases et présente 88 % de similarités avec la superoxyde dismutase manganèse-dépendante de *Ganoderma microsporum*. L'analyse de la protéine révèle l'absence de peptide signal N-terminal d'adressage à la mitochondrie, mais, en C–terminal, la séquence consensus d'adressage aux peroxysomes (SKL) semble indiquer une localisation peroxysomale de cette protéine. Les essais de localisation de cette protéine sont en cours au laboratoire. Les masses moléculaires de 53,2 kDa et 26,2 kDa pour l'enzyme native et les sous-unités respectivement, suggèrent que l'enzyme est active sous forme dimérique. L'étude de l'expression de cette enzyme a révélé une absence de modification des taux de transcrits et de polypeptides lors de l'exposition au cadmium; par contre, l'activité SOD de base est fortement accrue lors du traitement cadmium. L'augmentation de l'activité de l'enzyme ainsi que le fait qu'elle puisse complémenter une souche d'*E. coli* déficiente en SOD sous stress cadmium suggère que cette enzyme est impliquée dans la réponse cellulaire de *P. involutus* au cadmium. L'étude de sa régulation a montré que les taux de transcrits et de polypeptides ne varient pas avec la présence de cadmium. Par contre, l'activité de l'enzyme est fortement augmentée en présence de cadmium dans les conditions de l'expérience.

4.2.5. Isolement et caractérisation d'une lanostérol synthase

Cette étude a été menée simultanément avec les autres travaux de thèse, et est toujours en cours. Dans la même série de crible qui nous a permis d'isoler la superoxyde dismutase, nous avons identifié un ADNc codant une lanostérol synthase. Cette enzyme est impliquée dans les premières étapes de la biosynthèse de l'ergostérol, un composé spécifique des membranes des

```
ATGTTCATCCCCGCCAGTCAACTCGCAAACTTGTACTCTCCATTGGACATCCCGGACTCCGGTAAACAGCCCTTCACCGATTATTCTCGCTGGAGGCTGC    100
M  F  I  P  A  S  Q  L  A  N  L  Y  S  P  L  D  I  P  D  S  G  K  Q  P  F  T  D  Y  S  R  W  R  L  L     34

TCGTGGATGACGGCGGTCGACAGACGTGGCATTACCTCACGTCAGACGAGGAATGTGAGAAGTGGCCTCAGAATGAGGTAGACAAATATTGGACTGGCCA    200
  V  D  D  G  G  R  Q  T  W  H  Y  L  T  S  D  E  E  C  E  K  W  P  Q  N  E  V  D  K  Y  W  T  G  Q      67

ACCGCTCAACCTCCCCGCCCTCCCGAAACCAGATACTCCGCTCGAAGCTGCCCGGAACGGCTACACCTTCTACAAGCACCTCCAGTCACACGACGGACAC    300
  P  L  N  L  P  A  L  P  K  P  D  T  P  L  E  A  A  R  N  G  Y  T  F  Y  K  H  L  Q  S  H  D  G  H      100

TGGGCTGGTGAGTATGGCCGTGCGATGTTCCTGATTCCCGGCCTGGTGATTGGGTCATATATTGCTGGAATGGGATTCAAGAAGGAAGAACGACTCGAGA    400
W  A  G  E  Y  G  G  A  M  F  L  I  P  G  L  V  I  G  S  Y  I  A  G  M  G  F  K  K  E  E  R  L  E  I    134

TAATTCGTTACGTCCTAAACCGGGCACATCCTGAAGACGGAGGTTGGGGAATCCAAATCGAGGGACACTCAAGTGTGTTCGGAACAGCCCTCAACTACGT    500
  I  R  Y  V  L  N  R  A  H  P  E  D  G  G  W  G  I  Q  I  E  G  H  S  S  V  F  G  T  A  L  N  Y  V      167

GGTTTTGCGAATCCTCGGCATGGGTGTCGATCATCCGGCTGCTGTGAAGGCAAGGGGCACGCTTCACAAGCTAGGTGGAGCAACAGGTGCACCAGCTTGG    600
  V  L  R  I  L  G  M  G  V  D  H  P  A  A  V  K  A  R  G  T  L  H  K  L  G  G  A  T  G  A  P  A  W      200

GGCAAGTTTTGGCTGGCAGTCCTCAACGTTTATGACTGGGAGGGAGTGAATCCCATTCCTCCCGAAGTATGGCTTTGCCCTGAGTGGGCCCCATTCCATC    700
G  K  F  W  L  A  V  L  N  V  Y  D  W  E  G  V  N  P  I  P  P  E  V  W  L  C  P  E  W  A  P  F  H  P    234

CTCATAGATGGTGGATCAATATCCGCAATGTCTACACACCCATGAGTTATCTCTATGGAATGCGATTCAAGATGGAAGAGAATGACTTGATCTGTTCGCT    800
  H  R  W  W  I  N  I  R  N  V  Y  T  P  M  S  Y  L  Y  G  M  R  F  K  M  E  E  N  D  L  I  C  S  L      267

CCGCCAGGAGTTATACCCGACCGACTATTACCGCATACACTGGCCAGCACAGCGTAACAACGTTGCAAGCGCTGACATCTACTCGCCTCACACCGCCTTT    900
  R  Q  E  L  Y  P  T  D  Y  Y  R  I  H  W  P  A  Q  R  N  N  V  A  S  A  D  I  Y  S  P  H  T  A  F      300

CTTGATGCCATGAACGTGGTACTATCAATGTATGAGAGCTGCGCCATCCCTGCTGTTCGCAAAACCGCCTTGAGGCGTGCCTACGAGCTCGTCGTACGCG   1000
L  D  A  M  N  V  V  L  S  M  Y  E  S  C  A  I  P  A  V  R  K  T  A  L  R  R  A  Y  E  L  V  V  R  E    334

AAGACGAAAACACCGGCTACCTGACCATTGCGGGCGTCTCCAAGATGTTGAACCTATTGTGTCGCTTCTACGTCGAGGGTACCGATTCAGAAGCGTATCG   1100
  D  E  N  T  G  Y  L  T  I  A  G  V  S  K  M  L  N  L  L  C  R  F  Y  V  E  G  T  D  S  E  A  Y  R      367

TCAGCACGCCATCAAACGCGCCGATTACATGTGGCTTGGCGCTGAGGGTATGTTGATGAATGGGACGAATGGGAGTCAGCTCTGGGATATCGGATTCATC   1200
  Q  H  A  I  K  R  A  D  Y  M  W  L  G  A  E  G  M  L  M  N  G  T  N  G  S  Q  L  W  D  I  G  F  I      400

ACGCAGGCGCTGGTCGAAACGGGCCTAGCGAAGGAGGAGGCAACAAAGAGAGCTTGGAAAAGGCACTGAACTGGCTCGATGTTTGCCAGATCAGAGAGA   1300
T  Q  A  L  V  E  T  G  L  A  K  E  E  G  N  K  E  S  L  E  K  A  L  N  W  L  D  V  C  Q  I  R  E  N    434

ACCCGAAGCACTATGAGACTTCTTACCGCCACCGAACTAAGGGTGCATGGCCGTTCAGCACCAAAGAGGAAGGGTACACGGTCAGTGACACTACTGGAGA   1400
  P  K  H  Y  E  T  S  Y  R  H  R  T  K  G  A  W  P  F  S  T  K  E  E  G  Y  T  V  S  D  T  T  G  E      467

AGGTCTCAAATCGGTCTTGTACCTTCAAAATCAAGTTGTAGGAACGAAGAAGGTCATCTCGGACGAGCGACTCTTTGACGCCGTCGACACTTTGCTCACG   1500
  G  L  K  S  V  L  Y  L  Q  N  Q  V  V  G  T  K  K  V  I  S  D  E  R  L  F  D  A  V  D  T  L  L  T      500

ATGCAGAACGACCATGGTGGATTTGCTAGTTACGAGCTCGTGAGAGGGCCCAAGTGGCTGGAATGGCTTAACCCGGTAGAAATGTTTGGCGATGTCATGA   1600
M  Q  N  D  H  G  G  F  A  S  Y  E  L  V  R  G  P  K  W  L  E  W  L  N  P  V  E  M  F  G  D  V  M  I    534

TTGAATATTGTTACCCTGAGTGTACGACTTCCGTCATCACGTCTCTGTCCGTATTCAGGAGACATTACCCCAACTATCGTTCCACTGAAATCATCTGTAC   1700
  E  Y  C  Y  P  E  C  T  T  S  V  I  T  S  L  S  V  F  R  R  H  Y  P  N  Y  R  S  T  E  I  I  C  T      567

TATTCGGAAGGCCATCAAATGGCTTCACGAAGTCCAACAACCTGAAGGTGGCTGGCTTGGGTCATGGGGAATCTGCTTTACTTACGCGCACACACTTCGCA   1800
  I  R  K  A  I  K  W  L  H  E  V  Q  Q  P  E  G  G  W  L  G  S  W  G  I  C  F  T  Y  A  T  H  F  A      600

TTGGAAAGCTTGTCATTGGCTGGGGAAAACTATGCAAATAGCCCTGCTGTTCGGCGCGCGTGCGACTTCCTGCTTGGAAAACAACGTCAGGACGGAGGTT   1900
L  E  S  L  S  L  A  G  E  N  Y  A  N  S  P  A  V  R  R  A  C  D  F  L  L  G  K  Q  R  Q  D  G  G  W    634

GGGGAGAAAGCTACAAGTCGTGCGAATTGGCTGCTTGGGTTGAGCATGAGAACACTCAGGTTGTCCAGACATGTTGGGCAACTATGGCTCTCATGTACGC   2000
  G  E  S  Y  K  S  C  E  L  A  A  W  V  E  H  E  N  T  Q  V  V  Q  T  C  W  A  T  M  A  L  M  Y  A      667

CAGGTACCCGAATCGGGAACCCATTGAAAGGGCGGTTAAGTTGGTGATGTCGAGACAGCTTCCGGATGGTTCGTGGGCACAGGAAGCGATTGAAGGCATG   2100
R  Y  P  N  R  E  P  I  E  R  A  V  K  L  V  M  S  R  Q  L  P  D  G  S  W  A  Q  E  A  I  E  G  M      700

ACAGCCAAGACTTGTGGCGTCTCATACCCCAACTTCAAATTCTCGTTCCCTATCTGGATGCTTGGAAAAGCACACTACTACCTCAAGGAATTGGAAGCAC   2200
T  A  K  T  C  G  V  S  Y  P  N  F  K  F  S  F  P  I  W  M  L  G  K  A  H  Y  Y  L  K  E  L  E  A  H    734

ATCGAGATGGATCCAGCGACTAG                                                                                  2223
  R  D  G  S  S  D  *                                                                                    741
```

Figure 33. Séquence nucléotidique et séquence polypeptidique déduite de l'ADNc codant une lanostérol synthase de *P. involutus*.
Le codon stop est marqué par un astérisque. La séquence d'acides aminés présente dans la plupart des lanostérol synthases est soulignée. Les résidus conservés sont encadrés.

champignons (Weete, 1980) dont la quantité corrèle la biomasse fongique métaboliquement active (Nylund & Wallander, 1992). L'ergostérol semble être impliqué dans la stabilisation des composés de la membrane lors de la tolérance à l'éthanol et à la chaleur chez *S. cerevisiae* (Swan & Watson, 1998). La synthèse d'ergostérol pourrait être une réponse du champignon pour maintenir l'intégrité des cellules en contact avec le métal, en augmentant la synthèse des constituants pariétaux.

L'ORF complète a été obtenue à l'aide de la stratégie d'amplification rapide des extrémités des ADNc (RACE-PCR). La séquence nucléotidique ainsi que la séquence polypeptidique déduite sont présentées dans la figure 33. La séquence nucléotidique est constituée de 2223 paires de bases et présente 67 % de similarités avec la lanostérol synthase de *Neurospora crassa*. Une caractéristique intéressante de la séquence protéique est la présence du motif DGGWGIQ (acides aminés 146 à 152). En effet, la plupart de ces enzymes possèdent le motif DGGWGLH pour lequel l'histidine terminale est strictement conservée et correspond à la glutamine Q152 dans la séquence isolée de *P. involutus*. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que le remplacement de l'histidine H152 par une alanine abolit l'activité enzymatique, alors que le remplacement de l'histidine par une lysine ou par une arginine maintient la fonction (Corey *et al.*, 1997). L'hypothèse émise est que la position 152 doit être occupée par un acide aminé chargé positivement. Cependant, si les essais réalisés dans l'équipe de Seiichi Matsuda s'avèrent concluants, cela signifierait que la charge est essentielle dans cette position 152, mais qu'une charge positive ou négative est acceptable. D'autre part, les résidus thréonine T389 et valine V461 correspondent aux résidus T384 et V454 dans la séquence de *S. cerevisiae*, et ces résidus sont essentiels pour la formation du lanostérol et l'activité catalytique, respectivement.

Après le dépôt de la séquence nucléotidique de la lanostérol synthase dans la banque de données GenBank, Seiichi Matsuda (Department of Biochemistry and Cell Biology, Rice University, Houston, Texas) nous a contacté afin d'étudier cette enzyme. Son équipe étudie les relations structure/fonction des oxydosqualène cyclases, la famille d'enzymes qui inclut la lanostérol synthase. Un de leurs projets est la caractérisation de ces gènes chez divers organismes.

Jusqu'à ce jour, son équipe n'a pas observé de production de lanostérol synthase active (à partir de l'ORF que nous lui avons fourni) en utilisant le système d'expression dans la levure *S. cerevisiae* couramment utilisé. Une des explications possibles de l'absence de production de protéine active pourrait être la relative richesse en bases (G+C) de la partie N-terminale de la lanostérol synthase de *P. involutus*. En effet, plus l'extrémité N-terminale est riche en bases (G+C), plus l'expression est faible dans la levure. D'autre part, il semble qu'un événement mutagène lors de l'amplification par PCR du cadre de lecture soit à écarter, car des clones obtenus indépendamment possèdent la même séquence nucléotidique. Pour pallier ce problème d'expression dans *S. cerevisiae*, l'équipe de Seiichi Matsuda met actuellement au point un

système analogue d'expression dans la levure *Pichia*, qu'il est prévu d'utiliser pour le gène isolé de *P. involutus*.

