



**HAL**  
open science

## **Recherche des mécanismes moléculaires responsables des efflux de phosphate dans la symbiose ectomycorhizienne.**

Claude Plassard, Adeline Becquer

### ► **To cite this version:**

Claude Plassard, Adeline Becquer. Recherche des mécanismes moléculaires responsables des efflux de phosphate dans la symbiose ectomycorhizienne.. 2012. <hal-01267975>

**HAL Id: hal-01267975**

**<https://hal.science/hal-01267975v1>**

Submitted on 6 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.



HAL Authorization

**Master Biologie des Plantes et des Microorganismes, Biotechnologies, Bioprocédés.**

**Spécialité : Biologie des Plantes**

**Parcours : M2 Biologie Fonctionnelle des Plantes**

**Année Universitaire 2011-2012**

## **Recherche des mécanismes moléculaires responsables des efflux de phosphate dans la symbiose ectomycorhizienne**



**Par Adeline BECQUER**

Stage de recherche de M2  
Supervisé par Claude Plassard  
UMR 1222-INRA-IRD-SupAgro-CIRAD-  
Ecologie fonctionnelle et biogéochimie des sols (Eco&Sols)  
Agrocampus Montpellier, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex



## **Titre. Recherche des mécanismes moléculaires responsables des efflux de phosphate dans la symbiose ectomycorhizienne**

### **Résumé.**

Dans les écosystèmes terrestres et plus particulièrement dans les écosystèmes forestiers, la disponibilité en phosphore (P) sous forme inorganique limite la croissance des arbres. Dans les conditions naturelles, les arbres vivent en association symbiotique avec des champignons via de nouveaux organes appelés les ectomycorhizes. De nombreuses études ont montré que la formation d'ectomycorhizes se traduit généralement par une amélioration de la nutrition phosphatée de la plante. Afin de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent les échanges de P entre le champignon et la plante, nous avons utilisé une association modèle entre le pin maritime, *Pinus pinaster* et un basidiomycète ectomycorhizien, *Hebeloma cylindrosporum*, dont le génome a été récemment séquencé. L'exploration du génome fongique a montré qu'il possède 3 transporteurs de  $H^+ : Pi$  (*HcPT1.1*, *HcPT1.2*, *HcPT2*) dont deux (*HcPT1.1* et *HcPT2*) ont déjà été caractérisés. L'analyse *in silico* du promoteur de *HcPT1.2* ayant permis d'identifier trois séquences potentiellement régulées par la concentration en  $P_i$ , nous avons étudié la régulation du promoteur du gène *HcPT1.2* en réponse à la concentration extérieure en  $P_i$ . Nous avons aussi déterminé le niveau d'expression des trois gènes (*HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2*) par RT-PCR quantitative dans les hyphes du champignon préalablement « élicités » *in vitro* par la présence de racines de pin maritime dans une solution commune mimant l'espace apoplasmique de l'interface cellules fongiques/cellules hôte à deux valeurs de pH. Les résultats montrent que l'expression de *HcPT1.2* ne semble pas régulée par la disponibilité en  $P_i$ , ni par la présence de la plante ou le pH. Au contraire, l'expression des deux autres gènes semble être régulée par la présence du Pin et le pH.

**Mots clés.** Symbiose ectomycorhizienne, systèmes de transport membranaires, RT-PCR quantitative, régulation.

Nombre de mots : 268

## **Title. Research of the molecular mechanisms responsible for efflux of phosphate in the ectomycorrhizal symbiosis**

**Abstract.** In terrestrial ecosystems, especially in forest ecosystems, the availability of phosphorus (P) as inorganic P limits tree growth. Under natural conditions, trees live in symbiosis with fungi through new organs called ectomycorrhizae. Numerous studies have shown that the formation of ectomycorrhizae usually results in improved phosphate nutrition of the plant. To better understand the mechanisms underlying exchanges of P between the fungus and the plant, we used a model association between the maritime pine, *Pinus pinaster* and an ectomycorrhizal basidiomycete, *Hebeloma cylindrosporum*, whose genome was recently sequenced. Exploring the fungal genome has shown that he has three carriers of  $H^+ : Pi$  (*HcPT1.1*, *HcPT1.2*, *HcPT2*), two (*HcPT1.1* and *HcPT2*) have been characterized. As the *in silico* analysis of promoter *HcPT1.2* identified three sequences potentially regulated by the concentration of  $P_i$ , we studied the regulation of gene promoter *HcPT1.2* in response to external  $P_i$  concentration. We have also determined the level of expression of three genes (*HcPT1.1*, *HcPT1.2* and *HcPT2*) by quantitative RT-PCR in hyphae of the fungus previously "elicited" *in vitro* by the presence of roots of maritime pine in a common solution mimicking the space of the apoplasmic interface fungal cells / host cells to two pH values. The results showed that the expression of *HcPT1.2* does not seem to be regulated by the availability of  $P_i$ , or the presence of the plant or the pH. In contrast, the expression of the two other genes appears to be regulated by the presence of pine and pH..

**Key words.** Ectomycorrhizal symbiosis, membrane system transport, quantitative RT-PCR, regulation

Nombre de mots : 247



# Remerciements

**Je tiens d'abord à remercier les deux équipes de recherche qui m'ont accueillie au cours de mon stage, Eco&Sols dirigé par Jean-Luc Chotte et BPMP dirigé par Hervé Sentenac, pour leur gentillesse et pour m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions grâce à l'accès aux laboratoires et aux équipements.**

**Je voudrais remercier très sincèrement ma responsable de stage, Claude Plassard, pour m'avoir proposé un sujet de stage passionnant et pour me faire suffisamment confiance pour vouloir travailler avec moi pendant les trois prochaines années... J'aimerais également la remercier pour m'avoir si bien accueillie et conseillée tout au long de mon stage, pour sa gentillesse et pour le temps qu'elle m'a consacré dans les manipulations en laboratoire et dans la rédaction de mon rapport ou tout simplement pour répondre à mes questions.**

**Je remercie Estelle Tournier et Laurie Amenc pour leur gentillesse, leur disponibilité et l'aide qu'elles m'ont offertes dans les différentes expériences réalisées au laboratoire.**

**Je remercie Kevin Garcia, pour tout le temps qu'il m'a consacré, pour ses idées, sa patience devant mes bêtises et pour toutes ses discussions champignons tellement intéressantes.**

**Je remercie également le reste du groupuscule mycorhize, Sabine Zimmermann, pour m'avoir fait une petite place dans son bureau et pour sa gentillesse et Amandine Delteil, pour son aide dès que j'en avais besoin, pour le temps qu'elle m'a donné et pour sa bonne humeur.**

**Pour finir je remercie toutes les personnes présentes pendant la durée de mon stage au sein des deux laboratoires, pour cette ambiance géniale, pour ces pauses repas ou 4 heures qui font du bien dans une journée de 12 heures et pour tous ces moments qui ont rendu ce stage formidable.**



## Plan du contenu

<b>1 – Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>2 – Résultats.....</b>	<b>5</b>
2.1 - Quantification de l'expression de la <i>eGFP</i> sous le contrôle du promoteur PPT1.2 en réponse au phosphate.....	5
2.2 – Quantification de l'expression de <i>HcPT1.2</i> et des autres transporteurs de Pi en réponse à <i>Pinus pinaster</i> et au pH.....	8
<b>3 – Discussion.....</b>	<b>9</b>
3.1 - Régulation de l'expression de <i>HcPT1.2</i> en réponse au phosphate.....	9
3.2 – Régulation de l'expression de <i>HcPT1.2</i> et des autres transporteurs de Pi en réponse à <i>Pinus pinaster</i> et au pH.....	12
<b>4 - Matériels et Méthodes.....</b>	<b>15</b>
4.1 - Obtention du matériel biologique.....	15
4.2 – Système de culture <i>in vitro</i> pour l'interaction <i>Hebeloma cylindrosporum</i> et <i>Pinus pinaster</i> .....	16
4.3 – Quantification de l'expression des gènes <i>HcPT1.1</i> , <i>HcPT1.2</i> et <i>HcPT2</i> .....	17
4.4 - Clonage du promoteur fragmenté de <i>HcPT1.2</i> .....	17
4.5 - Transformation du champignon <i>Hebeloma cylindrosporum</i> par <i>Agrobactérium tumefaciens</i> .....	18
4.5.a – Préparation du partenaire fongique.....	18
4.5.b – Préparation du partenaire bactérien.....	18
4.5.c – Préparation des « disques de transformation ».....	19
4.5.d – Transformation du champignon.....	19
4.5.e – Sélection des transformants.....	19
4.6 – Quantification de l'expression de la <i>eGFP</i> sous le contrôle du promoteur PPT1.2.....	19
4.7- Traitements statistiques des données.....	20
<b>5 – Références.....</b>	<b>21</b>
<b>6 – Annexes.....</b>	<b>26</b>



## Plan des figures (page verso)

**Figure 1.** Représentation schématique de l'absorption par les plantes du phosphate inorganique (Pi) du sol à partir de la voie d'assimilation directe et mycorhizienne dans une racine endomycorhizée.

**Figure 2.** Analyse in silico de la région promotrice du gène *HcPT1.2*.

**Figure 3.** Vérification par une réaction PCR de la présence des constructions, (PPT1.2-1, PPT1.2, PPT1.2-3, PPT1.2-4 fusionnés à la *eGFP*), dans le génome des souches mutantes de *Hebeloma cylindrosporum*.

**Figure 4.** Analyse de la qualité des ARNs totaux des transformants de *Hebeloma cylindrosporum* pour les quatre constructions (PPT1.2-1, PPT1.2, PPT1.2-3, PPT1.2-4 fusionnés à la *eGFP*), après culture sur milieux N6 +P et N6 -P.

**Figure 5.** Expression absolue de *HcPT1.1* en logarithme de 10 dans les souches mutantes de *H. cylindrosporum* en culture pure dans un milieu non carencé en P et carencé.

**Figure 6.** Expression absolue du gène codant la *eGFP* sous contrôle des quatre fragments de promoteurs de *HcPT1.2* et du gène endogène *HcPT1.2* dans des souches mutantes de *H. cylindrosporum* en culture pure dans un milieu non carencé en P et carencé.

**Figure 7.** Expression absolue en logarithme de 2 de *HcPT1.1* et de *HcPT1.2* sur trois souches mutantes de *H. cylindrosporum* « knock down », obtenues par l'inactivation du gène d'intérêt *HcPT1.1* par interférence à ARN.

**Figure 8.** Analyse de la qualité des ARNs totaux extraits de *H. cylindrosporum* élicité ou non par *Pinus pinaster*, après 6 heures, 24 heures et 48 heures dans un milieu d'interaction à pH 5,5 et à pH 7,1.

**Figure 9.** Expression relative normalisée par rapport au témoin champignon seul à 0h, de *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* dans les hyphes de *H. cylindrosporum* seul ou élicité par la présence de la plante hôte, *P. pinaster* dans un milieu pauvre en P mimant un espace apoplasmique à pH 5,5.

**Figure 10.** Expression relative normalisée par rapport au témoin champignon seul à 0h, de *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* dans les hyphes de *H. cylindrosporum* seul ou élicité par la présence de la plante hôte, *P. pinaster* dans un milieu pauvre en P mimant un espace apoplasmique à pH 7,1.

**Figure 11.** Représentation schématique des fragments de promoteurs de *HcPT1.2* réprimés par un potentiel répresseur.

**Figure 12.** Carte du vecteur pPZP133 utilisé pour réaliser la fusion transcriptionnelle des fragments du promoteur PPT1.2 à la *eGFP*.

**Figure 13.** Carte du vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) utilisé pour le clonage des fragments du promoteur PPT1.2.