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

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans ce mémoire concernent l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu par le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* lors d'un stress au cadmium. Ils ont nécessité le développement et la mise en place de techniques de biologie moléculaire, peu utilisées auparavant au sein de notre équipe, et qui le sont depuis en routine. Ces travaux constituent la première étape dans la recherche et la caractérisation de gènes impliqués dans la réponse aux métaux lourds. Ils s'inscrivent dans le cadre d'un programme visant à mieux comprendre les modalités de protection que confère un champignon ectomycorhizien à son hôte végétal. Ce programme a retenu l'attention de la Communauté Européenne sous la forme du projet de recherches METOLEF, de la région Lorraine et concerne également l'ADEME qui finance la thèse de Mikaël Courbot.

Avec Damien Blaudez et la collaboration d'autres membres du projet METOLEF, nous avons étudié *in vitro* la tolérance des champignons ectomycorhiziens aux métaux lourds. Cette étude, la première à prendre en compte un aussi grand nombre d'isolats provenant de différents sites pollués et non pollués, a révélé une grande variation interspécifique de la tolérance, mais également une forte hétérogénéité intraspécifique. D'autre part, les isolats provenant des sites pollués, et ce quel que soit le degré de pollution et le métal contaminant, ne présentent pas de tolérance accrue par rapport aux isolats provenant de sites non pollués.

Les travaux de notre équipe ont montré que le champignon se comporte comme un véritable filtre car il retient une partie des métaux lourds, notamment au niveau de ses parois (Blaudez *et al.*, 2000a). Cependant lorsque les métaux lourds parviennent à contourner ces stratégies d'évitement, des mécanismes de détoxication intracellulaires peuvent se mettre en place, pour remédier aux effets délétères des métaux lourds. Afin de mettre en évidence les gènes impliqués dans la réponse à un stress métallique et d'étudier leurs profils d'expression, nous avons choisi de coupler la technique d'enrichissement qu'est l'hybridation soustractive et suppressive (SSH) au criblage différentiel de filtres d'ADNc. Nous avons ainsi montré que 14 % des clones sont régulés par le cadmium, et que par conséquent l'expression de 86 % d'entre eux n'est pas modifiée après 12 heures de culture sur milieu contenant 0,05 ppm de cadmium.

Cette étude des gènes mis en jeu lors de la réponse aux métaux lourds chez les champignons ectomycorhiziens nous a permis d'acquérir une première image des fonctions régulées.

Nous avons également isolé et cloné deux ADNc correspondant à des gènes impliqués dans la réponse du champignon au cadmium. L'un de ces gènes code une superoxyde dismutase manganèse-dépendante. La caractérisation de cet ADNc, ainsi que l'étude de la régulation par le cadmium de l'expression du gène et de la protéine ont été réalisées (Jacob *et al.*, 2001). L'autre gène code une lanostérol synthase, pour lequel la séquence codante a été clonée et est en cours de caractérisation dans l'équipe de Seiichi Matsuda.

Les perspectives de recherche des prochaines années s'attacheront à mieux comprendre les mécanismes physiologiques et moléculaires mis en jeu par les partenaires fongiques dans la tolérance aux métaux lourds et, à plus long terme, à exploiter ce potentiel pour améliorer cette même tolérance chez les espèces ligneuses qui leurs sont associées. La production de souches fongiques plus tolérantes et les essais de réimplantation passent cependant par une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques et moléculaires de la tolérance.

Ces perspectives concerneront les points suivants:

- la poursuite d'une étude globale de l'expression des gènes par la technique des filtres à ADNc. Le développement de la fabrication à façon de filtres à haute densité en ADNc, à moindre coût, par de nombreuses sociétés de services nous permettra de réduire ainsi les manipulations fastidieuses des ADNc (dénaturation, dépôt) et des membranes (192 dépôts dans notre étude, les filtres à moyenne densité peuvent atteindre 2000 à 6000 dépôts par membrane). Afin d'étudier la spécificité de la réponse moléculaire au cadmium, les profils d'expression des gènes seront établis pour différents métaux. Nous espérons ainsi identifier des gènes spécifiques de la réponse à certains métaux,

- parmi les gènes que nous avons identifiés, nous désirons caractériser plus précisément l'expression et le rôle des gènes régulés par un stress cadmium (métallothionéines, thiorédoxines...). Cette caractérisation passe essentiellement par le développement et la mise au point des techniques de transformation génique des champignons ectomycorhiziens. En particulier la mise au point des techniques d'inactivation de gènes nous permettrait de démontrer la fonction biologique des gènes et d'étudier l'incidence de leur délétion sur la physiologie du champignon cultivé en présence de cadmium,

- l'étude ciblée de gènes impliqués dans la réponse aux métaux lourds de champignons et/ou de plantes. En particulier, le clonage des gènes codant des protéines impliquées dans le cycle du glutathion et dans les voies de synthèse des phytochélatines a débuté

dans le cadre de la thèse de Mikaël Courbot. Cette approche ciblée de clonage de gènes particuliers, ainsi que la poursuite de l'étude globale de l'expression des gènes par la technique des filtres à ADNc devraient permettre de déterminer les étapes clés de la tolérance,

- l'implantation sur site-atelier de plantules colonisées par des champignons ectomycorhiziens tolérants aux métaux lourds. Les résultats acquis dans le cadre du projet METOLEF soulignent que l'introduction de symbiotes fongiques est nécessaire pour une bonne reprise et pour l'installation de jeunes plants ligneux sur sites pollués. L'utilisation, dans les procédés de phytodécontamination, de plantes ligneuses à croissance rapide et à forte biomasse comme le peuplier ou le saule, associés à des symbiotes efficaces peut aussi constituer une alternative à l'utilisation de plantes herbacées dites hyperaccumulatrices, qui sont majoritairement des plantes à faible biomasse. Le peuplier pourrait de surcroît, s'avérer un modèle utile puisque les programmes de séquençage en cours devraient permettre de développer l'outil transgénique. Une partie du travail de thèse de Mikaël Courbot sera consacrée à l'introduction *in situ* sur sols pollués de plants mycorhizés dans le cadre d'un financement par l'ADEME.

Références bibliographiques

Abeles FB, Morgan PW & Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in plant biology, 2ème édition. Academic Press, San Diego.

Abuzinadah RA & Read DJ (1986a) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. New Phytologist 103: 481-493.

Abuzinadah RA & Read DJ (1986b) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. III. Protein utilization by *Betula*, *Picea* and *Pinus* in mycorrhizal association with *Hebeloma crustuliniforme*. New Phytologist 103: 507-514.

Abuzinadah RA, Finlay RD & Read DJ (1986) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. II. Utilization of protein by mycorrhizal plants of *Pinus contorta*. New Phytologist 103: 495-506.

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR & Venter JC (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and Human Genome Project. Science 252 : 1651-1656.

Adriano DC (1986) Trace elements in the terrestrial environment. Edité par Adriano DC. Springer-Verlag, New-York, USA.

AFNOR (1997) NF ISO 11074-1. Qualité du sol – Vocabulaire – Partie 1: termes et définitions relatifs à la protection et à la pollution du sol.

Agerer R (1987) Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn, Schwäb, Gmünd.

Ahonen-Jonnarth U, Van Hees PAW, Lundström US & Finlay RD (2000) Production of organic acids by mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings exposed to elevated concentrations of aluminium and heavy metals. New Phytologist 146: 557-567.

Allaway WG & Ashford AE (1996) Structure of the hair roots in *Lysinema ciliatum* R. Br. and its implications for their water relations. Annals of Botany 77: 383-388.

Alloway BJ (1995) Heavy metals in soils. Edité par Alloway BJ. 2ème édition. Blakie Academic & Professional. London.

Altschul SF, Boguski MS, Gish W & Wootton JC (1994) Issues in searching molecular sequence databases. Nature Genetics 6: 119-129.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W & Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

Amann E & Brosius J (1985) "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. Gene 40: 183-190.

Amann E, Ochs B & Abel K-J (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. Gene 69: 301-315.

Anderson L & Seilhamer J (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. Electrophoresis 18: 533-537.

Andreae MO (1986) Organoarsenic compounds in the environment. Dans "Organometallic compounds in the environment". Edité par Craig PJ. Harlow: Longman. pp. 198-228.

Arazi T, Sunkar R, Kaplan B & Fromm H (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants. Plant Journal 20: 171-182.

Arnon DI & Stout PR (1939) The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. Plant Physiology 14: 371-375.

Arzul G & Maguer JF (1990) Influence of pig farming on the copper content of estuarine sediments in Britany, France. Marine Pollution Bulletin 21: 431-434.

Asensio J, Ruiz-Argueso T & Rodriguez-Navarro A (1976) Sensitivity of yeasts to lithium. Antonie Van Leeuwenhoek 42: 1-8.

Ashford AE, Peterson CA, Carpenter JL, Cairney JWG & Allaway WG (1988) Structure and permeability of the fungal sheath in the *Pisonia* mycorrhiza. Protoplasma 147: 149-161.

Ashford AE, Allaway WG, Peterson CA & Cairney JWG (1989) Nutrient transfert and the fungus-root interface. Australian Journal of Plant Physiology 16: 85-97.

Assunçao AGL, Da Costa Martins P, De Folter S, Vooijs R, Schat H & Aarts MGM (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant, Cell and Environment 24: 217-226.

Attwood TK, Beck ME, Bleasby AJ & Parry-Smith DJ (1994) PRINTS – A database of protein motif fingerprints. Nucleic Acids Research 22: 3590-3596.

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

Augé RM & Stodola AJW (1990) An apparent increase in symplastic water contributes to greater turgor in mycorrhizal roots of droughted *Rosa* plants. New Phytologist 115: 285-295.

Austin MP & Smith TM (1989) A new model for the continuum concept. Vegetatio 83: 35-47.

Azpiroz-Leehan R & Feldmann KA (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. Trends in Genetics 13: 152-156.

Babich H & Stotzky G (1985) Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. Environmental Research 36: 111-137.

Bachem CW, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M & Visser RG (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant Journal 9: 745-753.

Bairoch A & Apweiler R (1997) The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research. Journal of Molecular Medicine 75: 312-316.

Baize D (1997) Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France) Références et stratégies d'interprétation. Edité par l'INRA, Paris.

Baker AJM (1981) Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3:643.

Baker AJM (1987) Metal tolerance. New Phytologist 106 (Suppl.): 93-111.

Baker AJM & Walker PL (1989) Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. Chemical Speciation and Bioavailability 1: 7-17.

Baker AJM & Walker PL (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. Dans "Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects". Edité par Shaw AJ. CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 155-177.

Barbas J, Santhanagopalan V, Blasczynski M, Ellis WR Jr & Winge DR (1992) Conversion in the peptides coating cadmium: sulfide crystallites in *Candida glabrata*. Journal of Inorganic Biochemistry 48: 95-105.

Baszynski T, Wajda L, Krol M, Wolinska D, Krupa Z & Tukendorf A (1980) Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. Physiologia Plantarum 48: 365-370.

Baxevanis AD (2000) The Molecular Biology Database Collection: an online compilation of relevant database resources. Nucleic Acids Research 28: 1-7.

Beauchamp C & Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.

Beever RE & Burns DJW (1980) Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Advances in Botanical Research 8: 128-219.

Bell AA & Wheeler MH (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annual Review of Phytopathology 24: 411-451.

Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ & Ostell J (1997) GenBank. Nucleic Acids Research 25: 1-6.

Bernard N (1904) Le champignon endophyte des orchidées. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 138: 828-830.

Bernhard WR & Kägi HR (1987) Purification and characterization of atypical cadmium-binding polypeptides from *Zea mays*. Experientia 52: 309-315.

Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Vanstaveren M, Stiekema W, *et al.* (1998) Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. Nature 391: 485-488.

Beyrle H (1995) The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. Dans "Mycorrhiza: structure, molecular biology and function". Edité par Varma AK & Hock B. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 365-390.

Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7: 1513-1523.

Björkman E (1960) *Monotropa hypopitys*. L. an epiparasite on tree roots. Physiologia Plantarum 13: 308-327.

Blaudez (2000) Etude des interactions entre métaux lourds et champignons ectomycorhiziens: capacités d'accumulation, mécanismes d'absorption et influence sur la physiologie de plantes hôtes. Thèse de l'Université Henri Poincaré-Nancy 1.

Blaudez D, Botton B & Chalot M (2000a) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology 146: 1109-1117.

Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert JV, Ahonen-Jonnarth U, Finlay R, Botton B & Chalot M (2000b) Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*. Mycol. Res. 104: 1366-1371.

Blaudez D, Turnau K, Schützendübel A, Godbold DL, Ahonen-Jonnarth U, Botton B, Chalot M & Finlay RD (2000c) Heavy metal concentrations in fungal fruit bodies at six sites polluted with heavy metals. Non publié.

Boguski MS, Lowe TM & Tolstoshev CM (1993) dbEST – database for "expressed sequence tags". Nature Genetics 4: 332-333.

Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. Plant and Soil 134: 189-207.

Bolan NS, Robson AD & Barrow NJ (1987) Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the availability of iron phosphates to plants. Plant and Soil 99: 401-410.

Bollard EG (1983) Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition. Dans "Inorganic plant nitrition" Edité par Läuchli A & Bieleski RL. Springer-Verlag, Berlin.

Botton B & Chalot M (1995) Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizas. Dans "Mycorrhizas: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology". Edité par Varma A & Hock B. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 325-363.

Botton B & Chalot M (1999) Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizas. Dans "Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology". Edité par Varma A & Hock B. Springer-Verlag, Berlin. 2ème édition. pp. 333-372.

Bouchez D & Höfte H (1998) Functional genomics in plants. Plant Physiology 118: 725--732.

Bourrelier P-H & Berthelin J (1998) Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. Rapport n°42 de l'Académie des Sciences. 440 pages.

Bowtell DDL (1999) Options available -from start to finish- for obtaining expression data by microarray.Nature Genetics supplement 21: 25-32.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilising the principle of protein-dye-binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254-19.

Bradshaw AD (1984) Adaptation of plants to soils containing toxic metals – a test for conceit. Origins and development of adaptation. Pitman Books, Londres. pp. 4-19.

Brandes B, Godbold DL, Kuhn AJ & Jentschke G (1998) Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. New Phytologist 140: 735-743.

Bremner I (1987) Nitritional and physiological significance of metallothionein. Experientia 52 (Suppl.): 81-107.

Brennan RJ & Schiestl RH (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. Mutation Research 256: 171-178.

Brosuis J, Erfle M & Storella J (1985) Spacing of the –10 and –35 regions in the tac promoter. Journal of Biological Chemistry 260: 3539-3541.

Brown MS & Bethlenfalvay GJ (1988) The *Glycine, Glomus, Rhizobium* symbiosis. VII. Photosynthetic nutrient use efficiency in nodulated, mycorrhizal soybeans. Plant Physiology 86: 1292-1297.

Brown MT & Wilkins DA (1985) Zinc tolerance of *Amanita* and *Paxillus*. Transactions of the British Mycological Society 84: 367-369.

Brown SL, Chaney RL, Angle JS & Baker AJM (1994) Zinc and cadmium uptake by *Thlaspi caerulescens* and *Silene vulgaris* in relation to soil metals and soil pH. Journal of Environmental Quality 23: 1151-1157.

Brownlee C, Duddridge JA, Malibari A & Read DJ (1983) The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in assimilate and water transport. Plant and Soil 71: 433-443.

Brun A, Chalot M, Finlay RD & Söderström B (1995). Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* (Roth.). I. Dynamics of mycorrhiza formation. New Phytologist 129 : 487-493.

Brundrett MC (1991) Mycorrhizas in natural ecosystems. Advances in Ecological Research 21: 171-313.

Brundrett MC, Piché Y & Peterson RL (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Canadian Journal of Botany 62: 2128-2134.

Brundrett MC, Piché Y & Peterson RL (1985) A developmental study of early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza development. Canadian Journal of Botany 63: 184-194.

Bucher P & Bairoch A (1994) A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. Proceedings of the 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology 2: 53-61.

Bucking H & Heyser W (1994) The effect of ectomycorrhizal fungi on Zn uptake and distribution in seedlings of *Pinus sylvestris* L. Plant and Soil 167: 203-212.

Burgeff H (1961) *Mikrobiologie des Hochmoores*. Edité par Fischer G, Stuttgart, Germany, p. 197.

Butt TR & Ecker DJ (1987) Yeast metallothionein and applications in biotechnology. Microbiological Reviews 51: 351-364.

Butt TR, Sternberg EJ, Gorman JA, Clark P, Hamer D, Rosenberg M & Crooke ST (1984) Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 81: 3332-3337.

Cairney JWG & Smith SE (1992) Influence of intracellular phosphorus concentration on phosphate absorption by the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Mycological Research 96: 673-676.

Cakmak I & Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiologia Plantarum 83: 463-468.

Cardinaels C, Put C, Van Assche F & Clijsters H (1984) The superoxide dismutase as a biochemical indicator, discriminating between zinc and cadmium toxicity. Archives Internationales de Physiologie et Biochimie 92: 27-28.

Cathelain M, Friant G & Olie JL (1981) Les eaux de ruissellement des chaussées autoroutières: évaluation des charges de pollution. Bellutin de Liaison du Laboratoire des Ponts et Chaussées 116: 9-24.

Celis JE, Kruhøffer M, Gromova I, Frederiksen C, Østergaard M, Thykjaer T, Gromov P, Yu J, Pálsdóttir H, Magnusson N & Ørntoft TF (2000) Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. Plant Physiology 73: 844-848.

Chalot M & Brun A (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS Microbiology Review 22: 21-44.

Chalot M, Brun A, Khalid A, Dell B, Rohr R & Botton B (1990) Occurrence and distribution of aspartate aminotransferases in spruce and beech ectomycorrhizas. Canadian Journal of Botany 68: 1756-1762.

Chalot M, Stewart GR, Brun A, Martin F & Botton B (1991) Ammonium assimilation by spruce-*Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. New Phytologist 119: 541-550.

Chan PC, Peller OG & Kesner L (1982) Copper(II)-catalysed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membranes. Lipids 17: 331-337.

Chaudri AM, Allain CMG, Barbosa-Jefferson VL, Nicholson FA, Chambers BJ & McGrath SP (2000) A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. Plant and Soil 221: 167-179.

Chaussod (1996) La qualité biologique des sols: évaluation et implications. Etude et gestion des sols, numéro spécial. pp. 3, 4, 261-278.

Chen JJ, Rowley JD & Wang SM (2000) Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 349-353.

Chen LM, Lin CC & Kao CH (2000) Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H_2O_2 level, and cell wall peroxidase activity in roots. Botanical Bulletin Academy Singapour 41: 99-103.

Chen X-Y & Hampp R (1993) Sugar uptake by protoplasts of the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist 125: 601-608.

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

Chetverin AB & Kramer FR (1994) Oligonucleotide arrays: new concepts and possibilities. Biotechnology 12: 1093-1099.

Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R & Childs G (1999) Making and reading microarrays. Nature genetics 21: 15-19.

Chia LS, Mayfield CI & Thompson JE (1984) Simulated acid rain induces lipid peoxydation and membrane damage in foliage. Plant, Cell and Environment 7: 333-338.

Chien A, Edgar DB & Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology 127: 1550-1557.

Chrestensen CA, Starke DW & Mieyal JJ (2000) Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. Journal of Biological Chemistry 275: 26556-26565.

Christie NT & Costa M (1984) In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cell: interactions with membranes, glutathione, metallothionein and DNA. Biological Trace Element Research 6: 139-158.

Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-486.

Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP & Schroeder JI (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 12043-12048.

Clemens S, Kim EJ, Neumann D & Schroeder JI (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. The EMBO Journal 18: 3325-3333.

Clijsters H & Van Assche F (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosynthesis Research 7: 31-40.

Clijsters H, Cuypers A & Vangronsveld J (1999) Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. Zeitschrift für Naturforschung 54c: 730-734.

Cohen BL (1980) Transport and utilization of proteins by fungi. Dans "Microorganisms and nitrogen sources". Edité par Payne JW. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England. pp. 411-430.

Colpaert JV & Van Assche JA (1992) Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. Plant and Soil 143: 201-211.

Colpaert JV & Van Assche JA (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. New Phytologist 123: 325-333.

Conjeaud C, Scheromm P & Mousain D (1996) Effects of phosphorus fertilisation and ectomycorrhizal infection on the carbon balance in maritime pine seedlings (*Pinus pinaster* Soland. in Ait.). New Phytologist 133: 345-351.

Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR & Kung C (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology 12: 3678-3688.

Cooke MA, Widden P & O'Halloran I (1993) Development of vesicular-arbuscular mycorrhizae in sugar maple (*Acer saccharum*) and effects of base-cation ammendment on vesicle and arbuscule formation. Canadian Journal of Botany 71: 1421-1426.

Coppenet M (1981) Copper accumulation in Britany soils through enriched pigslurry; phytotoxic risks. Dans "Copper in animal wastes and sewage sludge". Edité par Reidel publishing Company. London. pp. 154-161.

Cordier C, Gianinazzi S & Gianinazzi-Pearson V (1996) Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. Plant and Soil 185: 223-232.

Corey EJ, Cheng H, Baker CH, Matsuda SPT, Li D & Song X (1997) Studies on the substrate binding segments and catalytic action of lanosterol synthase. Affinity labeling with carbocations derived from mechanism-based analogs of 2,3-oxidosqualene and site-directed mutagenesis probes. Journal of American Chemical Society 119: 1289-1296.

Costa G, Michaut JC & Morel JL (1994) Influence of cadmium on water relations and gas exchanges in phosphorus deficient *Lupinus albus* L. Plant Physiology and Biochemistry 32: 105-114.

Cox G & Sanders FE (1974) Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. New Phytologist 73: 901-912.

Crine M (1993) Le traitement des eaux industrielles chargées en métaux lourds. Tribune de l'eau 561: 3-19.

Cromer DAN (1935) The significance of the mycorrhiza of *Pinus radiata*. Bulletin of Forest Bureau of Australia 16: 1-19.

Culotta VC, Klomp LWJ, Strain J, Casareno RLB, Krems B & Gitlin JD (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry 272: 23469-23472.

Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR & Briat J-F (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. Biochemical Journal 347: 749-755.

Davies FT, Potter JR & Linderman RG (1992) Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. Journal of Plant Physiology 139: 289-294.

Davis BJ (1964) Discelectrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Annals of New-York Academy of Sciences 121: 404-427.

De Filippis LF (1979) The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 92: 39-49.

De Knecht JA, Koevoets PLM, Verkleij JAC & Ernst WHO (1992) Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene vulgaris* (Moenech) Garcke. New Phytologist 122: 681-688.

De Knecht JA, van Baren N, Ten Bookum WM, Wong Fong Sang HW, Koevoets PLM, Schat H & Verkleij JAC (1995) Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Plant Science 106: 9-18.

De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R & Schat H (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. Plant Physiology 98: 853-858.

Dehne HW (1982) Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72: 1115-1119.

Del Rio LA, Lyon DS, Olah I, Glick B & Salin ML (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. Planta 158: 216-224.

Del Val C, Barea JM & Azcon-Aguilar C (1999) Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. Applied Soil Ecology 11: 261-269.

Delas J (1963) La toxicité du cuivre accumulé dans les sols. Agrichimica 7: 258-288.

Delhaize E & Ryan PR (1995) Aluminium toxicity and tolerance in plants. Plant Physiology 107: 315-321.

Delhaize E, Robinson NJ & Jackson PJ (1989) Effects of cadmium on gene expression in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive *Datura innoxia* cells. Plant Molecular biology 12: 487-497.

Delhaize E, Ryan PR & Randall PJ (1993) Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminium-stimulated excretion of malic acid from root apices. Plant Physiology 103: 695-702.

Denny HJ & Ridge I (1995) Fungal slime and its role in the mycorrhizal amelioration of zinc toxicity to higher plants. New Phytologist 130: 251-257.

Denny HJ & Wilkins DA (1987) Zinc tolerance in *Betula* spp. I. Effect of external concentration of zinc in growth and uptake. New Phytologist 106: 517-524.

DeRisi JL, Iyer VR & Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 278: 680-686.

DeSaizieu A, Certa U, Warrington J, Gray C, Keck W & Mous J (1998) Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. Nature Biotechnology 16: 45-48.

Desprez T, Amselem J, Caboche M & Hofte H (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. Plant Journal 14: 643-652..

Di Cagno R, Guidi L, Stefani A & Soldatini GF (1999) Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. New Phytologist 144: 65-71.

Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, & Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridation: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 6025-6030.

Díaz G, Azcon-Aguilar C & Honrubia M (1996) Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. Plant and Soil 180: 241-249.

Ding AH & Chan PC (1984) Singlet oxygen in copper-catalysed lipid peroxidation in erythrocyte membranes. Lipids 19: 278-284.

Dixon RK (1988) Response of ectomycorrhizal *Quercus rubra* to soil cadmium, nickel and lead. Soil Biology and Biochemistry 20: 555-559.

Dixon RK & Buschena CA (1988) Response of ectomycorrhizal *Pinus bankriana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. Plant and Soil 105: 265-271.

Dower WJ, Miller JF & Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research 16: 6127-6145.

Duchesne LC, Peterson RL & Ellis BE (1988a) Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Botany 66: 558-562.

Duchesne LC, Peterson RL & Ellis BE (1988b) Pine root exudate stimulates antibiotic synthesis by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phytologist 108: 471-476.

Duchesne LC, Peterson RL & Ellis BE (1989) The time-course of disease suppression and antibiosis by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phytologist 111: 693-698.

Duddridge JA (1980) A comparative ultrastructural analysis of a range of mycorrhizal associations. PhD Thesis, University of Sheffield, UK.

Duddridge JA & Read DJ (1984) The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. II. Ectomycorrhizal development on pine in vitro. New Phytologist 96: 575-582.

Duddridge JA, Finlay RD, Read DJ & Söderström B (1988) The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. III. Ultrastructural and autoradiographic analysis of inter-plant carbon distribution through intact mycelial systems. New Phytologist 108: 183-188.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P & Trent (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. Nature genetics 21: 10-14.

Dukan S, Turlin E, Biville F, Bolbach G, Touati D, Tabet JC & Blais JC (1998) Coupling 2D SDS-PAGE with CNBr cleavage and MALDI-TOFMS: a strategy applied to the identification of proteins induced by a hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*. Annals of Chemistry 70: 4433-4440.

Duplessis S (2001) Caractérisation par ingénierie génomique des profils d'expression génique de *Pisolithus tinctorius* et d'*Eucalyptus globulus* au cours du développement de la symbiose ectomycorhizienne. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1.

Durand N, Debaud JC, Casselton LA & Gay G (1992) Isolation and preliminary characterization of 5-fluoroindole-resistant and IAA-overproducer mutants of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. New Phytologist 121: 545-553.

Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H & Raskin I (1995) Rhizofiltration - the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. Environmental Science and Technology 29: 1239-1245.

Dutton MV & Evans CS (1996) Oxalate production by fungi – its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. Canadian Journal of Microbiology 42: 881-895.

Duxbury T (1985) Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. Advances in Microbial Ecology 8: 185-235.

Duxbury T (1986) Microbes and heavy metals: an ecological overview. Microbiological Sciences 3: 330-333.

Echevarria G, Vong PC, Valentin-Ranc C & Morel JL (1995) Availability of ^{99}Tc to ryegrass grown on agricultural soils. Dans "Nuclear techniques in soil-plant studies for sustainable agriculture and environmental preservation". Proceedings Symposium IAEA-FAO, Vienne, p. 561.