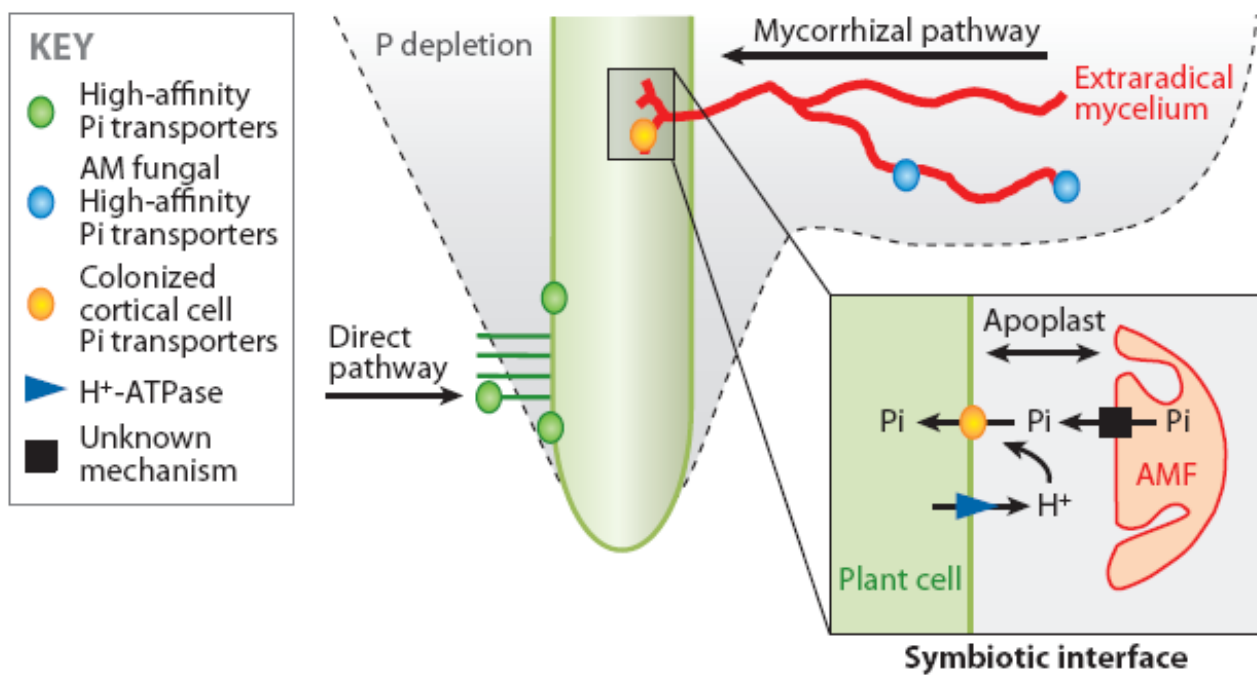
## 1 – Introduction

Le phosphore est un élément essentiel à la croissance et au développement des plantes (Raghothama, 1999). Il est impliqué dans de nombreux processus tels que le métabolisme énergétique, les processus de signalisation, la synthèse des acides nucléiques et des membranes ainsi que la photosynthèse (Schachtman et al., 1998 ; Raghothama, 1999 ; Vance et al., 2003).

Malgré une concentration relativement élevée en P total dans les sols (Schachtman et al., 1998 ; Vance et al., 2003), la disponibilité du phosphore (P) directement assimilable, dans les écosystèmes terrestres et plus particulièrement dans les écosystèmes forestiers, limite la croissance (Bonneau, 1995) et la productivité des plantes (Batjes et al., 1997). Dans le sol, le phosphore est présent sous forme minérale (inorganique) ou organique (Schachtman et al., 1998 ; Condrón et al., 2005 ; Lambers et al., 2008). Les végétaux absorbent le P uniquement sous forme de phosphate inorganique soluble (Pi) présent dans la solution du sol sous la forme d'ions orthophosphate ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) à faible concentration, de 1 à 10  $\mu\text{M}$  (Hinsinger, 2001). Du fait de leur charge négative les ions orthophosphates sont facilement séquestrés par des cations tels que le fer et l'aluminium en condition acide et le calcium et le magnésium en condition alcaline (Hinsinger, 2001 ; Vance et al., 2003), ou par des argiles ce qui conduit à la formation de complexes insolubles dans lesquels le P est peu mobile et donc peu disponible (Hinsinger, 2001). La fraction de P organique constitue souvent la majeure partie du P total (20-80 %) (Schachtman et al., 1998). Dans les composés de P organiques, le groupement phosphate est lié au carbone par une liaison ester R-O-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> (phosphates monoesters : phytate ou inositol 6P, sucres phosphatés...) ou deux liaisons esters R-O-(PO<sub>2</sub>H)-O-R' (phosphates diesters : phospholipides, acides nucléiques...) (Condrón et al., 2005). On distingue également le groupe des phosphoanhydrides organiques caractérisés par la liaison P-O-P comme l'ADP, l'ATP et les polyphosphates (Turner, 2008).

En réponse à de faible disponibilité en P dans la rhizosphère, les plantes ont développé différentes stratégies qui leur permettent d'assimiler les éléments minéraux présents en faible quantité (Raghothama, 1999 ; Vance et al., 2003 ; Lambers et al., 2008 ; Javot et al., 2007 ; Bucher et al., 2007). L'une d'elles consiste à former des **associations symbiotiques** avec des champignons mycorhiziens pour bénéficier de leur capacité accrue à mobiliser et/ou prélever le P (Javot et al., 2007 ; Plassard et Dell, 2010). De nombreuses études ont montré que la formation de mycorhizes se traduit généralement par une amélioration de la nutrition phosphatée de la plante observée dans des expériences menées au laboratoire où il est possible de comparer plantes mycorhizées et non mycorhizées (Chalot et al., 2002 ; Smith et Read 2008).

Dans les conditions naturelles, les arbres vivent en association symbiotique avec des



**Figure 1.** Représentation schématique de l'absorption par les plantes du phosphate inorganique (Pi) du sol à partir de la voie d'assimilation directe et mycorhizienne dans une racine endomycorhizée (tirée de Smith and Smith, 2011).

La voie d'assimilation directe implique les transporteurs de P à haute affinité, localisés au niveau des poils racinaires et des cellules épidermales proche de l'apex racinaires. La voie d'assimilation mycorhizienne implique les transporteurs à haute affinité des champignons spécifiques de la symbiose endomycorhizienne. Le phosphate est ensuite transloqué le long des hyphes intraracinaires dans le cortex racinaire puis transféré au niveau de l'interface symbiotique par un mécanisme d'efflux (carré noirs) du champignon vers l'espace apoplasmique. Finalement, le Pi est assimilé par la plante grâce à des transporteurs préférentiellement, ou spécifiquement exprimés dans les cellules corticales colonisées. Des enzymes H<sup>+</sup>:ATPases sont localisées au niveau de toutes les interfaces où le phosphate est assimilé (pas seulement au niveau de l'interface symbiotique comme montré sur le schéma). Les deux voies d'assimilation peuvent fonctionner de façon simultanées mais il a été observé que la voie mycorhizienne est la voie principale.

champignons via de nouveaux organes appelés les ectomycorhizes (Smith et Read, 2008). Elles sont formées par le développement du champignon à la surface (manteau fongique et hyphes extramatriciels) et dans le cortex (réseau de Hartig) des racines secondaires. Le champignon améliore la nutrition minérale et principalement phosphatée (Torres Aquino et Plassard, 2004) de la plante car il a accès à des ressources inutilisables par la plante grâce à différents mécanismes (Selosse, 2009). Des expérimentations de marquage de Pi (Smith et al., 2003 ; 2004) ont révélé que les plantes mycorhizées possèdent deux voies d'absorption de Pi à partir de la solution du sol (fig. 1). La **voie d'absorption directe** (« Direct pathway ») des ions phosphate implique les transporteurs de P spécifiques des plantes (Muchhal et al., 1996 ; Smith et al., 1997 ; Leggewie et al., 1997 ; Liu *et al.*, 1998 ; Liu et al., 1998 ; Daram et al., 1998 ; Liu et al., 2001 ; Chiou et al., 2001, Smith et Smith, 2011) ; la **voie mycorhizienne** (« Mycorrhizal pathway ») implique les systèmes de transport de P fongique (Smith et Smith, 2011 ; Plassard et Dell, 2010). De façon remarquable, bien que les voies d'absorption puissent fonctionner de façon simultanée, des travaux ont démontré que la voie d'absorption mycorhizienne pouvait contribuer jusqu'à la totalité du P absorbé par la plante mycorhizée (Smith et al., 2004). L'importance de la voie fongique dans l'absorption de Pi est à mettre en relation avec la répression des transporteurs de plante, assurant l'absorption de Pi par les racines non mycorhizées, dans les racines mycorhizées (Liu et al., 1998 ; Rausch et al., 2001 ; Chiou et al., 2001 ; Paszkowski et al., 2002). Ces résultats soulignent donc l'importance de la mycorhization dans le prélèvement de P pour la plante. Les symbioses mycorhiziennes ont donc un rôle positif sur la croissance des plantes, notamment des arbres, dans les écosystèmes pauvres en nutriments (Plassard et al., 1994 ; Torres Aquino et Plassard, 2004). Ainsi, les symbioses ectomycorhiziennes sont des composantes cruciales dans les écosystèmes forestiers.

L'association symbiotique met en jeu divers mécanismes externes, induisant une amélioration de l'exploration ou une modification des caractéristiques des sols permettant une augmentation de la disponibilité du P. Divers mécanismes internes, affectant le transport du P de la solution du sol vers le champignon, puis du champignon vers la plante, sont également mis en jeu.

D'abord, l'association symbiotique, par l'intermédiaire des hyphes extramatriciels reliés aux hyphes du manteau, favorise **l'exploration du sol** (Bolan, 1991 , Ekblad et al., 1995 ; Van Tichelen et Colpaert, 2000). Le volume de sol exploré grâce aux hyphes externes, parfois regroupés en cordons mycéliens, appelés rhizomorphes est plus important que le volume de sol exploré par le seul système racinaire de l'arbre. La petite taille des hyphes leur confère un ratio surface/biomasse fongique considérablement plus élevé que celle des racines, propice à augmenter l'interface entre le sol et la plante. Les hyphes permettent l'exploration de microsites inaccessibles aux racines et ainsi

de surmonter la zone d'appauvrissement en Pi qui s'établit rapidement autour des racines (fig. 1).

Le champignon est capable d'améliorer la **biodisponibilité des éléments minéraux**, dont le P, grâce à la sécrétion d'acides organiques, de protons et d'enzymes de type phosphatase (Bolan, 1991 ; Plassard et Dell 2010). La solubilisation du Pi insoluble en Pi soluble (Courty et al., 2010) est possible par la sécrétion d'acides organiques de faibles poids moléculaires et de protons (Casarin et al., 2003 ; Arvieu et al., 2003 ; Casarin et al., 2004). Le champignon mycorhizien peut également minéraliser le P organique en P inorganique (Liu et al., 2004) grâce à la sécrétion de phosphatases acides (Louche et al., 2010) qui coupent les liaisons ester reliant les groupements P aux groupements C.

Le phosphate est ensuite absorbé par le champignon dans le mycélium extraradriculaire grâce à des transporteurs d'influx de type **H<sup>+</sup> :Pi à haute affinité** (Plassard et Dell, 2010), homologues aux transporteurs de P de plante de la famille Pht1 (Bucher et al., 2001). Certains de ces transporteurs ont déjà été identifiés chez trois champignons endomycorhiziens, *Glomus versiforme* (Harrison et van Buuren, 1995), *Glomus intraradices* (Maldonado-Mendoza et al., 2001) et *Glomus mosseae* (Benedetto et al., 2005) et un champignon ectomycorhizien, *Hebeloma cylindrosporum* (Tatry et al., 2009). Les ions Pi absorbés sont ensuite incorporés dans le pool de Pi cytoplasmique puis accumulés dans les vacuoles des hyphes extraradiculaires, lorsque la concentration en Pi cytoplasmique est suffisante pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Ezawa et al., 2002), où il est stocké sous forme de **polyphosphate** (PolyP) (Ezawa et al., 2003). Les vacuoles contenant les polyphosphates peuvent être transloqués des hyphes extraradriculaire aux hyphes intraradiculaires grâce à un système de vacuoles tubulaires motiles (Rees et al., 1994 ; Uetake et al., 2002 ; Ashford et Allaway, 2002). Dans ce système, des groupes de vacuoles sont interconnectés par un réseau de tubules le long duquel les vacuoles seraient mobiles (Hyde et al., 1997).

Les ions Pi provenant de l'hydrolyse des polyP doivent ensuite traverser la membrane plasmique fongique pour atteindre l'espace apoplasmique, comme illustré dans la figure 1. Le transfert de Pi du champignon à la plante a été démontré grâce à l'utilisation d'une source de P marquée, uniquement utilisable par le champignon (Pearson et al., 1992 ; Pearson et Jakobsen 1993 ; Maldonado-Mendoza et al., 2001). Le phosphate présent au niveau de l'espace apoplasmique est ensuite absorbé par la plante grâce à des transporteurs H<sup>+</sup> :Pi de la famille Pht1 (Bucher et al., 2007). Des études réalisées sur les endomycorhizes (Bucher et al., 2007), ont montré que de nombreux transporteurs de plantes étaient spécifiquement régulés en contexte symbiotique. Certains de ces transporteurs sont induits pendant la mycorhization (Karandashov et al., 2004 ; Nagy et al., 2005 ; Nagy et al., 2006), alors que d'autres sont spécifiquement exprimés dans ce contexte (Rausch et al., 2001 ; Paszkowski et al., 2002 ; Harrison et al., 2002 ; Nagy et al., 2005 ; Javot et al., 2007).