Ecker JR & Davis RW (1987) Plant defense genes are regulated by ethylene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 84: 5202-5206.

Eckhardt U, Marques AM & Buckhout TJ (2001) Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. Plant Molecular Biology 45: 437-448.

Eisen JA (1998) Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. Genome Research 8: 163-167.

Eissenstat DM, Graham JH, Syvertsen JP & Drouillard DL (1993) Carbon economy of sour orange in relation to mycorrhizal colonization and phosphorus status. Annals of Botany 71: 1-10.

Ek M, Ljungquist PO & Stenström E (1983) Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. New Phytologist 94: 401-407.

El-Kherbawy M, Agle JS, Heggo A & Chaney RL (1989) Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Biology and Fertility of Soils 8: 61-65.

Ellenberg H (1988) Vegetation Ecology of Central Europe. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Elstner EF (1984) Schadstoffe die über dir Luft zugeführt werden. Dans "Pflanzentoxicologie". Edité par Hock B & Elstner EF. Bibliographisches Institut, Mannheim. pp. 67-94.

Engler A & Prantl K (1897) Die Natürlichen Pflanzenfamilien vol. IV(i). Edité par Engelmann W, Leipzig, Germany.

Etzold T, Ulyanov A & Argos P (1996) SRS: information retrieval system for molecular biology data banks. Methods in Enzymology 266: 114-128.

Ewers U (1991) Standards, guidelines, and legislative regulations concerning metals and their ompounds. Dans "Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance". Edité par Merian E. VCH, Weinheim. pp. 687-711.

Fang W-C & Kao CH (2000) Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. Plant Science 158: 71-76.

Fay P, Mitchell DT & Osborne BA (1996) Photosynthesis and nutrient-use efficiency of barley in response to low arbuscular mycorrhizal colonisation and addition of phosphorus. New Phytologist 132: 425-433.

Feinberg AP & Vogelstein B (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochemistry 132: 6-13.

Feinberg AP & Vogelstein B (1984) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. Analytical Biochemistry 137: 266-267.

Fenik SI, Solodushko VG, Trofimyak TB & Blume YB (1997) Cadmium-tolerance in *Nicotiana plumbaginifolia* depends on synthesis of both phytochelatin and cadmium-binding proteins. Journal of Experimental Botany 48: 99.

Fergusson JE (1990) The heavy elements. Chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press, Oxford (Angleterre).

Fields S & Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340: 245-246.

Fields S, Kohara Y & Lockhart DJ (1999) Functional genomics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96: 8825-8826.

Finlay RD & Söderström B (1989) Mycorrhizal mycelia and their role in soil and plant communities. Dans "Development in Plant and Soil Sciences vol. 39, Ecology of Arable Land, Perspectives and Challenges". Edité par Clarholm M & Bergström L. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 139-148.

Finlay RD & Söderström B (1992) Mycorrhiza and carbon flow to the soil. Dans "Mycorrhiza Functioning". Edité par Allen M. Chapman and Hall, London, UK. pp. 134-160.

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

Fischer A, Saedler H & Theissen G (1995) Restriction fragment length polymorphism-coupled domain-directed display: a highly efficient technique for expression analysis of multigene families. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92: 5331-5335.

Fitter AH (1985) Functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas under field conditions. New Phytologist 99: 257-265.

Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Sryer L, Tsai Lu & Solas D (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 251: 767-773.

Fogarty R.V. & Tobin J.M. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. Enzyme and Microbial Technology 19: 311-317.

Fogel S & Welch JW (1982) Tandem genes amplification mediates copper resistance in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 79: 5342-5346.

Fogel S, Welch JW & Karin M (1983) Gene amplification in yeast; CUP1 copy number regulates copper resistance. Current Genetics 7: 1-9.

Fox TM & Guerinot ML (1998) Molecular biology of cation transport in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 669-696.

France RC & Reid CPP (1979) Absorption of ammonium and nitrate by mycorrhizal and non mycorrhizal roots of pine. Dans "Root Physiology and Symbiosis". Edité par Riedacker A & Gagnaire-Michard J. INRA, Nancy. pp. 336-345.

Francesconi KA & Edmonds JS (1994) Biotransformation of arsenic in the marine environment. Dans "Arsenic in the environment. Part 1. Cycling and characterization". Edité par Nriagu JO. Wiley, New-York. pp. 221-261.

Francke HL (1934) Beiträge zur Kenntnis der Mykorrhiza von *Monotropa hypopitys* L. Analyse und Synthese der Symbiose. Flora (Jena) 129: 1-52.

François J-M (2000) Les puces à ADN: état de l'art et nouveaux concepts. Bulletin de la Société Française de Microbiologie 15: 175-179.

Frank A (1894) Die Bedeutung der Mykorrhiza-pilze für die gemeine Kiefer. Forstwissenschaftliches Centralblatt 16: 185-190.

Frankenberger WT & Poth M (1987) Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. Applied and Environmental Microbiology 53: 2908-2913.

Freedman JH, Ciriolo MR & Peisach J (1989) The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. Journal of Biological Chemistry 264: 5598-5605.

Frey B, Zierold K & Brunner I (2000) Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic sequestration in the fungal mantle of *Picea abies-Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. Plant, Cell and Environment 23: 1257-1265.

Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. Archives of Biochemistry and Biophysics 247: 1-11.

Frohman MA, Dush MK & Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85: 8998-9002.

Fu D, Beeler TJ & Dunn TM (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca^{2+}-sensitive phenotype of csg1 mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu^{2+}-ATPase subfamily. Yeast 11: 283-292.

Fuhrer J (1982) Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiology 70: 162-167.

Fürst P, Hu S, Hackett R & Hamer (1988) Copper activates metallothionein gene transcription by altering the confirmation of a specific DNA binding protein. Cell 55: 705-717.

Furuichi Y & Miura K (1975) A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. Nature 253: 374-375.

Gadd GM (1986) The responses of fungi towards heavy metals. Dans "Microbes in extreme environments". Edité par Herbert RA & Codd GA. Academic Press, London. pp. 83-110.

Gadd GM (1990) Fungi and yeasts for metal binding. Dans "Microbial mineral recovery". Edité par Ehrlich M & Brierley CL, McGraw-Hill, New York. pp. 249-275.

Gadd GM (1992a) Molecular biology and biotechnology of microbial interactions with organic and inorganic heavy metal compounds. Dans "Molecular biology and biotechnology of extremophiles". Edité par Herbert RA & Sharp RJ. Glasgow: Blackie and Sons. pp. 225-257.

Gadd GM (1992b) Metals and microorganims: a problem of definition. FEMS Microbiology Letters 100: 197-204.

Gadd GM (1993) Tansley review N° 47: Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist 124: 25-60.

Gadd GM & Griffiths AJ (1978) Microorganisms and heavy metal toxicity. Microbial Ecology 4: 303-317.

Gadd GM & White C (1989) Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeasts. Dans "Metal-microbes interactions". Edité par Poole RK & Gadd GM. Oxford: IRL Press. pp. 19-38.

Gadd GM, Stewart A, White C & Mowll JL (1984) Copper uptake by whole cells and protoplasts of a wild-type and copper-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters 24: 231-234.

Gallaud I (1905) Etudes sur les mycorhizes endotrophes. Revue Générale de Botanique 17: 5-48, 66-83, 123-135, 223-239, 131-325, 425-433, 479-500.

Galli U, Meier M & Brunold C (1993) Effects of cadmium on non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce seedlings [*Picea abies* (L.) Karst.] and its ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* (Scop. Ex Fr.) Bk. & Br.: Sulphate reduction, thiols and distribution of the heavy metal. New Phytologist 125: 837-843.

Galperin MY & Frishman D (1999) Towards automated prediction of protein function from microbial genomic sequences. Methods in Microbiology 8: 245-263.

Garrill A (1995) Transport. Dans "The Growing Fungus". Edité par Gow NAR & Gadd GM. Chapman and Hall, London, UK. pp. 161-181.

Gaspar T, Goren R & Dubucq M (1978) Citrus leaf abscission. Regulatory role of exogenous auxin and ethylene on peroxidases and endogenous growth substances. Plant, Cell and Environment 1: 225-230.

Gast CH, Jansen E, Bierling J & Haanstra L (1988) Heavy metals in mushrooms and their relationship with soil characteristics. Chemosphere 17: 789-799.

Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B & Debaud JC (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési have increased mycorrhizal activity. New Phytologist 128: 645-657.

Gea L, Normand L, Vian B & Gay G (1994) Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. New Phytologist 128: 659-670.

Gekeler W, Grill E, Winnacker E-L & Zenk MH (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. Archives of Microbiology 150: 197-202.

Gekeler W, Grill E, Winnacker E-L & Zenk MH (1989) Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. Zeitschrift für Naturforschung 44: 361-369.

Gessler A, Schneider S, Weber P, Hanemann U & Rennenberg H (1998) Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N, a comparison between the roots of Norway spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees grown under field conditions. New Phytologist 138: 385-399.

Ghorbanli M, Kaveh SH & Sepehr MF (1999) Effects of cadmium and gibberellin on growth and photosynthesis of *Glycine max*. Photosynthetica 37: 627-631.

Ghosh M, Shen J & Rosen B (1999) Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96: 5001-5006.

Gianinazzi-Pearson V, Gollotte A, Lherminier J, Tisserant B, Franken P, Dumas-Gaudot E, Lemoine M-C, van Tuinen D & Gianinazzi S (1995) Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. Canadian Journal of Botany 73: S256-S532.

Giaquinta RT (1983) Phloem loading of sucrose. Annual Review of Plant Physiology 34: 347-387.

Gildon A & Tinker PB (1983) Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytologist 94: 247-261.

Giller KE, Witter E & McGrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biology and Biochemistry 30:1389-1414.

Gillespie D & Spiegelman S (1965) A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilised on a membrane. Journal of Molecular Biology 12: 829-842.

Gilliland LU, McKinney EC, Asmussen MA & Meagher RB (1998) Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual *Arabidopsis* actin genes. Genetics 149: 717-725.

Glerum DM, Shtanko A & Tzagoloff A (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. Journal of Biological Chemistry 371: 14504-14509.

Godbold DL, Horst WJ, Collins JC, Thurman DA & Marschner H (1984) Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. Journal of Plant Physiology 116: 59-69.

Godbold DL, Jentschke G, Winter S & Marschner P (1998) Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest tress. Chemosphere 36: 757-762.

Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB & Labarre J (1998) The H_2O_2 stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 273: 22480-22489.

Goldman MH, Pezzotti M, Seurinck J & Mariani C (1992) Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. Plant Cell 4: 1041-1051.

Gora L & Clijsters H (1989) Effect of copper and zinc on the ethylene metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. Dans "Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants". Edité par Clijsters H, De Profit M, Marcelle R & van Poucke M. Kluwer Academic, Dordrecht. pp. 219-228.

Goss RW (1960) Mycorrhiza of ponderosa pine in Nebraska grasslands soils. University of Nebraska Agricultural Experiment Station, Research Bulletin No. 192. Nebraska, USA. p. 47.

Gough LP, Shacklette HT & Case AA (1979) Element concentrations toxic to plants, animals and man. U.S. Geological Survey Bulletin 1466. Washington.

Greco MA, Hrab DI, Magner W & Kosman DJ (1990) Cu, Zn superoxide dismutase and copper deprivation and toxicity in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology 172: 317-325.

Grichko VP, Filby B & Glick BR (2000) Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. Journal of Biotechnology 81: 45-53.

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

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

Grill E, Gekeler W, Winnacker E-L & Zenk MH (1986) Homophytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-GSH containing Fabales. FEBS Letters 205: 47-50.

Grill E, Winnacker E-L & Zenk MH (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 84: 439-443.

Grill E, Thumann J, Winnacker E-L & Zenk MH (1988) Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculaion of cell cultures in standard media. Plant Cell Report 7: 375-378.

Grill E, Löffler S J, Winnacker EL & Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesised from glutathione with a specific _-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatine synthase). Proceedings of the National Academy of Science of the USA 86: 6388-6842.

Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML & Eide D (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 7220-7224.

Gruber A & Zingales B (1995) Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. BioTechniques 19: 28-29.

Gruhn CM & Miller OK (1991) Effect of copper on tyrosinase activity and polyamine content of some ectomycorrhizal fungi. Mycological Research 95: 268-272.

Guerinot ML & Eide D (1999) Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. Current Opinion in Plant Biology 2: 244-249.

Gunsé B, Poschenrieder C & Barceló J (2000) The role of ethylene metabolism in the short-term responses to aluminium by roots of two maize cultivars different in Al-resistance. Environmental and Experimental Botany 43: 73-81.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR & Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Molecular and Cellular Biology 19: 1720-1730.

Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB & Cobbett CS (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Plant Cell 11: 1153-1163.

Haab BB, Dunham MJ & Brown PO (2001) Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. Genome Biology 2: research 0004.1-0004.13

Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y & Iida S (1997) Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. Biochemical and Biophysical Research Communications 234: 516-521.

Halliwell B & Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemistry 219: 1-14.

Hamer DH (1986) Metallothionein. Annual review of Biochemistry 55: 913-951.

Hampp R, Schaeffer C, Wallenda T, Stülten C, Johann P & Einig W (1995) Changes in carbon partitioning or allocation due to ectomycorrhiza formation: biochemical evidence. Canadian Journal of Botany 73(Suppl. 1): S548-S556.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology 166: 557-580.

Harley JL (1959/1969) *The Biology of Mycorrhiza.* Edité par Hill L., London, UK.

Harley JL (1989) The significance of mycorrhiza. Mycological Research 92: 129-139.

Harley JL & Harley EL (1987) A check-list of mycorrhiza in the British flora. New Phytologist 105: 1-102.

Harley JL & Smith SE (1983) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London, UK.

Harrison MJ (1996) Molecular approaches to the study of nutrient transfer in vesicular arbuscular mycorrhizal. Dans "Mycorrhizas in Integrated Systems: From Genes to Plant Development". Edité par Azcón-Aguilar C & Barea JM. European Commission, Brussels, Belgium. pp. 238-240.

Harrison MJ & Van Buuren ML (1996) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. Nature 378: 626-629.

Hartley J, Cairney JWG & Meharg AA (1997) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment ? Plant and Soil 189: 303-319.

Hartley J, Cairney JWG & Meharg AA (1999) Cross-colonization of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in the presence of inhibitory levels of Cd and Zn. New Phytologist 142: 141-149.

Hartley-Whitaker J, Cairney JWG & Meharg AA (2000a) Sensitivity to Cd or Zn of host and symbiont of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) seedlings. Plant and Soil 218: 31-42.

Hartley-Whitaker J, Cairney JWG & Meharg AA (2000b) Toxic effects of cadmium and zinc on ectomycorrhizal colonization of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from soil inoculum. Environmental Toxicology and Chemistry 19: 694-699.

Haselwandter K, Bobleter O & Read DJ (1990) Degradation of ^{14}C-labelled lignin and dehydropolymer of coniferyl alcohol by ericoid and ectomycorrhizal fungi. Archives in Microbiology 153: 352-354.

Hatey F, Tosser-Klopp G, Clouscard-Martinato C, Mulsant P & Gasser F (1998) Expressed sequence tags for genes: a review. Genetics Selection Evolution 30: 521-541.

Hawkins HJ & George E (2001) Reduced ^{15}N-nitrogen transport through arbuscular mycorrhizal hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. Annals of Botany 87: 303-311.

Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouzé P & Brunak S (1996) Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. Nucleic Acids Research 24: 3439-3452.

Hegedüs A, Erdei S & Horváth G (2001) Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Science 160: 1085-1093.

Henikoff S & Henikoff JG (1994) Protein family classification based on searching a database of blocks. Genomics 19: 97-107.

Herrera-Estrella L, Guevara-García A & López-Bucio J (1999) Heavy metal adaptation. Dans "Embryonic Encyclopedia of Life Sciences". Edité par Macmillan Publishers.

Hershey HP, Colbert JT, Lissemore JL, Barker RF & Quail PH (1984) Molecular cloning of cDNA for *Avena* phytochrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 81: 2332-2336.

Hickley DA & McNeilly T (1976) Competition between metal tolerant and normal plant populations – a field experiment on normal soil. Evolution 29: 458.

Hieter P & Boguski M (1997) Functional genomics: it's all how you read it. Science 278: 601-602.

Hilbert JL & Botton B (1986) Changes in the pattern of proteins synthesis during differenciation of the Ascomycetes *0.* Physiologia Plantarum 68: 403-409.

Hilbert JL & Martin F (1988) Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes in the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in *the Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. New Phytologist 110: 339-346.

Hillier L, LennonG, Becker M, Bonaldo MF, Chiapelli B, Chissoe S, Dietrich N, Dubuque T, Favello A, Gish W, *et al.* (1996) Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. Genome Research 6: 807-828.

Himelblau E & Amasino RM (2000) Delivering copper within plant cells. Current Opinion in Plant Biology 3: 205-210.

Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L & Amasino RM (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. Plant Physiology 117: 1227-1234.

Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A & Ecker JR (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. Cell 97: 383-393.

Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP & Sussman MR (1998) A role for AKT1 potassium channel in plant nutrition. Science 280: 918-921.

Ho I & Trappe JM (1973) Translocation of ^{14}C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. Nature 244: 30-31.

Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR & Cobbett CS (1995a) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. Plant Physiology 107: 1059-1066.

Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB & Cobbett CS (1995b) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 107: 1067-1073.

Huang JW, Pellet DM, Papernik LA & Kochian LV (1996) Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and –resistant wheat cultivars. Plant Physiology 110: 561-569.

Hubank M & Schatz DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Research 22: 5640-5648.

Hue NV, Craddock GR & Adams F (1986) Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. Soil Sciences Society of America Journal 50: 28-34.

Imai K, Obata H, Shimizu K & Komiya T (1996) Conversion of glutathione into cadystins and their analogs catalysed by carboxypeptidase Y. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 60: 1193-1194.

Inouhe M, Hiyama M, Tohoyama H, Joho M & Murayama T (1989) Cadmium-binding protein in a cadmium-resistant strain of Saccharomyces cerevisiae. Biochemica et Biophysica Acta 993: 51-55.

Jacob C, Courbot M, Brun A, Steinman HM, Jacquot J-P, Botton B & Chalot M (2001) Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. European Journal of Biochemistry 268: 3223-3232.

James BD & Higgins SJ (1985) Nucleic acid hybridization. IRL Press Ltd., Oxford.

Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14: 1511-1527.

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

Jayachandran K, Schwab AP & Hetrick BAD (1992) Mineralization of organic phosphorus by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem 24: 897-903.

Jennings DH (1995) The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Jentschke G & Godbold DL (2000) Metal toxicity and ectomycorrhizas. Physiologia Plantarum 109: 107-116.

Jentschke G, Winter S & Godbold DL (1999) Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. Tree Physiology 19: 23-30.

Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Becker S & Godbold DL (2000) The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. Plant and Soil 220: 243-246.

Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH & Godbold DL (2001a) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium in translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phytologist 149: 327-337.

Jentschke G, Godbold DL & Brandes B (2001b) Nitrogen limitation in mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*) seedlings induced mycelial foraging for ammonium: implications for Ca and Mg uptake. Plant and Soil (sous presse).

Johnson CR (1984) Phosphorus nutrition on mycorrhizal colonisation, photosynthesis, growth and nutrient composition of *Citrus aurantium*. Plant and Soil 80: 35-42.

Joho M, Sukenobu Y, MurEgashira E & Murayama T (1983) The correlation between Cd^{2+} sensitivity and Cd^{2+} uptake in the strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Plant and Cell Physiology 24: 389-394.

Joner EJ & Leyval C (1997) Uptake of ^{109}Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae/Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. New Phytologist 135: 353-360.

Joner EJ, Ravnskov S & Jakobsen I (2000) Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate. Biotechnology Letters 22: 1705-1708.

Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant and Soil 205: 25-44.

Jones DL & Darrah PR (1994) Role of root derived organic-acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant and Soil 166: 247-257.

Jones JT & Harrower BE (1998) A comparison of the efficiency of differential display and cDNA-AFLPs as tools for the isolation of differentially expressed parasite genes. Fundamental and Applied Nematology 21: 81-88.

Jones MD & Hutchinson TC (1986) The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. New Phytologist 102: 429-442.

Jones MD & Hutchinson TC (1988a) The effects of nickel and copper on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. Canadian Journal of Botany 66: 119-124.

Jones MD & Hutchinson TC (1988b) Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. I. Effects on growth, photosynthesis, respiration and transpiration. New Phytologist 108: 451-459.

Junghans K & Straube G (1991) Biosorption of copper by yeasts. Biology of Metals 4: 233-237.

Kabata-Pendias A & Pendias H (1992) Trace elements in soils and plants. 2ème édition, CRC Press, 365 pages.

Kägi JHR & Kojima Y (1987) Chemistry and biochemlistry of metallothioneins. Experientia 52: 25-61.

Kägi JHR & Schäffer Y (1988) Biochemistry of metallothioneins. Biochemistry 27: 8509-8515.

Kalac P & Svoboda L (2000) A review of trace element concentrations in edile mushrooms. Food Chemistry 69: 273-281.

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

Kampfenkel K, Kushnir S, Babiychuk E, Inzé D & Van Montagu M (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. Journal of Biological Chemistry 270: 28479-28486.

Kappus H (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. Dans "Oxidative stress". Edité par Sies H, Academic Press, Londres. pp. 273-310.

Karagiannidis N & Nikolaou N (2000) Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Pb and Cd) uptake, growth, and chemical composition of *Vitis vinifera* L. (cv. Razaki). American Journal of Enology and Viticulture 51: 269-275.

Karin M (1985) Metallothioneins: proteins in search of function. Cell 41: 9-10.

Karin M, Najarian R, Haslinger A, Valenzuela P, Welch J & Fogel S (1984) Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: The CUP1 locus of yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 81: 337-341.

Keltjens WG & Van Beusichem ML (1998) Phytochelatins as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: single metal effects of copper and cadmium. Journal of Plant Nutrition 21: 635-648.

Kempin SA, Liljegren SJ, Block LM, Rounsley SD, Lam E & Yanofsky MF (1997) Inactivation of the *Arabidopsis AGL5* MADS-box gene by homologous recombinaison. Nature 389: 802.

Kendrick B (1992) The fifth Kingdom. Mycologue Publication Ltd, Waterloo.

Kennedy CD & Gonsalves FAN (1989) The action of divalent Zn, Cd, Hg, Cu and Pb ions on the ATPase activity of plasma membrane fraction isolated from roots of *Zea mays*. Plant and Soil 117: 167-175.

Kierans M, Staines AM, Bennett H & Gadd GM (1991) Silver tolerance and accumulation in yeasts. Biology of Metals 4: 100-106.

Killham K & Firestone MK (1983) Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. Plant and Soil 72: 39-48.

Klapheck S, Chrost B, Strake J & Zimmermann H (1992) γ-Glutamyl-cysteinyl-serine: a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae. Botanica Acta 105: 174-179.

Klapheck S, Schlunz S & Bergmann L (1995) Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. Plant Physiology 107: 515-521.

Klose J & Kobalz U (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis 16: 1034-1059.

Kneer R & Zenk MH (1992) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. Phytochemistry 31: 2663-2667.

Knight WG, Allen MF, Jurinak JJ & Dudley LM (1989) Elevated carbon dioxide and solution phosphorus in soil with vesicular-arbuscular mycorrhizal western wheatgrass. Soil Sciences Society of America Journal 53: 1075-1082.

Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46: 237-260.

Kondo N, Isobe M, Imai K & Goto T (1985) Synthesis of metallothionein-like peptides Cadystin A and B occurring in a fission yeast, and their isomers. Agricultural Biological Chemistry 49: 71-83.

Kope HH & Fortin JA (1990) Antifungal activity in culture filtrates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Canadian Journal of Botany 68: 1254-1259.

Kope HH, Tsantrizos YS, Fortin JA & Ogilvie KK (1991) *p*-Hydroxybenzoylformic acid and (R)-(—)-*p*-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arrhizus*. Canadian Journal of Microbiology 37: 258-264.

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

Kozian DH & Kirschbaum BJ (1999) Comparative gene-expression analysis. Trends in Biotechnology 17: 73-78.

Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM & Smith AC (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. Nature 379: 635-638.

Kubota H, Sato K, Yamada T & Maitani T (1995) Phytochelatins (class III metallothioneins) and their desglycyl peptides induced by cadmium in normal root cultures of *Rubia tinctorum* L. Plant Science 106: 157-166.

Kuhn E (2001) From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. Annals of Botany 87: 139-155.

Kumar KS, Rowse C & Hochstein P (1978) Copper-induced generation of superoxide in human red cell membrane. Biochemical and Biophysical Research Communications 83: 587-592.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-684.

Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M & Vangronsveld J (1998) Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). Plant and Soil 200: 241-250.

Laiho O (1965) Further studies on the ectendotrophic mycorrhiza. Acta Forestalia Fennica 79: 1-35.

Lamhamedi MS & Fortin JA (1991) Genetic variations of ectomycorrhizal fungi: extramatrical phase of *Pisolithus* sp. Canadian Journal of Botany 69: 1927-1934.

Lamhamedi MS, Bernier PY & Fortin JA (1992) Hydraulic conductance and soil water potential at the soil root interface of *Pinus pinaster* seedlings inoculated with different dikaryons of *Pisolithus* sp. Tree Physiology 10: 231-244.

Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW & van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. TRENDS in Ecology and Evolution 16(5): 248-254.

Lane B, Kajoika R & Kennedy R (1987) The wheatgerm E_c protein is a zinc-containing metallothionein. Biochemistry and Cell Biology 65: 1001-1005.

Lane TW & Morel FM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 4627-4631.

Lapeyrie F (1990) The role of ectomycorrhizal fungi in calcareous soil tolerance by "symbiocalcicole" woody plants. Annales des Sciences Forestières 21: 579-589.

Lapeyrie F, Ranger J & Vairelles D (1991) Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. Canadian Journal of Botany 69: 342-346.

Larsson M, Gräslund S, Yuan L, Brundell E, Uhlén M, Höög C & Ståhl S (2000) High-throughput protein expression of cDNA products as a tool in functional genomics. Journal of Biotechnology 80: 143-157.

Lasat MM, Baker AJM & Kochian LV (1996) Physiological characterization of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. Plant Physiology 112: 1715-1722.

Law R & Lewis DH (1983) Biotic environments and the maintenance of sex – some evidence from mutualistic symbiosis. Biological Journal of the Linnean Society 10: 249-276.

Leake JR (1994) The biology of myco-heterotrophic "saprophytic" plants. New Phytologist 127: 171-216.

Ledakis P, Tanimura H & Fojo T (1998) Limitations of differential display. Biochemical and Biophysical Research Communications 251: 653-656.

Lee FJ & Hassan HM (1985) Biosynthesis of superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*: effects of paraquat and copper. Free Radical Biology and Medicine 1: 319-325.

Lee KC, Cunningham BA, Paulsen GM, Liang GH & Moore RB (1976) Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. Physiologia Plantarum 36: 4-6.

Lehrach H, Diamond D, Wozney JM & Boedtker K (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16: 4743-4751.

Leita L, Contin M & Maggioni A (1991) Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Science 77: 139-147.

Lemaire S, Keryer E, Stein M, Schepens I, Issakidis Bourguet E, Gerard Hirne C, Miginiac Maslow M & Jacquot JP (1999) Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology 120: 773-778.

Lennon GG & Lehrach H (1991) Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. Trends in Genetics 7: 314-317.

LePage BA, Currah RS, Stockey RA & Rothwell GW (1997) Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. American Journal of Botany 84: 410-412.