L'activité des systèmes de transport de la plante pourrait être couplée à l'acidification du compartiment apoplasmique par l'activité des **ATPases membranaires** végétales abondantes dans les cellules corticales contenant des arbuscules (Gianinazzi-Pearson et al., 1991 ; Gianinazzi-Pearson et al., 2000), ce qui favoriserait la réabsorption du Pi apoplasmique par les systèmes de transport de la plante (fig. 1).

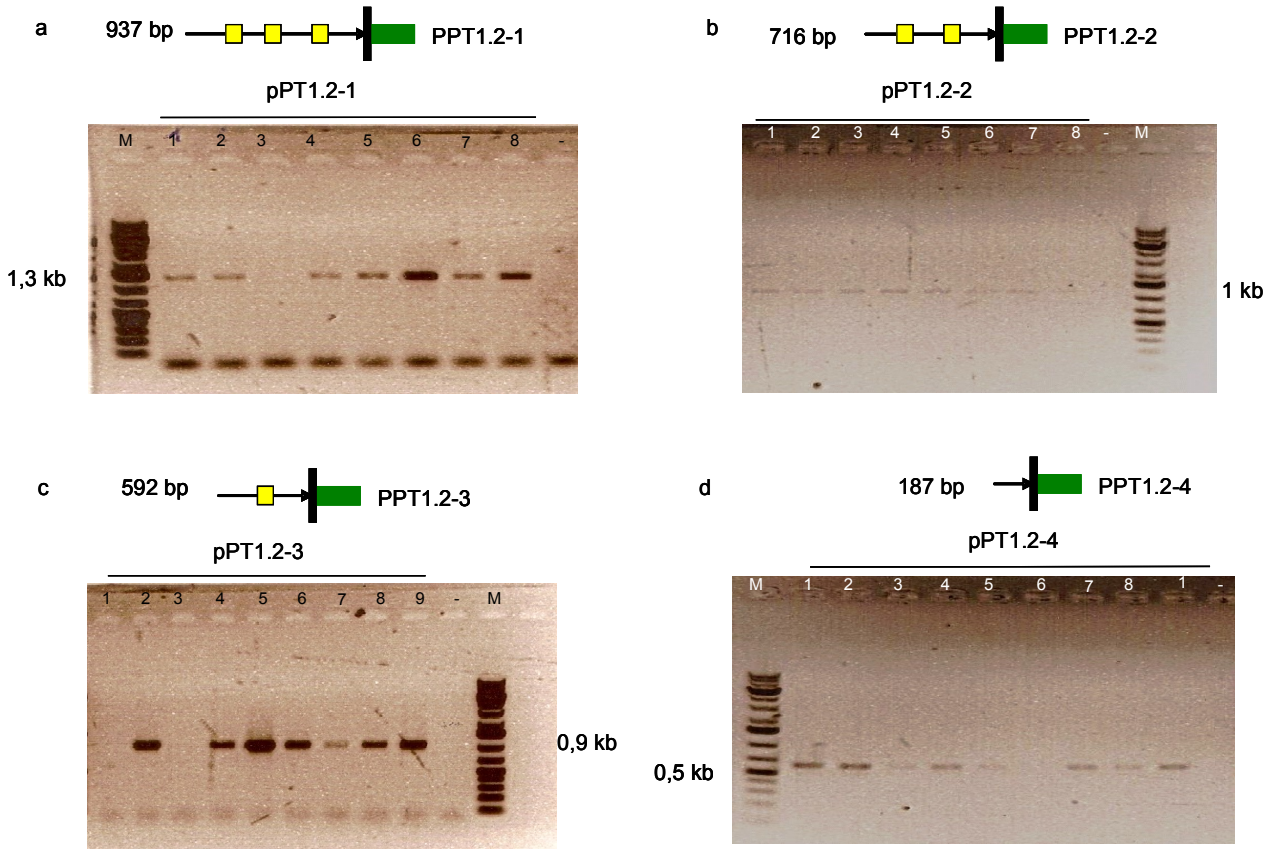
Cependant, malgré l'importance physiologique de l'**efflux** de P à partir de la cellule fongique, les mécanismes moléculaires responsables de la sortie de Pi vers l'espace apoplasmique restent inconnus (fig. 1). Les hypothèses qui peuvent expliquer un efflux de P sont (i) une régulation différentielle de l'expression des transporteurs fongiques entre hyphes extra- et intra-radiculaires et/ou (ii) une régulation de l'activité des transporteurs par le pH du compartiment apoplasmique.

En effet, les données obtenues dans la levure ont montré que son système de transport H<sup>+</sup>:Pi à haute affinité (pho84) transportait le Pi dans les deux sens selon le gradient de concentration en Pi et en protons de part et d'autre de la membrane plasmique (Fristedt et al. 1996). Les **gradients locaux de pH** dans l'espace apoplasmique pourraient probablement énergiser les efflux de Pi si le pH proche de la membrane fongique est plus alcalin que celui proche de la membrane végétale. Cependant, il est très difficile d'avoir accès aux conditions qui règnent dans l'apoplasme des mycorhizes. Une approche, utilisée au laboratoire (Torres-Aquino, 2003), a consisté à incuber dans une solution commune (tamponnée à pH 5,5) les hyphes d'un champignon ectomycorhizien modèle, *Hebeloma cylindrosporum*, avec les racines de sa plante-hôte, le pin maritime. Cette stratégie a permis de mettre en évidence que la plante augmentait fortement les efflux de P<sup>32</sup> préalablement accumulé dans les hyphes, vers la solution et la plante au cours d'une cinétique de 48 h (Torres-Aquino, 2003). Ces données suggèrent qu'un **dialogue** s'établit entre le champignon et la plante, dialogue qui conduirait à l'hydrolyse des polyphosphates fongiques et à la libération de Pi dans le milieu observées dans le champignon (Tores-Aquino, 2003).

Au cours de mon stage, j'ai donc utilisé la même association modèle entre le pin maritime (*Pinus pinaster* Soland in Ait.) et le basidiomycète ectomycorhizien, *H. cylindrosporum*, afin d'obtenir des données expérimentales concernant les **mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert unidirectionnel de P** ou des composés phosphatés des cellules fongiques de l'interface vers la cellule hôte et les facteurs susceptibles de modifier cet efflux de Pi. Le choix de cette espèce fongique est particulièrement judicieux car on dispose de nombreux outils qui sont (i) le séquençage complet de son génome mis à la disposition de la communauté scientifique fin 2011 (<http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/pages/projects.jsf>) et (ii) sa capacité à être transformé génétiquement par *Agrobacterium tumefaciens* (Comber et al., 2003). De plus, cette espèce fongique présente l'avantage de bien se cultiver sur milieu synthétique, d'établir facilement des

GAGTCGGTTCAAAAGTCGACTAAGC GAGTATCTTGATGAGCCACACGGTCCGTTGATTTTCCCGGTCAAGG  
 CAACGTCTGAGAGCCC GG **GTTACCTGGAG** CATATCATA CAGTGGAAACCCATCGTGTTGCACTCTATGTA  
 AGTTACTTGAATACACCTCCTTTCCCTCCCTCCTTCCCTTCCCTTTTCGGGAATTTATTTTCTTTTAATTTAAT  
 TTAT **GCCACAGACACCAGTATCCG** GCCCTAATTAATCATT CATGTATAATCTCAGAATGTATCAGTA **GTTCATC**  
**GAGG** AATATATTGTGAATGAAATTGAAGATTAGATTTAAAATACATTCCATTAT **CCATTACCCGATGATCCACT**  
**CAT** TAATAACAATTGATCTATTCCACGGCATCTTCTACGTCTCTTACAAATTATATAAGCCAATGCTCCCAGTG  
 ATAATACCCATTTCCGTCCAGGAATCGTGGAATTTTATACAAATGGCGAATAATTCGCGGCATTGCATCGCCA  
 GGCACGGACATCCCTCAGAATTATGTTTACAGGTGTGTATGCTCAAGGAAATCCGCTTTTATCAGATCCCC  
 CCATTTTAACGAGGCTAGGCACGTATGTGTTTTCTCGTTTCCCTTGTGCGCTGGATTATTGGAAAGAGGTTT  
 ATCAGATTAGATTGGATTAGATAAATCGAGTGATGGGTTCTTGCTGTCAAGTTGATCGGCGTGATGAAAA **GT**  
**TCAAGGAGG** TTTGAGAAGTTCCGA **ACAAACGACCTTCGACATACC** ACCATAGCGAGTGAATGGTGGAAC  
 ACAAACACCATTGGCGGTCTCAAATACTCGTGGACTGGCACGCTTACATGCGTGAGAATAGCTGGACCC  
 TCTTCAAAGCTCAGGGCGGTCTTGGGACAGTCTTGTCGCAGG **CCAACTACTCGACAGTATCCAGG**

**Figure 2.** Analyse in silico de la région promotrice du gène *HcPT1.2*. Les boîtes jaunes correspondent à des domaines potentiels de régulation au phosphate (Sola-Landa et al., 2005). La délétion du promoteur PPT1.2 a été réalisée grâce aux amorces en bleu correspondant aux amorces forward et en rouge pour l'amorce reverse.



**Figure 3.** Vérification par une réaction PCR de la présence des constructions, (PPT1.2-1, PPT1.2-2, PPT1.2-3, PPT1.2-4 fusionnés à la *eGFP*), dans le génome des souches mutantes de *Hebeloma cylindrosporium*. Les produits PCR sont analysés par un gel d'agarose à 1 %. **a.** Amplification des fragments PPT1.2-1 fusionnés à la *eGFP*. **b.** Amplification des fragments PPT1.2-2 fusionnés à la *eGFP*. **c.** Amplification des fragments PPT1.2-3 fusionnés à la *eGFP*. **d.** Amplification des fragments PPT1.2-4 fusionnés à la *eGFP*. Le contrôle négatif (-) correspond à une souche de *H. cylindrosporium* ayant incorporée un ADN-T vide. La piste M correspond à la migration du marqueur de taille « 1 kb plus ladder » (Fermentas).

ectomycorhizes avec les racines des arbres et son cycle reproductif est bien maîtrisé au laboratoire (Marmeisse et al., 2004).

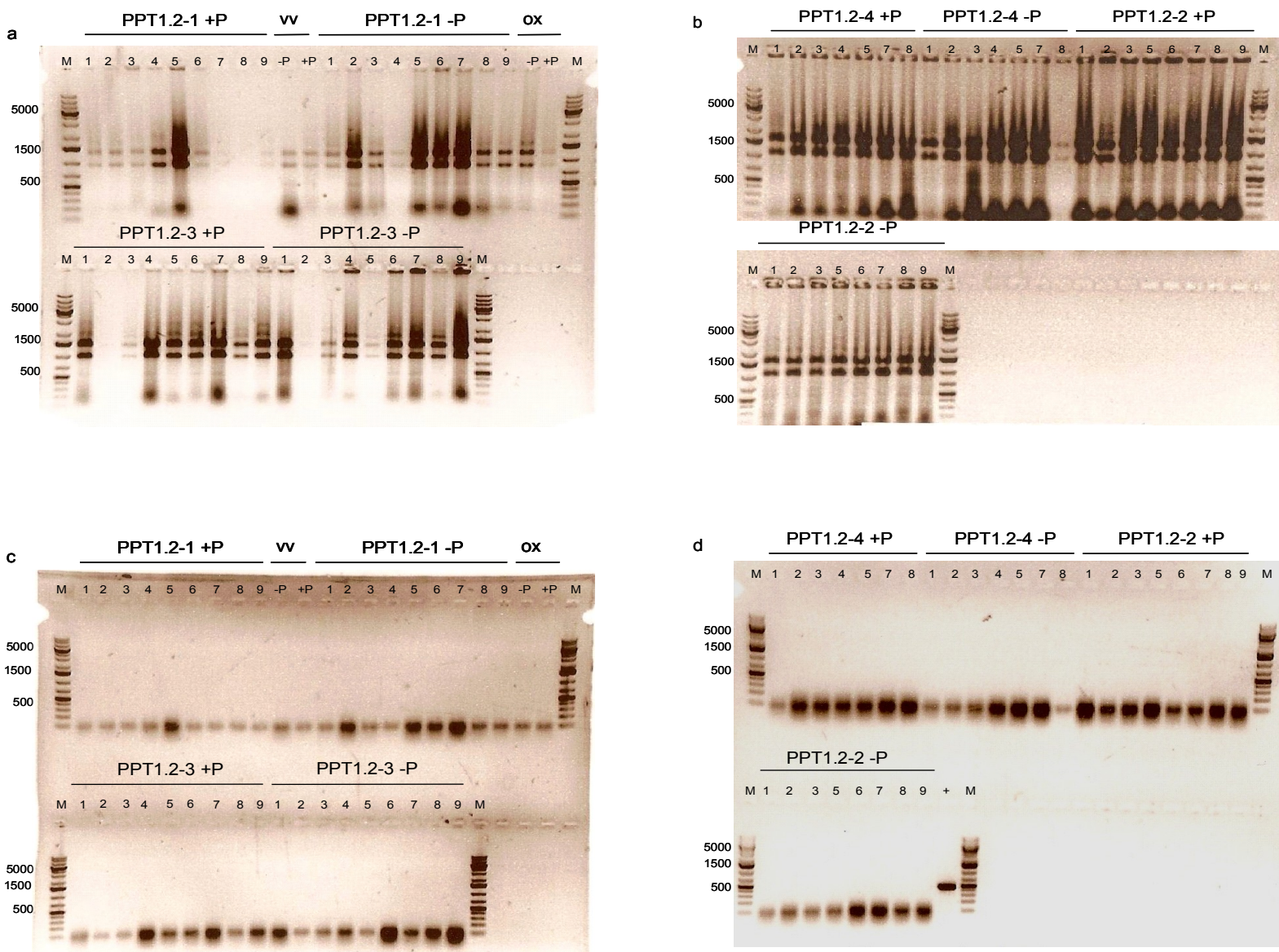
Les premières données moléculaires sur le transport de P chez cette espèce fongique ont permis d'identifier deux transporteurs de H<sup>+</sup> :Pi (HcPT1 et HcPT2, Tatry et al., 2009). L'exploration du génome a permis de mettre en évidence un troisième transporteur de H<sup>+</sup> :Pi proche de HcPT1 (que nous avons appelé HcPT1.2, HcPT1 ayant été renommé HcPT1.1).

L'objectif général de mon stage est de déterminer le rôle potentiel de ces trois transporteurs de phosphate, **HcPT1.1**, **HcPT1.2** et **HcPT2** dans les flux de P des cellules fongiques en cherchant à comprendre le rôle de facteurs tels que la disponibilité en Pi, la présence de la plante et l'influence du pH sur leur expression. Plus spécifiquement, **ce travail présente deux objectifs**. Le premier a consisté à étudier la régulation potentielle du promoteur du gène *HcPT1.2* en réponse à la concentration extérieure en Pi. En effet, l'analyse *in silico* du promoteur de ce gène a permis d'identifier trois séquences qui seraient régulées par la concentration en Pi. Pour cela, le promoteur a été délété et fusionné à une cassette codant pour une protéine fluorescente, la eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Le deuxième objectif a consisté à déterminer le niveau d'expression des trois gènes (*HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2*) par RT-PCR quantitative dans les hyphes du champignon préalablement « élicitées » *in vitro* par la présence de racines de pin maritime dans une solution commune mimant l'espace apoplasmique de l'interface cellules fongiques/cellules hôte à deux valeurs de pH.

## 2 – Résultats

### 2.1 - Quantification de l'expression de la *eGFP* sous le contrôle du promoteur *PPT1.2* en réponse au phosphate

Des domaines de régulation au phosphate (PHO-box) ont été mis en évidence chez la bactérie filamenteuse *Streptomyces coelicolor* (Sola-Landa et al., 2005). L'analyse *in silico* de la région promotrice du gène *HcPT1.2* a mis en évidence la présence de trois domaines PHO-box like très conservés par rapport à la séquence décrite par Sola-Landa (2005). L'analyse des promoteurs des gènes *HcPT1.1* et *HcPT2* ont également été réalisée (résultats non montrés). Le promoteur *PPT1.1* possède une PHO-box like et il a été montré que son expression est régulée par la carence en phosphate (Tatry et al., 2009). De plus, le promoteur de *HcPT2*, exprimé de façon constitutive chez *H. cylindrosporum* (Tatry et al., 2009) en milieu plus ou moins riche en phosphate, ne possède pas de PHO-box like. Ces observations pourraient laisser supposer que le gène *HcPT1.2*, comme *HcPT1.1*, pourrait être régulé par la concentration en phosphate du milieu grâce à ces domaines de



**Figure 4.** Analyse de la qualité des ARN totaux des transformants de *Hebeloma cylindrosporum* pour les quatre constructions (PPT1.2-1, PPT1.2-2, PPT1.2-3, PPT1.2-4 fusionnés à la *eGFP*), après culture sur milieux N6 +P et N6 -P. **a. et b.** Migration des ARNs extraits de PPT1.2-1 et PPT1.2-3 (a) et de PPT1.2-2 et PPT1.2-4 (b) en +P et -P sur un gel d'agarose à 1 % pendant 1 heure à 50 mV. **c. et d.** Analyse par PCR de l'absence d'ADN génomique dans les ARNs totaux extraits des transformants PPT1.2-1 et PPT1.2-3 (a) et PPT1.2-2 et PPT1.2-4 (b) en +P et -P à partir d'amorces ciblant le gène de la tubuline après traitement par une DNase (Fermentas). Les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1 %. Le contrôle positif correspond à une amplification du gène de la tubuline sur 1  $\mu$ L d'ADN génomique de h7. Les pistes vv correspondent à une souche de *H. cylindrosporum* ayant incorporée un ADN-T vide. Les pistes ox correspondent à une souche de *H. cylindrosporum* surexprimant la *eGFP*. La piste M correspond à la migration du marqueur de taille « 1 kb plus ladder » (Fermentas).

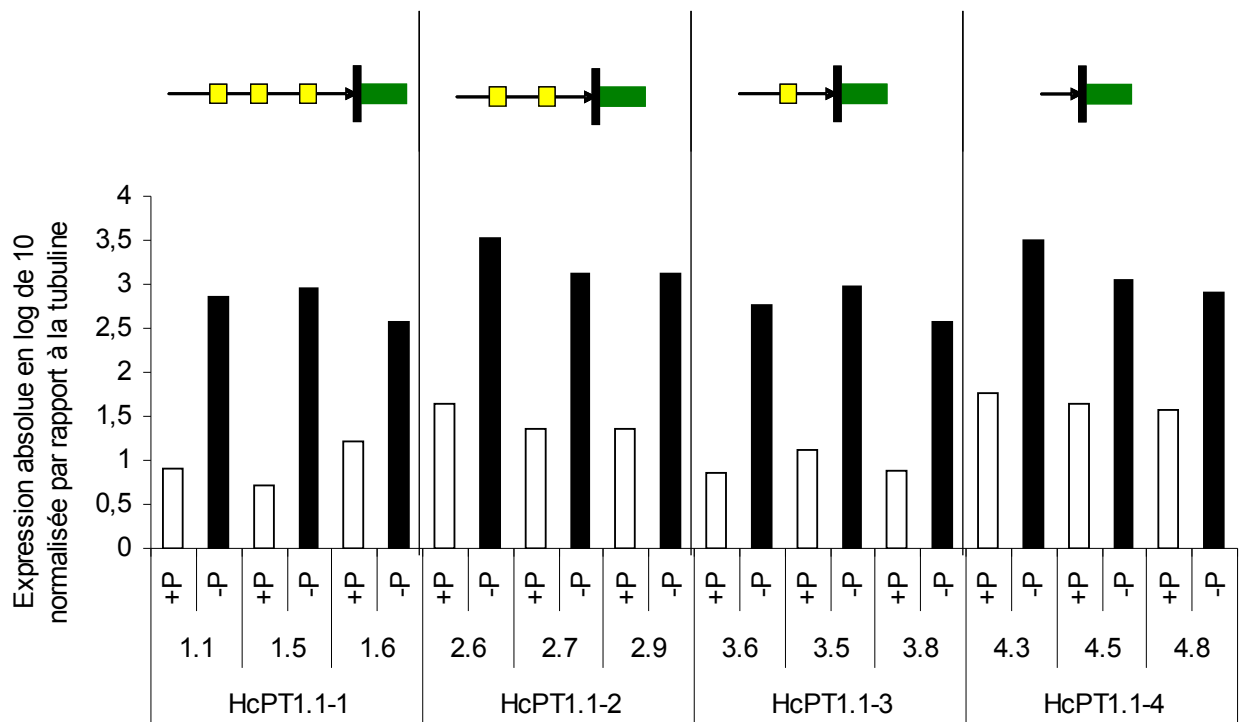
régulation.

La délétion du promoteur a été réalisée de part et d'autre de ces trois PHO-box like grâce à quatre couples d'amorces (fig. 2) qui amplifient la séquence promotrice de *HcPT1.2* à partir d'une banque d'ADN génomique de *H. cylindrosporium*. Le premier fragment (PPT1.2-1), de 937 bp, correspond au promoteur complet avec ses trois domaines potentiels de régulation. Le deuxième fragment (PPT1.2-2), de 716 bp, ne contient que deux PHO-box like et le troisième fragment (PPT1.2-3), de 592 bp, une seule. Finalement, le dernier fragment, de 184 bp, correspond à la fin de la séquence promotrice (PPT1.2-4), et ne possède aucune séquence de régulation.

Pour mettre en évidence une régulation potentielle de *HcPT1.2* au phosphate et identifier les séquences régulatrices, les différents fragments sont fusionnés à la *eGFP* (enhanced Green Fluorescent Protein) dans le vecteur pPZP133 (Ngari et al., 2009). Le champignon est ensuite transformé via *Agrobacterium tumefaciens* (Combier et al., 2003) afin d'obtenir des souches mutantes exprimant la *eGFP* sous le contrôle de chacun des quatre fragments de promoteur. Pour chaque construction, 8 ou 9 transformants ont été sélectionnés et mis en culture sur des milieux plus ou moins riche en P (3 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ou 0,05 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

L'insertion des constructions dans l'ADN génomique de *H. cylindrosporium* a été vérifiée par une réaction PCR réalisée à partir des amorces ciblant chaque fragment de promoteur et la cassette codant pour la *eGFP*. Les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % (fig. 3) et leur analyse montre que globalement, le pourcentage de transformants ayant intégré la construction est très élevé. En effet, il varie de 88,8 % (8 sur 9 transformants positifs pour la quatrième construction, fig. 3d) à 77,7 % (7 sur 9 positifs pour la troisième construction, fig. 3c), ce qui confirme l'efficacité du système de transformation du champignon. D'un autre côté, les transformants qui se sont développés sur la carboxine sans avoir intégré la construction (et donc la résistance à la carboxine) ont pu acquérir une résistance spontanée à cet antibiotique.

Après 72 heures de carence en phosphate, les ARNs totaux des vrais transformants sont extraits et leur qualité est vérifiée (fig. 4). Premièrement, les ARNs sont mis à migrer pendant une heure à 50 mV afin de vérifier qu'ils ne se soient pas dégradés (fig. 4a et b). Pour la presque totalité des ARNs extraits, le gel permet de distinguer clairement des bandes correspondants aux ARNs ribosomiques, Les seules exceptions sont les profils obtenus pour la souche 8 en milieu +P et la souche 2 en milieu +P et -P (fig. 4a). Le dosage de la concentration en acides nucléiques au NanoDrop 1000 montrent que les concentrations obtenues pour ces deux souches sont très faibles (résultats non présentés). Les ARNs extraits des souches mutantes ne sont donc pas dégradés mais ceux dont les concentrations sont trop faibles sont éliminés. Deuxièmement, pour vérifier que les ARNs extraits ne sont pas contaminés par de l'ADN génomique, une analyse par PCR est réalisée



**Figure 5.** Expression absolue de *HcPT1.1* en logarithme de 10 dans les souches mutantes de *H. cylindrosporum* en culture pure dans un milieu non carencé en P (barres blanches) et carencé (barres noires). Pour chaque construction, 3 transformants ont été choisis par rapport au gène *HcPT1.1*, utilisé comme contrôle de la carence. Les valeurs sont normalisées par rapport au gène de la tubuline, utilisé comme gène de référence.