Lerch K & Beltramini M (1983) *Neurospora* copper metallothionein: molecular strucutre and biological significance. Chemica Scripta 21: 109-115.

Lewis GN (1923) Valence and the Structure of Molecules. The Chemical Catalogue Co., New York, USA.

Leyval C & Berthelin J (1991) Weathering of a mica by roots and rhizospere microorganisms of pine. Soil Sciences Society of America Journal 55: 1009-1016.

Leyval C, Berthelin J, Schontz D, Weissenhorn I & Morel JL (1991) Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu, Zn and Cd applied as mineral salts or sewage sludge. Dans "Heavy metals in the environment". Edité par Farmer JG. CEP Consultants, Edinburgh. pp. 204-207.

Leyval C, Turnau K & Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7: 139-153.

Li L & Kaplan J (1998) Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. Journal of Biological Chemistry 273: 22181-22187.

Li XL, George E & Marschner H (1991) Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcerous soil. Plant and Soil 136: 41-48.

Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ & Rea PA (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. Journal of Biological Chemistry 271: 6509-6517.

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

Liang P & Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 14: 967-971.

Lin CM & Kosman DJ (1990) Copper uptake in wild type and copper metallothionein-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 265: 9194-9200.

Lindberg S (1990) Aluminium interactions with K^+ ($^{86}Rb^+$) and $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in three cultivars of sugar beet (*Beta vulgaris*). Physiologia Plantarum 79: 275-282.

Lindberg S & Wingstrand G (1985) Mechanism for Cd^{2+} inhibition of ($K^+ + Mg^{2+}$) ATPase activity and K^+ ($^{86}Rb^+$) uptake join roots of sugar beet (*Beta vulgaris*). Physiologia Plantarum 63: 181-186.

Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM Yates JR (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. Nature Biotechnology 17: 676-682.

Lipshutz RJ, Morris MS, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R & Fodor SPA (1995) Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. BioTechniques 19: 442-447.

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

Lockhart DJ & Winzeler EA (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature 405: 827-836.

Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittman M, Wang C, Kobayashi M, Horton H & Brown EL (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nature Biotechnology 14: 1675-1680.

López-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L (2000) Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Science 160: 1-13.

Loth FG & Höfner W (1995) Einfluss der VA-Mykorrhiza auf die Schwermetallaufnahme von Hafer (*Avena sativa* L.) in Abhängigheit vom Kontaminationsgrad der Böden. Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bodenkunde 158: 339-345.

Lu YP, Li ZS & Rea PA (1997) AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94: 8243-8248.

Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E & Rea PA (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. Plant Cell 10: 267-282.

Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Büssow K, Lehrach H & Walter G (1999) Protein microarrays for gene expression and antibody screening. Analytical Biochemistry 270: 103-111.

Lupotto E, Gulli M & Raho G (1995) Espressione del gene hvhsp17 in risposta a stress abiotici di varia natura. Atti XXXIX Convegno Annuale Società Italiana di Genetica Agraria, Vasto Marina, Italy. pp. 205-206.

Ma FJ, Zheng SJ, Hiradate S & Matsumoto H (1997a) Detoxifying aluminium with buckwheat. Nature 390: 569-570.

Ma JF, Zheng SJ & Matsumoto H (1997b) Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. Plant and Cell Physiology 38: 1019-1025.

MacDiarmid CW, Gaither LA & Eide D (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO Journal 19: 2845-2855.

Macnair MR (1993) The genetics of metal tolerance in vascular plants. New Phytologist 124: 541-559.

Madhava Rao KV & Sresty TVS (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science 157: 113-128.

Mager WH & Moradas Ferreira P (1993) Stress response of yeast. Biochemical Journal 290: 1-13.

Maitani T, Kubota H, Sato K & Yamada T (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. Plant Physiology 110: 1145-1150.

Malek K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL & Dietrich RA (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. Nature Genetics 26: 403-410.

Marchetti S & Leita L (1995) Risposta sporofitica e gametofitica allo stress da cadmio in *Pisum sativum*. Atti XXXIX Convegno Annuale Società Italiana di Genetica Agraria, Vasto Marina, Italy. pp. 207-208.

Margoshes M & Vallee BL (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. Journal of the American Chemical Society 79: 4813-4814.

Marra MA, Hillier L & Waterston RH (1998) Expressed sequence tags – ESTablishing bridges between genomes. Trends in Genetics 14: 4-7.

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2ème édition. Academic Press, Boston, USA.

Marschner P, Godbold DL & Jentschke G (1996) Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Plant and Soil 178: 239-245.

Martienssen RA (1998) Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 2021-2026.

Martin F, Marchal JP, Timinska A & Canet D (1985) The metabolism and physical state of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi. A ^{31}P nuclear magnetic resonance study. New Phytologist 101: 275-290.

Martin F, Stewart GR, Genetet I & le Tacon F (1986) Assimilation of $^{15}NH_4^+$ by beech (*Fagus sylvatica* L.) mycorrhizas. New Phytologist 102: 85-94.

Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 159-163.

Massicotte HB, Melville LH, Molina R & Peterson RL (1993) Structure and histochemistry of mycorrhizae synthesized between *Arbutus menziesii* (Ericaceae) and two basidiomycetes, *Pisolithus tinctorius* (Pisolithaceae) and *Piloderma bicolor* (Corticiaceae). Mycorrhiza 3: 1-11.

Mathys W (1977) The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. Physiologia Plantarum 40: 130-136.

Matsumura H, Nirasawa S & Terauchi R (1999) Technical advance: Transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). Plant Journal 20: 719-726.

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

McKusick VA (1997) Genomics: structural and functional studies of genomes. Genomics 45: 244-249.

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

Meharg AA & Cairney JWG (2000) Coevolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. Advances in Ecological Research 30: 69-112.

Meharg AA & Macnair MR (1990) An altered phosphate uptake system in arsenate tolerant *Holcus lanatus*. New Phytologist 16: 29-35.

Meharg AA & Macnair MR (1992) Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. Journal of Experimental Botany 43: 519-524.

Meharg AA, Cumbes QJ & Macnair MR (1993) Pre-adaptation of *Holcus lanatus* L. to arsenate tolerance. Evolution 47: 313-316.

Mehlhorn H (1990) Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. Plant, Cell and Environment 13: 971-976.

Mehlhorn RJ (1986) The interaction of inorganic species with biomembranes. Dans "The importance of chemical speciation in environmental processes". Edité par Brinckman FE & Sadler PJ. Springer-Verlag, Berlin. pp. 85-97.

Mehra RK & Winge DR (1988) Cu(I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* γ-glutamyl peptides varying in chain lengths. Archives of Biochemistry and Biophysics 265: 381-389.

Melin E (1923) Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mykorrhizen von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* (L.). *Karst.* Mycologische Untersuchungen und Berichte 2: 73-331.

Melin E & Nilsson H (1957) Transport of ^{14}C-labelled photosynthate to the fungal associate of pine mycorrhiza. Svensk Botanisk Tidskrift 51: 166-186.

Meuwly P, Thibault P & Rauser WE (1993) γ-Glutamylcysteinylglutamic acid – a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. FEBS Letters 336: 472-476.

Meuwly P, Thibault P, Schwan AL & Rauser WE (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. Plant Journal 7: 391-400.

Miao ZH & Lam E (1995) Targeted disruption of the TGA3 locus in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 7: 359-365.

Michelet B & Boutry M (1995) The plasma membrane H^+-ATPase: a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. Plant Physiology 108: 1-6.

Mikola P (1965) Studies on ectendotrophic mycorrhiza of pine. Acta Forestalia Fennica 79: 1-56.

Miyabe S, Izawa S & Inoue Y (2001) The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications 282: 79-83.

Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK & Foy CD (1991) Mechanism of aluminium tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. Plant Physiology 96: 737-743.

Molina R & Trappe JM (1982) Lack of mycorrhizal specificity in the ericaceous hosts *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. New Phytologist 90: 495-509.

Molina R, Massicotte H & Trappe JM (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. Dans "Mycorrhizal Functioning". Edité par Allen MF. Chapman & Hall, London, UK, pp. 357-423.

Moniatte M, van der Goot FG, Buckley JT, Pattus F & van Dorsselaer A (1996) Characterization of the heptameric pore-forming complex of the Aeromonas toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. FEBS Letters 384: 269-272.

Morel JL (1997) Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. Dans "Soil ecotoxicology". Edité par Tarradellas J, Bitton G & Rossel D. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton. pp. 141-176.

Morselt AFW, Smits WTM & Limonard T (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 96: 417-420.

Mosse B & Hepper CM (1975) Vesicular-arbuscular infections in root organ cultures. Physiological Plant Pathology 5: 215-223.

Mowll JL & Gadd GM (1984) Cadmium uptake by *Aureobasidium pullulans*. Journal of General Microbiology 130: 279-284.

Mullen MD, Wolf DC, Beveridge TJ & Bailey GW (1992) Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. Soil Biology and Biochemistry 24: 129-135.

Munger K & Lerch K (1985) Copper metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*: chemical and spectroscopic properties. Biochemistry 24: 6751-6756.

Munger K, Germann NA & Lerch K (1985) Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene. EMBO Journal 4: 1459-1462.

Munger K, Germann NA & Lerch K (1987) The *Neurospora crassa* metallothionein gene. Regulation of expression and chromosomal location. Journal of Biological Chemistry 262: 7363-7367.

Murasugi A, Wada C & Hayashi Y (1981) Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, Schiz*osaccharomyces pombe*. Journal of Biochemistry 90: 1571-1574.

Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB & Taiz L (1997) Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 113: 1293-1301.

Naiki N (1980) Role of superoxide dismutase in a copper-resistant strain of yeast. Plant and Cell Physiology 21: 775-783.

Nehls U, Wiese J, Guttenberg M & Hampp R (1998) Carbon allocation in ectomycorrhizas: Identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 167-176.

Neumann D, Lichtenberger O, Gunther D, Tschiersch K & Nover L (1994) heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. Planta 194: 360-367.

Neuzil E (1990) Les oligo-éléments chez l'animal: de l'atomistique à la physiologie. Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture Française 76: 61-78.

Nieboer G & Richardson DHS (1980) The replacement of the non descript term "heavy metals" by biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Path. Ser. 1: 3-26.

Nies DH (1992) Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. Plasmid 27: 17-28.

Nriagu JO & Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature 333: 134-139.

Nylund JE & Wallander H (1989) Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. New Phytologist 112: 389-398.

Nylund JE & Wallander H (1992) Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. Dans "Methods in Microbiology". Edité par Norris JR, Read DJ & Varma AK. Academic Press, London. pp. 77-88.

Ochiai EI (1987) General principles of biochemistry of the elements. Plenum Press, New-York.

O'Halloran TV & Culotta VC (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. Journal of Biological Chemistry 275: 25057-25060.

Okubo K, Hori N, Matob R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y & Matsubara K (1992) Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. Nature Genetics 2: 173-179.

Ono B-I, Ohue H & Ishihara F (1988) Role of cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Hg^{2+}. Journal of Bacteriology 170: 5877-5882.

Orlovich DA & Ashford AE (1993) Polyphosphate granules are an artefact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Protoplasma 173: 91-102.

Orlovich DA, Ashford AE & Cox GC (1989) A reassessment of polyphosphate granule composition in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Australian Journal of Plant Physiology 16: 107-116.

Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, McDonald G & Ow DW (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. EMBO Journal 11: 3491-3499.

Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF & Ow DW (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. Journal of Biological Chemistry 270: 4721-4728.

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B & Sannia G (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 66: 920-924.

Palmiter RD (1998) The elusive function of metallothioneins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 8428-8430.

Pandey A & Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. Nature 405: 837-846.

Pauls KP & Thompson JE (1981) Effects of *in vitro* treatment with ozone on the physical and chemical properties of membranes. Physiologia Plantarum 53: 255-262.

Paulsen IT & Saier MH Jr (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. Journal of Membrane Biology 156: 99-103.

Pearson JN & Jakobsen I (1993) Symbiotic exchange of carbon and phosphorus between cucumber and three arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 124: 481-488.

Pearson RG (1968) Hard and soft acids and bases, HSAB. I. Fundamental principles. Journal of Chemical Education 45: 581-587.

Pearson WR & Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85: 2444-2448.

Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP & Fodor SPA (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 5022-5026.

Peberdy JF (1990) Fungal cell walls - a review. Dans "Biochemistry of cell walls and membranes in fungi". Edité par Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Coosey MW & Copping LE, Springer Verlag, Berlin. pp. 5-30.

Pellet DM, Grunes DL & Kochian LV (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). Planta 196: 788-795.

Pellet DM, Papernik LA, Jones DL, Darrah PR, Grunes DL & Kochian LV (1997) Involvement of multiple aluminium exclusion mechanisms in aluminium tolerance in wheat. Plant and Soil 192: 63-68.

Pence NS, Larsen PB, Ebbs SV, Lethan DLD, Lasat MM, Garvin DF, Eide D & Kochian LV (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 4956-4960.

Perez-Moreno J & Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. New Phytologist 145: 301-309.

Persans MW, Yan X, Patnoe JM, Krämer U & Salt DE (1999) Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. Plant Physiology 121: 1117-1126.

Peterson TA, Mueller WC & Englander L (1980) Anatomy and ultrastructure of a *Rhododendron* root-fungus association. Canadian Journal of Botany 58: 2421-2433.

Pichtel J & Salt CA (1998) Vegetative growth and trace metal accumulation on metalliferous wastes. Journal of Environmental Quality 27: 618-624.

Pichtel J, Kuroiwa K & Sawyerr HT (2000) Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. Environmental Pollution 110: 171-178.

Pilon-Smits EAH, Hwang S, Lytle CM, Zhu Y, Tai JC, Bravo RC, Chen Y, Leustek T & Terry N (1999) Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. Plant Physiology 119: 123-132.

Portnoy ME, Liu XF & Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. Molecular and Cellular Biology 20: 7893-7902.

Poschenrieder C, Gunsé B & Barceló J (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. Plant Physiology 90: 1365-1371.