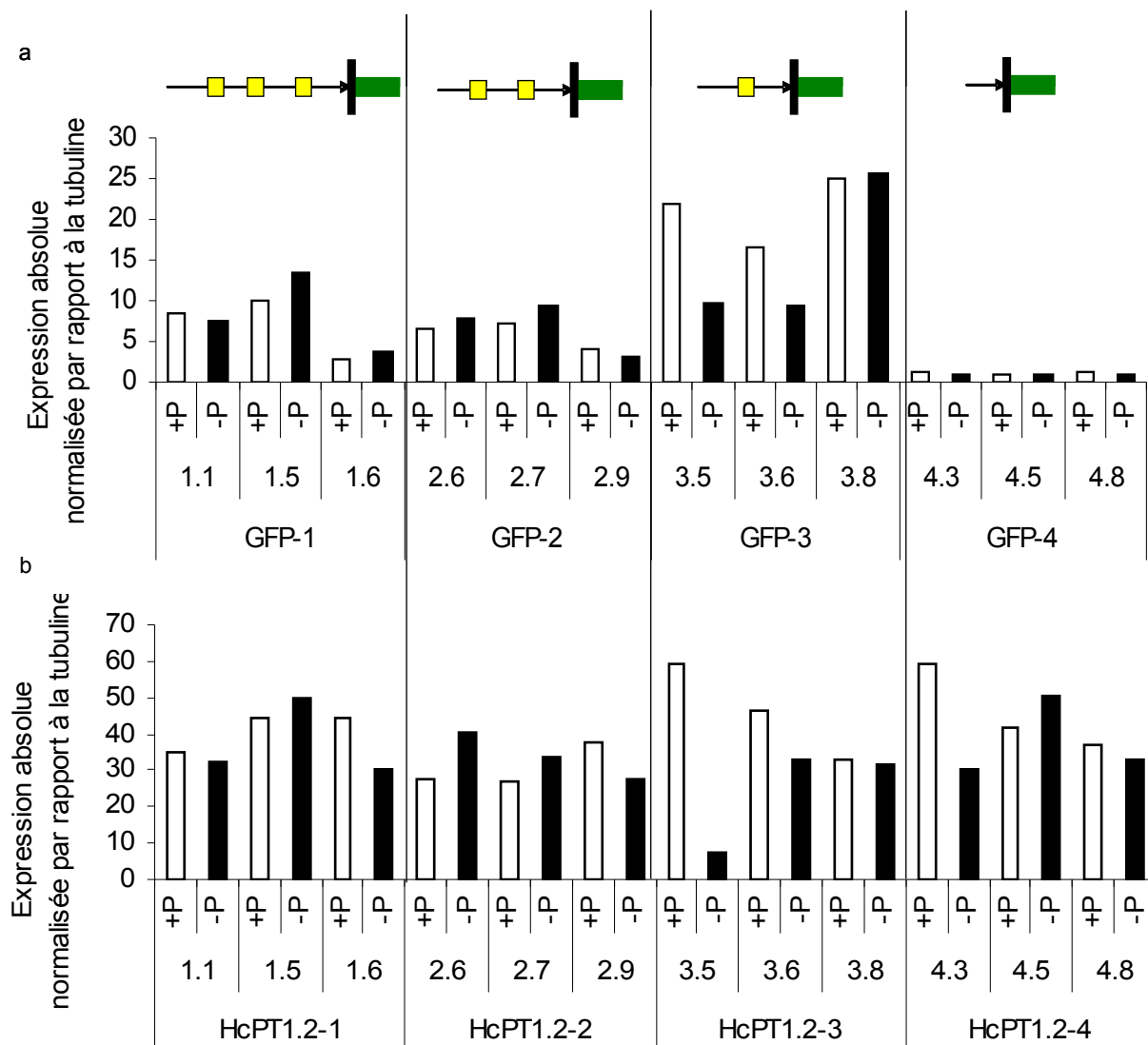
sur les ARNs extraits de chaque transformant en ciblant le gène de la tubuline. Les produits PCR sont déposés sur un gel à 1 % d'agarose (fig. 4c et d), où aucune amplification n'est observée, ce qui confirme l'absence de contamination ADN.

Dans un premier temps, l'expression du gène endogène *HcPTI.1* a été quantifiée par RT-PCR quantitative pour les différents transformants de *H. cylindrosporum*, après 3 jours de carence. Ce gène est utilisé comme contrôle interne afin de vérifier que les milieux -P dans lesquels les transformants sont mis en culture sont véritablement carencés. En effet, les résultats obtenus par Tatry (2009) ont déjà mis en évidence que *HcPTI.1* est fortement surexprimé dans des thalles carencés en phosphate. La figure 5 présente l'expression absolue de *HcPTI.1* en logarithme de 10 chez les trois souches mutantes choisies par rapport à ce gène, en condition plus ou moins P. Les souches ne sont pas carencés de façon homogènes, mais pour tous les transformants, l'expression de *HcPTI.1* chez les thalles en condition +P est très faible (log de 10 inférieur à 2) et augmente de façon très importante jusqu'à atteindre un logarithme de 10 égale à 3,5 lorsque le champignon est fortement carencé.

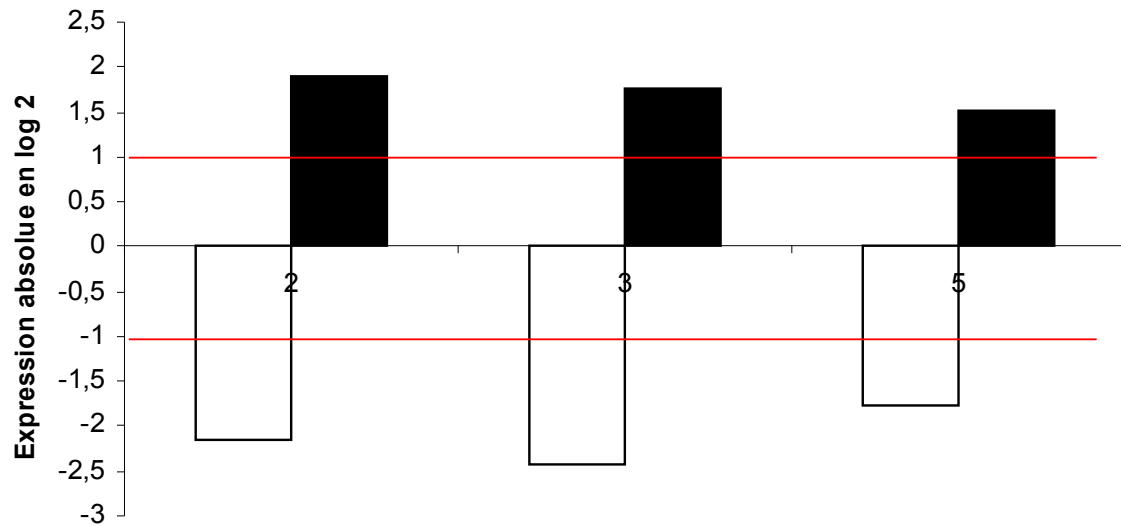
Dans un deuxième temps, l'expression absolue de la *eGFP* (fig. 6a) sous le contrôle des quatre fragments du promoteur *HcPTI.2* ainsi que celle du gène endogène *HcPTI.2* (fig. 6b) ont été mesurées (fig. 6). Tout d'abord, les données obtenues montrent que l'expression de la *eGFP* n'est pas affectée par la concentration extérieure en phosphate inorganique lorsqu'elle est fusionnée aux fragments 1 et 2. Pour le fragment 3, l'expression de la *eGFP* semble légèrement induite chez les transformants en condition +P par rapport à la condition -P mais ces variations restent faibles si on les compare à celles mesurées pour *HcPTI.1* (fig. 5). En ce qui concerne le gène endogène, son expression est relativement constante entre des milieux plus ou moins riche en P à part pour le transformant 3.5, qui est très différent de tous les autres. Ces résultats indiqueraient que *HcPTI.2* n'est pas régulé par la concentration en phosphate du milieu après 3 jours de carence.

L'expression de la *eGFP* a ensuite été comparée pour chaque fragment de promoteur (fig. 6a). Les résultats obtenus semblent mettre en évidence trois tendances. Lorsque la *eGFP* est sous le contrôle du promoteur entier ou du deuxième fragment, son expression est assez faible, au environ de 10. Par contre, lorsqu'elle est fusionnée au troisième fragment, son expression est induite d'un facteur 2 en condition +P chez les transformants 3.4 et 3.5 et en condition plus et moins P chez le transformant 3.8. Finalement, lorsque la *eGFP* est fusionnée au quatrième fragment du promoteur, elle n'est plus transcrite. Cette partie du promoteur n'est suffisante pour induire l'expression du gène.

De façon générale, la comparaison des graphiques concernant l'expression absolue de la *eGFP* et du gène endogène *HcPTI.2* montre que la quantité de transcrit correspondant à la *eGFP* est nettement plus faible, d'un facteur 4 en moyenne, que celle obtenue pour *HcPTI.2*.



**Figure 6.** Expression absolue du gène codant la eGFP sous contrôle des quatre fragments de promoteurs de *HcPTI.2* (a) et du gène endogène *HcPTI.2* (b) dans des souches mutantes de *H. cylindrosporum* en culture pure dans un milieu non carencé en P (barres blanches) et carencé (barres noires). Pour chaque construction, 3 transformants ont été choisis par rapport au gène *HcPTI.1*, utilisé comme contrôle de carence. Les valeurs sont normalisées par rapport au gène de la tubuline, utilisé comme gène de référence.



**Figure 7.** Expression absolue en logarithme de 2 de *HcPTI.1* (barres blanches) et de *HcPTI.2* (barres noires) sur trois souches mutantes (2, 3 et 5) de *H. cylindrosporum* « knock down », obtenues par l'inactivation du gène d'intérêt *HcPTI.1* par interférence à ARN. Les transformants ont été mis en culture dans un milieu carencé en P. Les valeurs sont normalisées par rapport à une souche de *H. cylindrosporum* en culture pure dans un milieu carencé en P, ayant incorporée un vecteur vide. Les valeurs sont normalisées par rapport au gène de la tubuline, utilisé comme au gène rapporteur.

Les variations d'expression, relativement importantes, entre les différents transformants (fig. 6a) pourraient être dues au lieu d'insertion de l'ADN-T ou au nombre de copie présentes dans le génome de *H. cylindrosporum*. Il convient de noter que ces résultats ont été obtenus à partir de 8 transformants dont le fond génétique est différent, et aucune répétition n'a été réalisée. Ces résultats devront être confirmés à partir de trois transformants choisis et répliqués biologiquement.