Poschenrieder C, Gunsé B & Barceló J (1993) Chromium-induced inhibition of ethylene evolution in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves. Physiologia Plantarum 89: 404-408.

Prasad DDK & Prasad ARK (1987) Altered d-aminolevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of barja (*Pennisetum typhoideum*). Journal of Plant Physiology 127: 241-249.

Prasad MNV (1997) Trace metals. Dans "Plant ecophysiology". Edité par Prasad MNV. Wiley, New-York. pp. 207-249.

Puchta H & Hohn B (1996) From centimorgans to base pairs: homologous recombinaison in plants. Trends in Plant Sciences 1: 340-348.

Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta VC, Penner-Hahn JE & O'Halloran TV (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor ATX1. Science 278: 853-856.

Rabilloud T (2000) Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 72: 48A-58A.

Radisky D & Kaplan J (1999) Regulation of transition metal transport across the yeast plama membrane. Journal of Biological Chemistry 274: 4481-4484.

Rama Devi S & Prasad MNV (1998) Copper toxicity in *Cerotophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Science 138: 157-165.

Rauser WE (1990) Phytochelatins. Annual Review of Biochemistry 59: 61-86.

Rauser WE (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. Plant Physiology 109: 1141-1149.

Rauser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. Cell Biochemistry and Biophysics 31: 19-48.

Rea PA, Li ZS, Lu YP, Drozdowicz YM & Martinoia E (1998) From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 727-760.

Read DJ (1983) The biology of mycorrhiza in the Ericales. Canadian Journal of Botany 61: 985-1004.

Read DJ (1991) Mycorrhizas in ecosystems. Experientia 47: 376-390.

Read DJ (1992) The mycorrhizal mycelium. Dans "Mycorrhizal Functioning". Edité par Allen MF. Chapman and Hall, London, UK. pp. 102-133.

Read DJ (1999) Mycorrhiza – The state of the art. Dans "Mycorrhizas: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology". Edité par Varma A & Hock B. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 3-34.

Read DJ & Boyd R (1986) Water relations of mycorrhizal fungi and their host plants. Dans "Water, Fungi and Plants". Edité par Ayres P & Boddy L. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 287-303.

Reddy G & Prasad MNV (1995) Cadmium-induced protein phosphorilation changes in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Journal of Plant Physiology 145: 67-70.

Redecker D, Kodner R & Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. Science 289: 1920-1921.

Rees B, Shepherd VA & Ashford AE (1994) Presence of a motile tubular vacuole system in different phyla of fungi. Mycological Research 98: 985-992.

Remy W, Taylor TN, Haas, H & Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular-arbuscular mycorrhiza. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 11841-11843.

Reymond P, Weber H, Damond M & Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. Plant Cell 12: 707-719.

Roane TM & Pepper IL (2000) Microbial responses to environmentally toxic cadmium. Microbial Ecology 38: 358-364.

Robert M (1996) Le sol, une interface dans l'environnement, une ressource pour le développement. Edité par Masson. Paris.

Robertson DC & Robertson J (1982) Ultrastructure of *Pterospora andromeda* Nutall and *Sarcodes sanguinea* Torrey mycorrhizas. New Phytologist 92: 539-551.

Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C & Jackson PJ (1993) Plant metallothioneins. Biochemistry Journal 295: 1-10.

Roepstorff P (1997) Mass spectrometry in protein studies from genome to function. Current Opinion in Biotechnology 8: 6-13.

Ross IS & Walsh AL (1981) Resistance to copper in *Saccharomyces cerevisiae*. Transactions of the British Mycological Society 77: 27-32.

Rousseau JVD & Reid CPP (1990) Effects of phosphorus and ectomycorrhizas on the carbon balance of loblolly pine seedlings. Forest Science 36: 101-112.

Rousseau JVD, Sylvia DM & Fox AJ (1994) Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. New Phytologist 128: 639-644.

Rucinska R, Waplak S & Gwózdz EA (1999) Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. Plant Physiology and Biochemistry 37: 187-194.

Rudawska M, Kieliszewska-Rokicka B, Debaud JC, Lewandowski A & Gay G (1994) Enzymes of ammonium metabolism in ectendomycorrhizal and ectomycorrhizal symbionts of pine. Physiologia Plantarum 92: 279-285.

Rüegsegger A & Brunold C (1992) Effect of cadmium on _-glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. Plant Physiology 99: 428-433.

Rüegsegger A, Schmutz D & Brunold C (1990) Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. Plant Physiology 93: 1579-1584.

Rufyikiri G, Declerk S, Dufey JE & Delvaux B (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi might alleviate aluminium toxicity in banana plants. New Phytologist 148: 343-352.

Rühling A, Bååth E, Nordgren A & Söderström B (1984) Fungi in metal-contaminated soil near the Gusum Brass Mill, Sweden. Ambio 13: 34-36.

Rygiewicz PT, Bledsoe CS & Zasoski RJ (1984a) Effect of ectomycorrhizas and solution pH on (^{15}N)ammonium uptake by coniferous seedlings. Canadian Journal of Forest Research 14: 885-892.

Rygiewicz PT, Bledsoe CS & Zasoski RJ (1984b) Effect of ectomycorrhizas and solution pH on (^{15}N)nitrate uptake by coniferous seedlings. Canadian Journal of Forest Research 14: 893-899.

Sagner S, Kneer R, Wanner G, Cosson J-P, Deus-Neumann B & Zenk MH (1998) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. Phytochemistry 47: 339-347.

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for disgnostic of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Salt DE & Rauser WE (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. Plant Physiology 107: 1293-1301.

Salt DE & Wagner GJ (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd^{2+}/H^{+} antiport activity. Journal of Biological Chemistry 268: 12297-12302.

Salt DE, Smith RD & Raskin I (1998) Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 643-668.

Salzer P & Hager A (1991) Sucrose utilization of the ectomycorrhizal fungi *Amanita muscaria* and *Hebeloma crustuliniforme* depends on the cell wall-bound invertase activity of their host *Picea abies*. Botanica Acta 104: 439-445.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis TA (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

Sanders D (1988) Fungi. Dans "Solute Transport in Plant Cells and Tissues". Edité par Baker DA & Hall JL. Longman Scientific, Harlow, UK. pp. 106-165.

Sanders FE & Tinker PB (1973) Phosphate flow into mycorrhizal roots. Pesticide Science 4: 385-395.

Sanger F, Nicklenm S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74: 5463-5467.

Sanità di Toppi L & Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany 41: 105-130.

Scales P & Peterson RL (1991) Structure and development of *Pinus banksiana-Wilcoxina* ectendomycorrhizae. Canadian Journal of Botany 69: 2135-2148.

Scandalios JG (1997) Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. Dans "Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses". Edité par Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New-York. pp. 527-568.

Scannerini S & Bonfante-Fasolo P (1983) Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. Canadian Journal of Botany 61: 917-943.

Schaaper RM, Koplitz RM, Tkeshelashvili LK & Loeb LA (1987) Metal-induced lethality and mutagenesis: possible role of apurinic intermediates. Mutation Research 177: 179-188.

Schaeffer C, Wallenda T, Guttenberger M & Hampp R (1995) Acid invertase in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Normay spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings. New Phytologist 129: 417-424.

Schena M, Shalon D, Davis RW & Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270: 467-470.

Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E & Davis RW (1998) Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends in Biotechnology 16: 301-306.

Schenk PM, Baumann S, Mattes R & Steinbiss H-H (1995) Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ^{Arg}tRNAs. BioTechniques 19: 196-200.

Schickler H & Caspi H (1999) Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. Physiologia Plantarum 105: 39-44.

Schmidt A & Kunert KJ (1986) Lipid peroxydation in higher plants. The role of glutathione reductase. Plant Physiology 82: 700-702.

Schmöger MEV, Oven M & Grill E (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. Plant Physiology 122: 793-801.

Schüepp H, Dehn B & Sticher H (1987) Interaktionen zwischen VA-Mykorrhizen und Schwermetallbelastungen. Angewandte Botanik 61: 85-96.

Schuler GD, Epstein JA, Ohkawa H & Kans JA (1996a) Entrez: molecular biology database and retrieval system. Methods in Enzymology 266: 141-162.

Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tome P, Aggarwal A, Bajorek E, *et al.* (1996b) A gene map of the human genome. Science 274: 540-546.

Seeger R (1982) Toxische Schwermetalle in Pilzen. Deutsche Apotheker Zeitung 122: 1835-1844.

Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW & Ratcliffe RG (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in VAM colonised leek. Plant Physiology 108: 7-15.

Shalon D, Smith SJ & Brown PO (1996) A DNA microarray system for analysing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Research 6: 639-645.

Shatzman AR & Kosman DJ (1978) The utilization of copper and its role in the biosynthesis of copper-containing proteins in the fungus, *Dactylium dendroides*. Biochemical and Biophysical Acta 544: 163-179.

Shetty KG, Hetrick BAD, Figge DAH & Schwab AP (1994) Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. Environmental Pollution 86: 181-188.

Shiraishi E, Inouhe M, Joho M & Tohoyama H (2000) The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. Current Genetics 37: 79-86.

Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA & Lukyanov SA (1995) An improved method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acids Research 23: 1087-1088.

Siedlecka A, Samuelsson G, Gardeström P, Kleczkowski LA & Krupa Z (1998) The "activatory model" of plant response to moderate cadmium stress – relationship between carbonic anhydrase and Rubisco. Dans "Photosynthesis: mechanisms and effects". Edité par Garab G. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Sies H (1985) Oxidative stress: introductory remarks. Dans "Oxidative stress". Edité par Sies H, Academic Press, Londres. pp. 273-310.

Simon L, Bousquet J, Levesque RC & Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature 363: 67-69.

Simon T (2000) The effect of nickel and arsenic on the occurrence and symbiotic abilities of native rhizobia. Rostlinná Vyroba 46: 63-68.

Slankis V (1973) Hormonal relationship in mycorrhizal development. Dans "Ectomycorrhizae". Edité par Marks GC & Kozlowski TT. Academic Press, New York, USA.

Smith FA & Smith SE (1996) Mutualism and parasitism: biodiversity in function and structure in the "arbuscular" (VA) mycorrhizal symbiosis. Advances in Botanical Research 22: 1-43.

Smith SE & Gianinazzi-Pearson V (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular arbuscular mycorrhizal plants. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology 39: 221-244.

Smith SE & Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis, 2ème édition. London: Academic Press Ltd.

Smith SE & Smith FA (1990) Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. New Phytologist 114: 1-38.

Smith SE, St John BJ, Smith FA & Nicholas DJD (1985) Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. New Phytologist 99: 211-227.

Smith TF & Waterman MS (1981) Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology 147: 195-197.

Snellgrove RC, Splittstoesser WE, Stribley DP & Tinker PB (1982) The distribution of carbon and the demand of the fungal symbiont in leek plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytologist 92: 75-87.

Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L & Efstratiadis A (1994) Construction and characterization of a normalized cDNA library. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 9228-9232.

Söderström B & Read DJ (1987) Respiratory activity of intact and excised ectomycorrhizal mycelial systems growing in unsterilized soil. Soil Biology and Biochemistry 19: 231-236.

Somashekaraiah BV, Padmaja K & Prasad ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. Physiologia Plantarum 85: 85-89.

Sonnhammer ELL & Kahn D (1994) Modular arrangement of proteins as inferred from analysis of homology. Protein Science 3: 482-492.

Sonnhammer ELL, Eddy SR & Durbin R (1997) Pfam: a comprehensive database of protein families based on seed alignments. Proteins 28: 405-420.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98: 503-517.

Speiser DM, Abrahamson SL, Banuelos G & Ow DW (1992) *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. Plant Physiology 99: 817-821.

Staiger D & Apel K (1993) Molecular characterization of two cDNAs from *Sinapis alba* L. expressed specifically at an early stage of tapetum development. Plant Journal 4: 697-703.

Steffens JC (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41: 553-575.

Steffens JC, Hunt DF & Williams BG (1986) Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (γ-glutamyl-cysteinyl)$_n$-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. Journal of Biological Chemistry 261: 13879-13882.

Steiner S & Witzmann FA (2000) Proteomics: applications and opportunities in preclinical drug development. Electrophoresis 21: 2099-2104.

Steinman HM (1992) Construction of an *Escherichia coli* K-12 strain deleted for manganese and iron superoxide dismutase genes and its use in cloning the iron superoxide dismutase gene of *Legionella pneumophila*. Molecular and General Genetics 232: 427-430.

Stiborova M, Ditrichova M & Brezinova A (1988) Mechanism of action of Cu^{2+}, Co^{2+} and Zn^{2+} on ribulose-1,5-biphosphate carboxylase from barley (*Hordeum vulgare*). Photosynthetica 22: 161-167.

Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhari I & Sherwood RP (1985) The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiologia Plantarum 63: 293-298.

Strandberg GW, Shumate SE & Parrott JR (1981) Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology 41: 237-241.

Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of Molecular Biology 189: 113-130.

Subhadra AV, Nanda AK, Behera PK & Panda BB (1991) Acceleration of catalase and peroxidase activities in *Lemna minor* L. and *Allium cepa* L. in response to low levels of aquatic mercury. Environmental Pollution 69: 169-179.

Supek F, Supekova L, Nelson H & Nelson N (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 5105-5110.

Swan TM & Watson K (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. FEMS Microbiology Letters 169: 191-197.

Swidzinski JA, Zaplachinski ST, Chuong SDX, Wong JFK & Muench DG (2001) Molecular characterization and expression analysis of a highly conserved rice *mago nashi* homolog. Genome 44: 394-400.

Taber WA & Taber RA (1987) Carbon nutrition and respiration of *Pisolithus tinctorius*. Transactions of the British Mycological Society 89: 13-26.

Tamm CO (1991) Nitrogen in Terrestrial Ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Tarafdar JC & Marschner H (1994) Phosphatase activity in the rhizosphere of VA-mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. Soil Biology and Biochemistry 26: 387-395.

Tatusova TA & Madden TL (1999) BLAST 2 SEQUENCES, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiology Letters 174: 247-250.