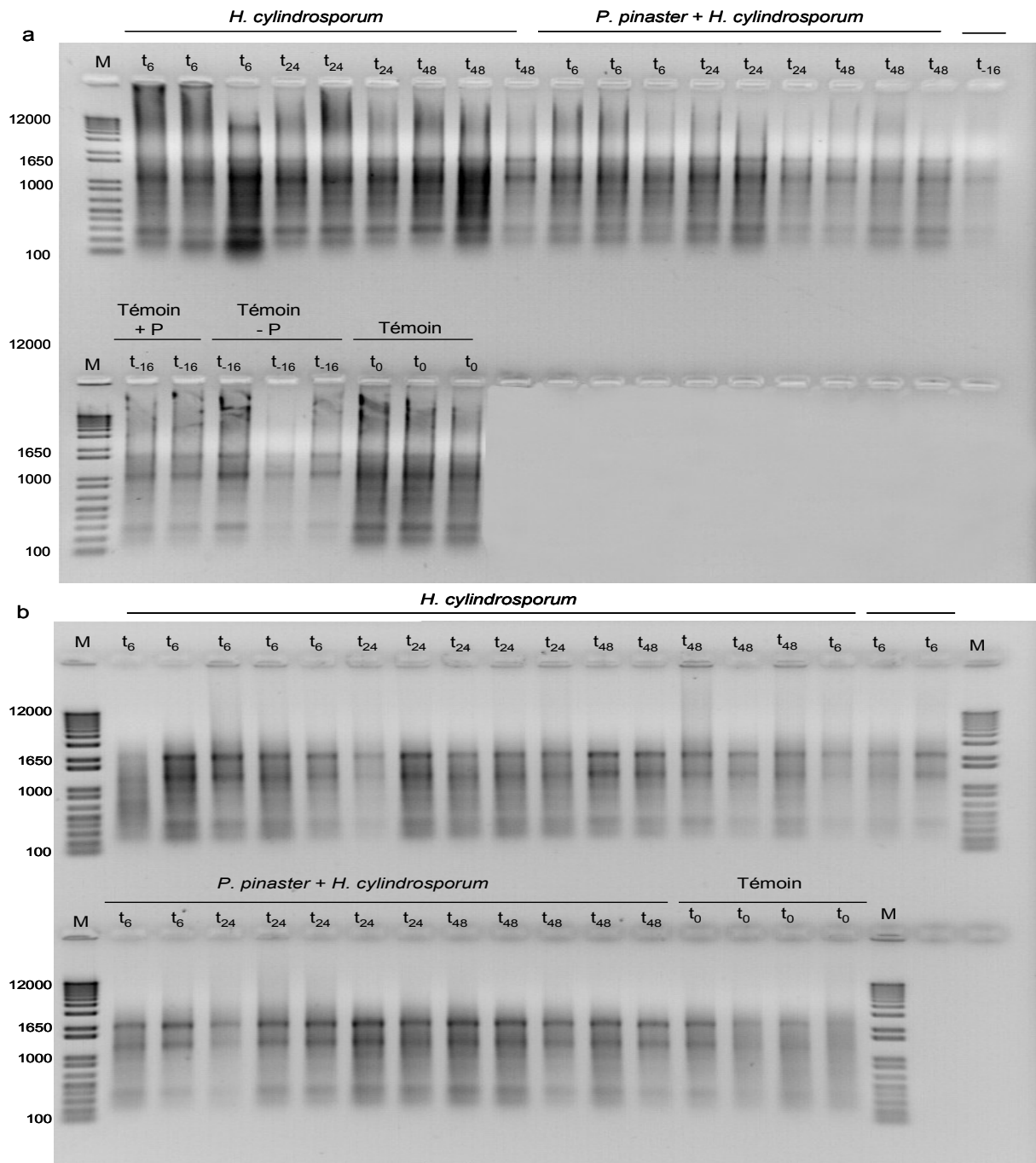
Finalement, l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle entre les gènes *HcPT1.1* et *HcPT1.2* a été étudiée en quantifiant l'expression de *HcPT1.2* dans trois souches mutantes de *H. cylindrosporum Hcpt1.1*, obtenues par Kevin Garcia, doctorant à BPMP, (fig. 7) et cultivées dans un milieu carencé en P (fig. 7). Ces souches correspondent à des mutants « knock down », obtenus par l'inactivation du gène d'intérêt *HcPT1.1* par ARN à interférence (Kemppainen & Pardo, 2009). Les expressions de *HcPT1.1* et de *HcPT1.2* sont normalisées par rapport à une souche de *H. cylindrosporum*, transformée par un vecteur vide et carencée en P, et exprimées en logarithme de 2. Lorsque l'expression à un logarithme de 2 est égal à 1 ou -1, le gène est respectivement surexprimé ou inhibé d'un facteur 2. A partir de cette valeur, le gène est considéré comme véritablement régulé.

L'expression normalisée des mutants RNAi *Hcpt1.1* en culture pure dans un milieu -P, montre que le gène *HcPT1.1* est effectivement réprimé (fig. 7). Les trois souches présentent une expression en log de 2 inférieure à 1. Chez ces mutants, l'expression en logarithme de *HcPT1.2* est induite d'un facteur 2. Il semblerait qu'il existe effectivement une redondance fonctionnelle entre *HcPT1.1* et *HcPT1.2*, du moins en culture pure. L'expression de *HcPT2* n'est pas affectée chez ces mutants (résultats non montrés).

## **2.2 – Quantification de l'expression de *HcPT1.2* et des autres transporteurs de Pi en réponse à *Pinus pinaster* et au pH**

L'expression des gènes de *H. cylindrosporum*, codant pour les trois transporteurs de phosphate, *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* a été suivie au cours d'une cinétique d'incubation dans un milieu sans phosphate et sans source de carbone exogène, en absence ou en présence de *Pinus pinaster*. Pour cela, les hyphes du champignon sont incubés seuls ou en présence des racines de pin maritime dans des seringues contenant un « milieu d'interaction », mimant un espace apoplasmique, à pH 5,5 ou à 7,1 pour trois temps d'incubation, 6h, 24h et 48h. L'expérience est réalisée à deux pH, l'un plus acide que le pH cytosolique du champignon (pH 6,5 : Torres-Aquino, 2003) et l'autre plus basique, car la valeur du pH de l'espace apoplasmique en contexte symbiotique est inconnue. Cette expérience permet de tester l'influence de la plante et du pH sur l'expression des gènes codant pour les transporteurs de phosphate.

Les ARNs totaux sont extraits à partir de trois des cinq répliqués à pH 5,5 et des cinq



**Figure 8.** Analyse de la qualité des ARNs totaux extraits de *H. cylindrosporium* élicité ou non par *Pinus pinaster*, après 6 heures, 24 heures et 48 heures dans un milieu d'interaction à pH 5,5 (a) et à pH 7,1 (b). Le témoin correspond au champignon seul au temps 0, après rinçage des thalles. La piste M correspond à la migration du marqueur de taille « 1 kb plus ladder » (Fermentas).

réplicats à pH 7,1. La qualité des ARNs est vérifiée sur un gel d'agarose à 1 % (fig. 8a et b). Pour chaque profil correspondant aux ARNs extraits des thalles à pH 5,5 (fig. 8a) et à pH 7,1 (fig. 8b), plusieurs bandes assez nettes identifient la présence des ARNs ribosomiques, ce qui signifie que les ARNs n'ont pas été dégradés.

Les niveaux d'expression des gènes codant pour les trois transporteurs ont été quantifiés par RT-qPCR chez les champignons seuls ou élicités par la présence de la plante dans un milieu à pH 5,5 (fig. 9) ou à pH 7,1 (fig. 10). Les résultats obtenus sont tout d'abord normalisés par rapport au gène de la tubuline, utilisé comme gène de ménage.

Les figures 9a et 10a présentent les résultats d'expression relative obtenues pour *HcPT1.1* normalisé par rapport à la condition champignon seul au temps 0h. A pH 5,5 (fig. 9a), l'expression de *HcPT1.1* chez le champignon élicité par la plante est constante au cours du temps. Lorsque la valeur du pH est de pH 7,1 (fig. 10a), *HcPT1.1* est surexprimé de façon significative à 24h d'un facteur 4,4 et à 48h d'un facteur 4,6. Pour cette valeur de pH, l'expression de *HcPT1.1* semble régulée par la présence de la plante.

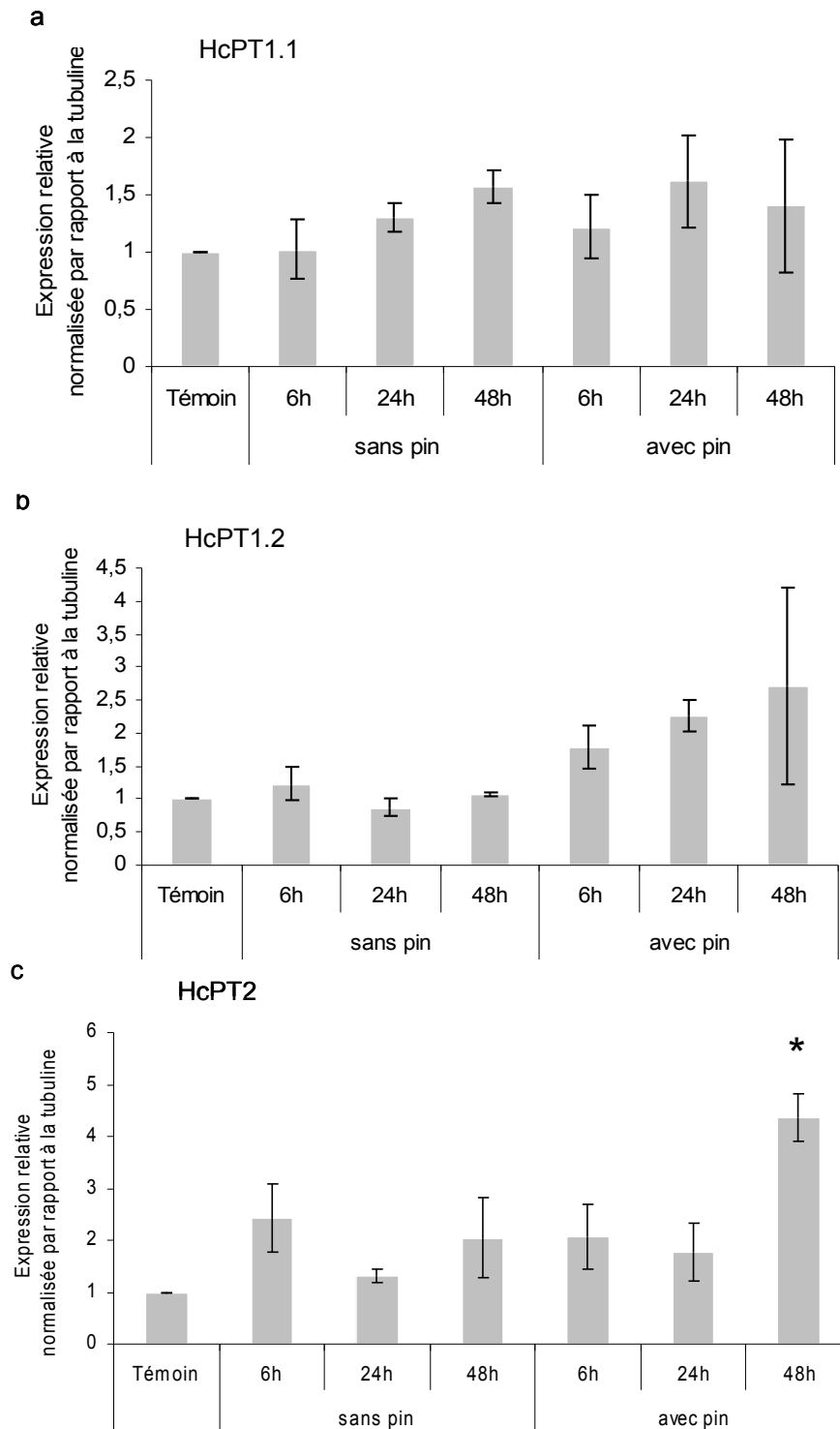
En ce qui concerne *HcPT1.2*, la quantité de transcrite chez le champignon élicité par la présence de la plante ne présente pas de variation significative par rapport au champignon seul pour aucune des deux conditions de pH (fig. 9b et 10b). *HcPT1.2* n'est pas régulé par la présence du pin maritime.

Finalement, les figures 9c et 10c montrent que l'expression de *HcPT2* est induite de façon significative chez le champignon élicité par la présence du pin maritime à pH 5,5 (fig. 9c) et à pH 7,1 (fig. 10c), après 48h de carence par rapport à la condition champignon seul à 48h. *HcPT2* est surexprimé d'un facteur 2 à pH 5,5 et d'un facteur 13 à pH 7,1. *HcPT2* répond à la présence de la plante uniquement à partir de 48h de carence. Le pin maritime semble induire l'expression de *HcPT2* et le signal de cette induction pourrait être la valeur du pH de l'espace apoplasmique.

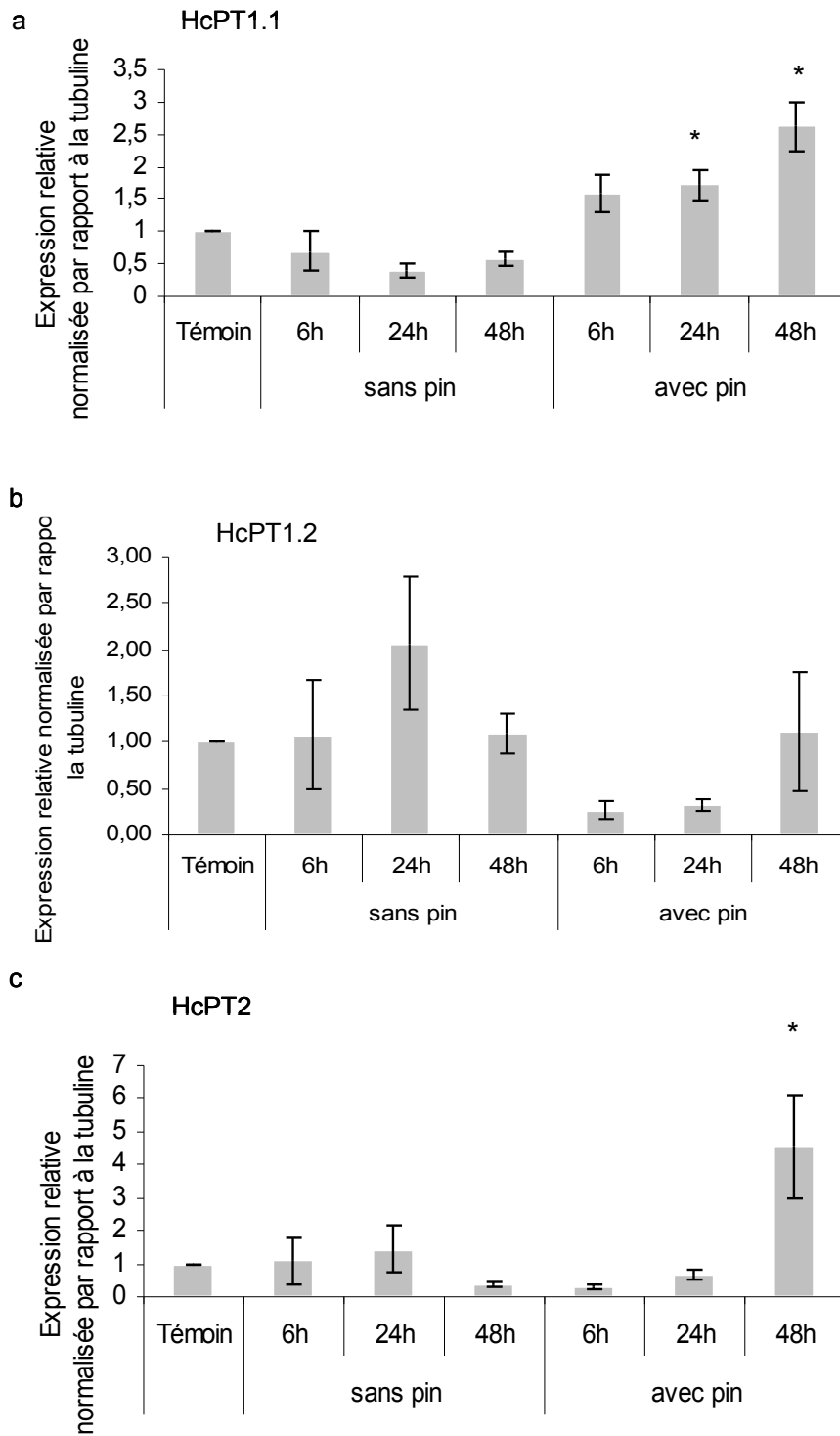
### **3 - Discussion**

#### **3.1 - Régulation de l'expression de *HcPT1.2* en réponse au phosphate**

L'exploration du génome de *H. cylindrosporum* a montré que ce champignon possède trois transporteurs de H<sup>+</sup> :Pi, (*HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2*), dont deux (*HcPT1.1* et *HcPT2*) ont déjà été caractérisés (Tatry et al. 2009). L'analyse *in silico* du promoteur du nouveau gène *HcPT1.2* a révélé la présence de trois boîtes de régulation au phosphate potentielles, les PHO-box like, mises en évidence chez la bactérie filamenteuse, *Streptomyces coelicolor* (Sola-Landa et al., 2005). Étant donné que le promoteur de *HcPT1.1*, dont l'expression génique est fortement régulée par la



**Figure 9.** Expression relative normalisée par rapport au témoin champignon seul à 0h, de *HcPT1.1* (a), *HcPT1.2* (b) et *HcPT2* (c) dans les hyphes de *H. cylindrosporum* seul ou élicité par la présence de la plante hôte, *P. pinaster* dans un milieu pauvre en P mimant un espace apoplasmique à pH 5,5. Les valeurs sont normalisées par le gène de ménage, la tubuline. Les barres des histogrammes correspondent aux moyennes avec leur écart type (n=3). Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives,  $p < 0,05$  (Test non paramétrique de Mann-Whitney).



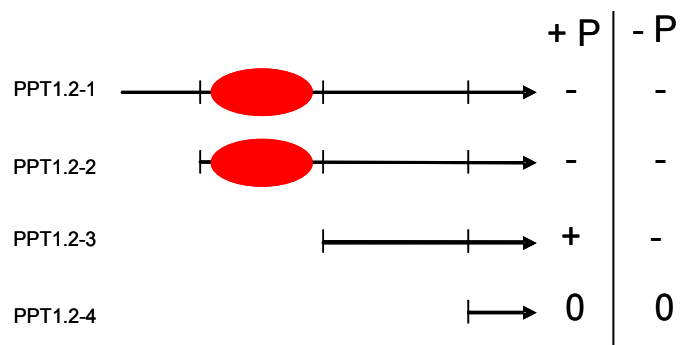
**Figure 10.** Expression relative normalisée par rapport au témoin champignon seul à 0h, de *HcPT1.1* (a), *HcPT1.2* (b) et *HcPT2* (c) dans les hyphes de *H. cylindrosporum* seul ou élicité par la présence de la plante hôte, *P. pinaster* dans un milieu pauvre en P mimant un espace apoplasmique à pH 7,1. Les valeurs sont normalisées par le gène de ménage, la tubuline. Les barres des histogrammes correspondent aux moyennes avec leur écart type (n=5). Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives,  $p < 0,05$  (Test non paramétrique de Mann-Whitney).

disponibilité en Pi (Tatry et al., 2009), possède également une boîte de régulation au phosphate nous avons posé l'hypothèse que l'expression de *HcPT1.2* pouvait aussi être régulée par la concentration en phosphate du milieu grâce à ces domaines de régulation. De plus, *HcPT2* qui est très peu régulé par le Pi (Tatry et al., 2009) ne possède pas de boîte de régulation au phosphate. Pour éprouver cette hypothèse, nous avons mis en place une stratégie de délétion du promoteur couplée avec la fusion transcriptionnelle de la *eGFP*.

Les résultats obtenus en quantifiant l'expression de la *eGFP* par PCR quantitative (fig. 6a) semblent indiquer qu'elle n'est pas affectée par la concentration extérieure en phosphate inorganique lorsqu'elle est fusionnée aux fragments 1 et 2. Par contre, lorsque la *eGFP* est sous le contrôle du fragment 3, son expression semble induite chez deux des trois transformants étudiés en condition +P par rapport à la condition -P. Cependant, il est nécessaire d'être prudent concernant les variations observées. Étant donné l'absence de répétitions, les résultats ne peuvent pas être comparés de façon statistique. L'expérience a été réalisée, dans un premier temps, sur de nombreux transformants afin d'observer l'expression de la *eGFP* et de se faire une idée des processus de régulation qui interviennent au niveau de *HcPT1.2*, en réponse au phosphate. Ces résultats devront être confirmés à partir de trois transformants choisis et répliqués biologiquement. Le choix des transformants sera effectué d'une part, par leur capacité à exprimer la *eGFP* et d'autre part par une analyse TAIL-PCR et Southern blot afin de déterminer le lieu d'insertion de l'ADN-T et de connaître le nombre de copies insérées dans l'ADN génomique des transformants. En ce qui concerne le gène endogène *HcPT1.2* (fig. 6b), son expression est constante après 3 jours de carence en Pi, ce qui suggère toutefois que l'expression de *HcPT1.2* n'est pas régulée dans ces conditions de la même façon que *HcPT1.1*.

Cependant, si elle se confirme, l'absence de régulation de la *eGFP* et du gène endogène *HcPT1.2* par le phosphate pourrait indiquer que les PHO-box like ou d'autres séquences de régulation au phosphate n'interviennent pas dans la régulation de ce gène. Ce résultat n'est pas forcément étonnant considérant que ces séquences ont été mises en évidence chez une bactérie filamenteuse, un organisme éloigné des champignons, notamment des champignons supérieurs tels que *H. cylindrosporum*. Le motif a certainement été conservé, mais la fonction a pu être perdue ou modifiée.

L'expression de la *eGFP* est différente selon le fragment de promoteur (fig. 6a) : elle semble réprimée lorsqu'elle est sous le contrôle du promoteur entier (fragment 1) et du deuxième fragment de *HcPT1.2*. Cette répression est levée lorsqu'elle est sous le contrôle du troisième fragment. Pour expliquer ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que la *eGFP* et donc peut être *HcPT1.2* soient réprimés par une protéine régulatrice capable de se lier au niveau d'une séquence située entre



**Figure 11.** Représentation schématique des fragments de promoteurs de *HcPTI.2* réprimés par un potentiel répresseur. En rouge la position du répresseur de *HcPTI.2* en culture pure après 3 jours de carence.

le début du deuxième et du troisième fragment (fig. 11).

La présence d'un répresseur potentiel au niveau du promoteur de *HcPT1.2* en culture pure à ce temps de carence pourrait signifier deux choses. Premièrement, le répresseur serait effectivement responsable de l'inhibition de ce gène à 3 jours de carence. Il serait intéressant de réaliser une cinétique de carence à partir de trois transformants obtenus pour chaque construction sur des temps court (3h, 6h, 12h et 24h) et plus long (de 1 jour à 12 jours). Effectivement, les résultats obtenus par Louche (2009), montrent une expression différentielle de *HcPT1.1* en culture pure en fonction de la durée de la carence. Après 5 jours de carence, *HcPT1.1* est très fortement surexprimé alors qu'à 8 jours de carence, son expression est faible. Les expressions de *HcPT1.1* et de *HcPT1.2* pourraient être coordonnées : celle de *HcPT1.2* pourrait être induite quand celle de *HcPT1.1* ne l'est plus.

Deuxièmement, le répresseur serait responsable de l'inhibition de *HcPT1.2* en culture pure. Ce gène pourrait être induit uniquement en contexte de mycorhization grâce à la reconnaissance par le champignon de signaux issus de la plante. En effet, des études réalisées sur les endomycorhizes (Bucher et al., 2007) ont montré que de nombreux transporteurs de plantes étaient spécifiquement régulés en contexte symbiotique. Certains de ces transporteurs (Nagy et al., 2005 ; Nagy et al., 2006) présentent une expression basale dans les racines non mycorhizées et sont fortement induits pendant la mycorhization. En revanche, d'autres transporteurs, comme StPT3 chez *Solanum tuberosum* (Rausch et al., 2001), OsPT11 chez *Oryza sativa* (Paszkowski et al., 2002) et MtPT4 chez *Medicago truncatula* (Harrison et al., 2002 ; Javot et al., 2007), sont spécifiquement exprimés au niveau des arbuscules. Les transcrits ne sont pas détectés dans les racines non mycorhizées. On peut poser l'hypothèse que des transporteurs de phosphate de champignons peuvent également être régulés pendant la symbiose.

Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'obtenir des ectomycorhizes avec les transformants exprimant la *eGFP* pour pouvoir localiser les transcrits *eGFP* sous le contrôle des différents fragments du promoteur PPT1.2 et suivre l'expression de ce gène en contexte de mycorhization. Si *HcPT1.2* est effectivement induit dans ce contexte, nous pourrions également déléter le fragment 3 en plusieurs morceaux afin de déterminer de façon plus précise la séquence régulatrice. Il serait ensuite possible de connaître la nature du répresseur en utilisant des techniques de simple hybride ou de foot print. Dans la symbiose endomycorhizienne, un motif de régulation impliqué dans la réponse à la mycorhization a été identifié dans les promoteurs des transporteurs de phosphate de la famille des Solanacées (Chen et al., 2011). Il serait responsable de la forte induction de certains de ces transporteurs en contexte de mycorhization. Ce motif conservé, appelé MYCS pour MYCorhiza transcription factor binding Sequence, a été mis en évidence par des analyses fonctionnelles de promoteurs réalisées par des délétions successives ou des mutations ponctuelles.

Aucune séquence de ce type n'a encore été identifiée dans les transporteurs de phosphate des champignons ecto- ou endo-mycorhiziens

Finalement, la quantité de transcrits correspondant à la *eGFP* est plus faible que celle obtenue pour *HcPT1.2*. Cela peut s'expliquer par le fait que la *eGFP* est sous le contrôle d'un promoteur artificiel constitué d'une séquence inférieure à 1 kb pour le fragment le plus important. Il existe probablement des séquences de régulation plus en amont responsable d'une expression complète. Il est également possible que des systèmes de régulation du promoteur endogène entrent en compétition avec le promoteur artificiel.

Étant donné que l'expression de *HcPT1.2* est faiblement régulée, nous avons aussi envisagé la possibilité de l'existence d'une redondance fonctionnelle entre *HcPT1.1* et *HcPT1.2* en culture pure. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression de *HcPT1.2* sur trois souches RNAi de *H. cylindrosporum Hcpt1.1* (fig. 7). Pour les trois souches testées, l'expression en logarithme de 2 de *HcPT1.2* est induite d'un facteur 2. Il semblerait qu'il existe effectivement une redondance fonctionnelle entre *HcPT1.1* et *HcPT1.2*, du moins en culture pure. De plus, les souches RNAi-*Hcpt1.1* en croissance sur un milieu carencé en P ne présentent pas de phénotype (K. Garcia, communication personnelle), ceci renforce l'idée d'une redondance fonctionnelle. D'après cette observation, il serait nécessaire dans un premier temps de réaliser des transformants RNAi pour *Hcpt1.2* et surtout des transformants ciblant les deux membres de la famille. Nous pourrions ensuite observer la réponse au phosphate de ces transformants sur une cinétique de carence, ainsi que leur réponse à la présence du pin maritime.