Taylor GJ (1991) Current view of the aluminium stress response: the physiological basis of tolerance. Current topics in Plant Biochemistry and Physiology 10: 57-93.

Teisseire H & Guy V (2000) Copper-induced changes in antioxidant enzyme activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). Plant Science 153: 65-72.

Terryn N, Rouzé P & Van Montagu M (1999) Plant genomics. FEBS Letters 452: 3-6.

Thayer JS (1984) Organometallic compounds and living organisms. New-York: Academic Press.

Thayer JS (1989) Methylation: its role in the environmental mobility of heavy elements. Applied Organometallic Chemistry 3: 123-128.

Thiele DJ (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. Molecular Cell Biology 8: 2745-2752.

Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM & Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 4991-4996.

Thumann J, Grill E, Winnacker E-L & Zenk MH (1991) Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. FEBS Letters 284: 66-69.

Tobin JM, Cooper DG & Neufeld RJ (1984) Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. Applied and Environmental Microbiology 47: 821-824.

Tobin JM, Cooper DG & Neufeld RJ (1987) Influence of anions on metal adsorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. Biotechnology and Bioengineering 30: 882-886.

Tobin JM, Cooper DG & Neufeld RJ (1988) The effects of cation competition and metal biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. Biotechnology and Bioengineering 31: 282-286.

Tohoyama H, Inagawa A, Koike H, Inouhe M, Joho M & Murayama T (1992) Constitutive expression of the gene for metallothionein in a cadmium-resistant yeast. FEMS Microbiology Letters 95: 81-86.

Tohoyama H, Inouhe M, Joho M & Murayama T (1992) Production of metallothionein in copper- and cadmium-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Industrial Microbiology 14: 126-131.

Tolstrup N, Rouzé P & Brunak S (1997) A branch point consensus from *Arabidopsis* found non-circular analysis allows for better prediction of acceptor sites. Nucleic Acids Research 25: 3159-3163.

Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hortensteiner S, Matile P, Amrhein N & Martinoia E (1998) An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. Plant Journal 13: 773-780.

Trevors JT, Stratton GW & Gadd GM (1986) Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Canadian Journal of Microbiology 32: 447-464.

Turnau K (1991) The influence of cadmium dust on fungi in a pino-quercetum forest. Ekologia Polska 39: 39-57.

Turnau K, Kottke I & Oberwinkler F (1993a) Localization of toxic elements in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* collected from dust treated experimental pots. New Phytologist 123: 313-324.

Turnau K, Kottke I & Oberwinkler F (1993b) *Paxillus involutus-Pinus sylvestris* mycorrhizae from heavily polluted forest. I. Element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. Botanica Acta 106: 213-219.

Turnau K, Kottke I, Dexheimer J & Botton B (1994) Element distribution in mycelium of *Pisolithus arrhizus* treated with cadmium dust. Annals of Botany 74: 137-142.

Turnau K, Kottke I & Dexheimer J (1996) Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus/Pinus sylvestris* mycorrhizas collected from calamine dumps. Mycological Research 100: 16-22.

Turnbull MH, Goodall R & Stewart GR (1996) Evaluating the contribution of glutamate dehydrogenase to ammonia assimilation by ectomycorrhizal fungi. Australian Journal of Plant Physiology 23: 151-159.

Tyler G (1982) Accumulation and exclusion of metals in *Collybia peronata* and *Amanita rubescens*. Transactions of the British Mycological Society 79: 239-245.

Uberbacher EC & Mural RJ (1991) Locating protein coding regions in human DNA sequences using a multiple sensor-neural net-work approach. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88: 11261-11265.

Urwin PE, Groom QJ & Robinson NJ (1996) Characterization of two cDNAs and identification of two proteins that accumulate in response to cadmium in cadmium-tolerant *Datura innoxia* (Mill.) cells. Journal of Experimental Botany 47: 1019-1024.

Van Assche F & Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity. Plants, Cell and Environment 13: 195-206.

Van Assche F, Cardinaels C & Clijsters H (1988) Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium. Environmental Pollution 52: 103-115.

Van Breusegem F, Van Montagu M & Inzé D (1998) Engineering stress tolerance in maize. Outlook on Agriculture 27: 115-124.

Van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonnens AN, Schat H, Verkleij JAC & Hooykaas PJ (1999) Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. Plant Physiology 119: 1047-1055.

Van Tichelen KK, Colpaert JV & Vangronsveld J (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. New Phyologist 150: 203-213.

Vangronsveld J & Clijsters H (1994) Toxic effects of metals. Dans "Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity". Edité par Farago ME, VCH Verlagsgesellschaft (Weinheim) et VCH Publishers (New York). pp. 150-177.

Vangronsveld J, Van Assche F & Clijsters H (1995) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: *in situ* metal immobilization and revegetation. Environmental Pollution 87: 51-59.

Väre H (1990) Aluminium polyphosphate in the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* (Fr.) O. Kunze as revealed by energy dispersive spectrometry. New Phytologist 116: 663-668.

Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P & Rea PA (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96: 7110-7115.

Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P & Rea PA (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. Journal of Biological Chemistry 275: 31451-31459.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B & Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. Science 270: 484-487.

Vert G, Briat J-F & Curie C (2001) Arabidopsis IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. Plant Journal 26: 181-189.

Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E & Gros P (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. Cell 73: 469-485.

Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB & Labarre J (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 276: 8469-8474.

Vögeli-Lange R & Wagner GJ (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Plant Physiology 92: 1086-1093.

Voiblet C (1999) Etude des modifications du transcriptome d'*Eucalyptus globulus* et *Pisolithus tinctorius* au cours du développement de la symbiose ectomycorhizienne. Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Voiblet C, Duplessis S, Encelot N & Martin F (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. Plant Journal 25: 181-191.

Volesky B (1990) Biosorption of heavy metals. CRC Press, Boca Raton.

Vos P, Hogers R, Bleecker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J & Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

Wagner GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. Advances in Agronomy 51: 173-212.

Wakatsuki T, Hayakawa S, Hatayama T, Kitamura T & Imahara H (1991a) Solubilization and properties of copper reducing enzyme systems from the yeast cell surface in *Debaryomyces hansenii*. Journal of Fermentation and Bioengineering 72: 79-86.

Wakatsuki T, Hayakawa S, Hatayama T, Kitamura T & Imahara H (1991b) Purification and some properties of copper reductase from cell surface of *Debaryomyces hansenii*. Journal of Fermentation and Bioengineering 72: 158-161.

Walker CU (1979) *Complexipes moniliformis*: a new genus and species tentatively placed in Endogonaceae. Mycotaxon 10: 99-104.

Wallace GD (1975) Studies of the Monotropoideae (Ericaceae) taxonomy and distribution. Wasmann Journal of Biology 33: 1-88.

Wallander H (2000a) Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonized by different ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 218: 249-256.

Wallander H (2000b) Use of strontium isotopes and foliar K content to estimate weathering of biotite induced by pine seedlings colonised by ectomycorrhizal fungi from two different soils. Plant and Soil 222: 215-229.

Wallander H & Wickman T (1999) Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. Mycorrhiza 9: 25-32.

Wang CJK & Wilcox HE (1985) New species of ectomycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi: *Phialophora finlandia*, *Chloridium paucisporum*, and *Phialocephala fortinii*. Mycologia 77: 951-958.

Weckx J & Clijsters H (1996) Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. Physiologia Plantarum 96: 506-512.

Weckx J & Clijsters H (1997) Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry 35: 405-410.

Weete JD (1980) Lipid biochemistry of fungi and other organisms. Plenum press, New-York.

Weigel HJ (1985a) Inhibition of photosynthetic reactions of isolated intact chloroplasts by cadmium. Journal of Plant Physiology 119: 179-189.

Weigel HJ (1985b) The effects of Cd^{2+} on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts. Physiologia Plantarum 63: 192-200.

Weissenhorn I & Leyval C (1995) Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. Plant and Soil 175: 233-238.

Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G & Berthelin J (1995a) Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. Mycorrhiza 5: 245-251.

Weissenhorn I, Leyval C & Berthelin J (1995b) Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in a soil polluted by atmospheric deposition from a smelter. Biology and Fertility of Soils 19: 22-28.

Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari B-Z & Kornitzer D (2000) The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 3520-3525.

Welch J, Fogel S, Buchman C & Karin M (1989) The CUP2 gene product regulates the expression of the CUP1 gene, coding for yeast metallothionein. EMBO Journal 8: 255-260.

Whitelaw CA, Le Huquet JA, Thurman DA & Tomsett AB (1997) The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Molecular Biology 33: 503-511.

Wilcox HE (1991) Mycorrhizae. Dans "Plant roots: the Hidden Half". Edité par Waisel Y, Eshel A & Kafkafi U. Marcel Dekker, New-York. pp. 731-765.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel ED, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL & Hochstrasser DF (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Biotechnology (NY) 14: 61-65.

Winge DR, Nielson KB, Gray WR & Hamer DH (1985) Yeast metallothionein-sequence and metal binding properties. Journal of Biological Chemistry 260: 14464-14470.

Wingler A, Wallenda T & Hampp R (1996) Mycorrhiza formation on Norway spruce (*Picea abies*) roots affects the pathway of anaplerotic CO_2 fixation. Physiologia Plantarum 96: 699-705.

Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH & Lockhart DJ (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Biotechnology 15: 1359-1367.

Woeste KE & Kieber JJ (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. Plant Cell 12: 443-455.

Worley KC, Weise BA & Smith RF (1995) BEAUTY: an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. Genome Research 5: 173-184.

Worley KC, Culpepper P, Weise BA & Smith RF (1998) BEAUTY-X: enhanced BLAST searches for DNA queries. Bioinformatics 14: 890-891.

Wright CF, Hamer DH & McKenney K (1988) Autoregulation of the yeast copper metallothionein gene depends on metal binding. Journal of Biological Chemistry 263: 1570-1574.

Wright DP, Scholes JD & Read DJ (1998) Effects of VA mycorrhizal colonisation on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. Plant, Cell and Environment 21: 209-216.

Wright SY, Suner MM, Bell PJ, Vaudin M & Greenland AJ (1993) Isolation and characterization of male flower cDNAs from maize. Plant Journal 3: 41-49.

Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO & Weigel RJ (1999) Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. Nicleic Acids Research 27: 1517-1523.

Yang XE, Baligar VC, Foster JC & Martens DC (1997) Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize with different nickel levels. Plant and Soil 196: 271-276.

Ye Z & Connor JR (2000) Identification of iron responsive genes by screening cDNA libraries from suppression subtractive hybridization with antisens probes from three iron conditions. Nucleic Acids Research 28: 1802-1807.

Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, Kirillov E, Kreindlin E, Ivanov I, Parinov S, Guschin D, Drobishev A, Dubiley S & Mirzabekov A (1996) DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 4913-4918.

Yu YB & Yang SF (1979) Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. Plant Physiology 64: 1074-1077.

Zarb J & Walters DR (1995) Polyamine biosynthesis in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* exposed to zinc. Letters in Applied Microbiology 21: 93-95.

Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants – a review. Gene 179: 21-30.

Zhao H & Eide D (1996a) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 2454-2458.

Zhao H & Eide D (1996b) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 271: 23203-23210.

Zhou JL (1999) Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 686-693.

Ziegler H (1975) Phloem transport. Nature of transported substances. Dans " Encyclopedia of plant physiology, New Series, vol. 1. Transport in plants". Edité par Zimmermann MH & Milburn JA. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York. pp. 59-100.

Note :

Seules les références bibliographiques citées dans les chapitres 1, 2, 4 et 5 sont données dans la liste ci-dessus. Les références citées dans le chapitre 3 sont incluses dans les articles et le manuscrit.

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

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

Monsieur **JACOB Christophe**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 15 octobre 2001 n° 564

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
LE PRÉSIDENT
M. BURLET

Université Henri Poincaré, Nancy-I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY CEDEX
Tél. : 03 83 85 48 00 - Fax : 03 83 85 48 48

Résumé

La première partie du travail de thèse a consisté à étudier la tolérance des champignons ectomycorhiziens aux métaux lourds. Les tests de tolérance d'isolats ectomycorhiziens provenant de sites pollués et non pollués ont permis de mettre en évidence une forte variation interspécifique ainsi qu'une forte hétérogénéité intraspécifique. D'autre part, l'absence de corrélation entre l'origine des isolats (sol pollué ou non pollué, quel que soit le métal considéré et sa concentration) et leur degré de tolérance a également été démontrée.

La deuxième partie de ce travail a ensuite consisté à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse du champignon ectomycorhizien au cadmium. Afin d'acquérir une vision globale des gènes régulés par le cadmium, nous avons couplé à une méthode de soustraction, la SSH, qui permet d'obtenir un enrichissement en ADNc correspondant à des gènes différentiellement exprimés en présence ou en absence de cadmium, une analyse en masse de l'expression génique. Cette étude nous a permis d'obtenir les profils d'expression de près de 1200 ADNc lorsque le champignon est mis en présence de 0,05 ppm de cadmium pendant 12 heures.

Nous avons caractérisé plus particulièrement un ADNc codant une superoxyde dismutase, dont la fonction a été démontrée par complémentation fonctionnelle d'une souche déficiente d'*E. coli*. L'ADNc pleine longueur a été obtenu par criblage d'une banque phagique d'ADNc, et l'analyse de la séquence peptidique révèle une probable localisation peroxysomale. Pour la synthèse des anticorps, le polypeptide (l'antigène) a été produit par expression hétérologue dans une souche d'*E. coli*. Le suivi des taux de transcrits, de polypeptides et de l'activité superoxyde dismutase suite à un stress au cadmium suggèrent que le principal niveau de régulation est post-traductionnel. L'ADNc codant une lanostérol synthase est en cours de caractérisation dans l'équipe de Seiichi Matsuda aux Etats-Unis.

Mots-clés: champignons ectomycorhiziens, *Paxillus involutus*, métaux lourds, SSH, filtres d'ADNc, superoxyde dismutase, lanostérol synthase