### **3.2 - Régulation de l'expression de *HcPT1.2* et des autres transporteurs de Pi en réponse à *Pinus pinaster* et au pH**

L'analyse du génome de *H. cylindrosporum* a révélé la présence de trois transporteurs de  $H^+ : Pi$ . Étant donné l'importance de la nutrition phosphatée dans la symbiose ectomycorhizienne, ce nombre de transporteur semble assez faible. Un ou plusieurs de ces transporteurs pourraient assurer à la fois, l'entrée (influx) des ions Pi dans *H. cylindrosporum* au niveau de l'interface sol-champignon et leur sortie (efflux) du champignon vers l'espace apoplasmique (Benedetto et al., 2005). Les hypothèses qui peuvent expliquer une régulation différentielle des flux de P d'un système de transport unique sont i) l'existence de conditions ioniques spécifiques (pH, concentration en Pi) de part et d'autre de la membrane plasmique fongique au niveau de chacune des interfaces ; ii) l'existence de modification post-traductionnelle, sous l'influence de la plante. Nous faisons l'hypothèse que le pH de l'espace apoplasmique subit des variations, sous le contrôle de la plante, au cours de la symbiose ectomycorhizienne. Cependant, il est très difficile d'avoir accès aux

conditions qui règnent dans l'apoplasme des mycorhizes. L'incubation des thalles en présence des racines de la plante-hôte nous a semblé être le moyen le plus astucieux pour approcher les conditions ioniques spécifiques de l'apoplasme des mycorhizes. Cette approche a permis de montrer qu'à pH 5,5, la présence du Pin maritime a entraîné une augmentation significativement de l'efflux de Pi marqué au P<sup>32</sup> des thalles de *H. cylindrosporum* (Torres-Aquino, 2003). Au cours de ce travail, nous avons donc utilisé les mêmes conditions expérimentales afin de mesurer l'expression des gènes codant pour les transporteurs de P de *H. cylindrosporum* en présence ou en absence du Pin maritime d'une part à pH 5,5 (en référence aux données de P<sup>32</sup>, Torres-Aquino, 2003) et à pH 7,1. Cette dernière condition de pH a été choisie afin d'observer la réponse de *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* lors d'une alcalinisation potentielle de l'espace apoplasmique.

A pH 5,5, les expressions de *HcPT1.1* et *HcPT1.2* en présence du pin maritime ne sont pas modifiées (fig. 9a et b) de façon significatives par rapport à la condition champignon seul. Par contre, nos résultats semblent montrer que la présence du Pin maritime modifie de façon significative l'expression de *HcPT2* après 48h d'incubation (fig. 9c). *HcPT2* apparaît comme un candidat potentiel responsable des efflux de P observés. Cependant, on ne peut totalement exclure un rôle de *HcPT1.2* car son expression tend à augmenter au cours de l'incubation avec le Pin maritime (fig. 9b). Pour réaliser ces premières mesures, nous avons utilisé seulement 3 des 5 réplicats fongiques disponibles et il est clair que ce faible nombre de réplicats peut être responsable de l'absence de différences significatives. Il conviendra donc d'analyser les 2 autres réplicats pour confirmer ou non ces tendances et établir si *HcPT1.2* ne serait pas régulé par la présence de la plante.

A un pH d'incubation de 7,1, l'expression de *HcPT2* (fig. 10c) est toujours induite par la présence de la plante à 48h mais cette induction est 3 fois plus importante qu'à pH 5,5. On observe également que l'expression de *HcPT1.2* (fig. 10b) ne varie toujours pas. Par contre, celle de *HcPT1.1* est induite de façon significative par la présence de la plante à 24 et 48h (fig. 10a). Il semblerait que l'expression des gènes codant pour les transporteurs de P soient induites lorsque les thalles sont incubés dans un milieu alcalin.

Ces premiers résultats seraient en faveur d'un rôle de la plante en interaction avec l'alcalinisation du milieu comme éléments de régulation des flux de Pi du champignon vers la plante. Toutefois, il serait absolument nécessaire de quantifier les efflux de P<sup>32</sup> à cette valeur de pH. Nos résultats seraient également en accord avec les travaux de Drissner (2007) qui ont démontré une alcalinisation du milieu en présence de la lyso-phosphatidylcholine, molécule présente uniquement dans les extraits de racines endomycorhizées, et proposée comme le signal de la mycorhization car elle est capable de provoquer l'expression du gène codant le transporteur de P

spécifique (côté plante) de la pomme de terre mycorhizée. Finalement, l'étude du fonctionnement du transporteur de Pi à haute affinité de la levure, *pho84* (Bun-ya, et al., 1991), démontre que la protéine native de vésicules de membrane plasmique est capable de transporter le phosphate dans les deux sens selon le gradient de pH de part et d'autre de la membrane plasmique (Fristedt et al. 1996).

Les données obtenues au cours de cette expérience permettent d'émettre de nombreuses hypothèses quant à la localisation des trois transporteurs de phosphate de *H. cylindrosporum*.

La première approche sera d'établir la localisation des transcrits des trois transporteurs de Pi dans les différents contextes (élicitation par le pin maritime ou symbiotique). Pour cela, nous envisageons d'utiliser des fusions transcriptionnelles à la GFP que nous avons déjà pour HcPT1.2 et qui complètera les outils déjà obtenus pour HcPT1.1 (Haider et al., 2012) et HcPT2 (K. Garcia, comm pers). La localisation de la protéine sera établie en priorité par immunodétection selon la méthode publiée par Harrison (2002) à partir des anticorps spécifiques de chacun des trois transporteurs qui sont disponibles au laboratoire. De plus, des fusions traductionnelles pourront être utilisées pour confirmer la localisation des 3 transporteurs. Concernant HcPT1.1 et HcPT2, on peut supposer qu'ils seraient localisés au niveau de Hartig alors que HcPT1.2 serait présent uniquement dans les hyphes extraradiculaires.

Une deuxième approche visera à déterminer la valeur du pH de l'espace apoplasmique, encore inconnu jusqu'à maintenant, et son évolution au cours de la symbiose ectomycorhizienne. Le champignon pourrait être transformé avec un senseur de pH apoplasmique (GFP sensible au pH) (Miesenbock et al., 1998 ; Bagar et al., 2009) puis mis en contact avec ou sans la plante afin de mesurer l'effet de la présence de la plante sur les variations de pH du milieu d'incubation des hyphes fongiques.

Finalement, dans une troisième approche, nous chercherons à déterminer si un (ou plusieurs) des trois transporteurs de *H. cylindrosporum* est capable d'assurer le transport de Pi dans les deux sens en fonction de la valeur du pH. Pour cela, nous tenterons de déterminer le sens du transport de phosphate et sa régulation à partir de vésicules de membrane plasmique enrichie en chacun des transporteurs par immunopiégeage selon le protocole décrit par Fristedt (1996).

## 4 - Matériels et Méthodes

### 4.1 - Obtention du matériel biologique

Le matériel végétal utilisé est le pin maritime (*Pinus pinaster* Soland. in Ait.), obtenu à partir de graines provenant du verger de Sore, Médoc. Les graines de *P. pinaster* sont conservées à 4°C. Elles sont stérilisées dans de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) pendant 40 min puis rincées abondamment avec de l'eau osmosée stérile avant d'être mises en germination sur milieu solide (glucose 2 g/L et agar-agar 10 g/L) (Annexe 1) en chambre de culture (période jour/ nuit : 16h/8h ; température jour / nuit : 24°C/20°C ; humidité relative : 80% ; éclairage de niveau 1 : 320 μmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Les jeunes plantules de pin âgées d'environ deux semaines sont ensuite transférées en tubes de verre préalablement stérilisés (Plassard et al. 1994 ; Annexe 1). Les tubes sont placés en chambre de culture. La solution nutritive (milieu N1 1mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Annexe 1, tableau 1) est renouvelée une fois par semaine. Les plantes sont utilisées après deux mois de croissance.

Le partenaire fongique utilisé est le basidiomycète ectomycorhizien, *Hebeloma cylindrosporium* Romagnesi. La souche dicaryotique D2, résultant de la plasmogamie de deux souches homocaryotique h1 et h7 (Debaud et Gay, 1987), et la souche h7 sont employées lors de cette étude. Le champignon est maintenu en culture axénique dans des boîtes de Pétri sur milieu solide N6 +P (Annexe 1, tableau 2) à partir de repiquages successifs de boîtes mères conservées à 25°C à l'obscurité.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA1126 est utilisé pour l'agrotransformation du champignon *H. cylindrosporium*. Elle a été fournie par l'équipe Mycorhizes de l'UMR 5557, Ecologie microbienne, de l'Université de Lyon (Ngari et al., 2009). Elle est conservée dans des stocks glycérol au congélateur à – 80 °C.

Le plasmide pPZP133 (Fig. 12), également fourni par l'équipe Mycorhizes de Lyon, a été utilisé pour les fusions transcriptionnelles. Une fois le clonage réalisé, le plasmide permet la transformation de *H. cylindrosporium* par *A. tumefaciens*. Il contient une cassette de résistance à un fongicide, la carboxine, ce qui le rend très efficace pour sélectionner les transformants (Ngari et al., 2009).

### 4.2 – Système de culture *in vitro* pour l'interaction *Hebeloma cylindrosporium* et *Pinus pinaster*

Après deux mois de culture en tube à essai, 60 plantes sont sélectionnées. La solution de N1 +P est éliminée en totalité et les tubes sont rincés avec une solution de CaSO<sub>4</sub> 0,2 mM stérile (20 ml/tube) avant d'être complètement remplis avec 30 ml de CaSO<sub>4</sub> 0,2 mM stérile. Les plantes sont incubées en chambre de culture pendant une semaine et la solution de chaque tube est aérée par de

l'air stérile. Cette étape permet de laver le système racinaire et d'éliminer le phosphate inorganique (Pi). La solution de CaSO<sub>4</sub> 0,2 mM est remplacée par 30 mL de « milieu d'interaction » (MI) (Annexe 2, tableau 1) stérile à pH 5,5 pour la première expérience et à pH 7,1 pour la seconde. Les plantes sont incubées en chambre de culture pendant 24h. La solution de chaque tube est aérée par de l'air stérile.

En parallèle, 60 implants fongiques de D2 de 8 mm de diamètre provenant de cultures solides fraîches sont repiquées sur un milieu liquide (40 mL) dans des flacons de 125 mL et placés à 25°C, l'obscurité. Les thalles sont cultivés dans des conditions qui permettent de maximiser les efflux de Pi vers la plante (Torres-Aquino, 2003). Ces conditions comportent trois phases. Les thalles sont d'abord cultivés pendant 7 jours sur un milieu complet contenant de l'orthophosphate (Pi) en condition non limitante, apporté sous forme de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM (milieu N6 +P -1 mM, Annexe 2, tableau 2) pour permettre le développement du champignon. Ils sont ensuite transférés pendant 5 jours sur un milieu sans Pi (milieu N6 -P, Annexe 2, tableau 3) afin de les carencer et d'induire une forte capacité de prélèvement de phosphate. Pour finir, les thalles sont transférés dans le milieu N6 +P-1 mM, pendant 16 heures supplémentaires au cours desquelles ils se « chargent » en Pi disponible pour la plante (Torres-Aquino, 2003).

Après la phase de « charge », les thalles sont rincés afin d'éliminer le Pi absorbé sur les parois du champignon. Chaque thalle est placé dans une seringue de 60 mL contenant 15 mL de milieu d'interaction, à pH 5,5 pour l'expérience 1 et pH 7,1 pour l'expérience 2, renouvelé toutes les 15 minutes pendant 1h30. A la fin du rinçage, 60 mL de milieu d'interaction sont ajoutés dans chaque seringue qui contient soit un thalle, soit le Pin maritime (3 plantes), soit un thalle en présence du pin (3 plantes) (Annexe 2, tableau 4). Pour chaque temps (0h, 6h, 24h, 48h), le volume présent dans les seringues est noté, 1 mL de « milieu d'interaction » est prélevé et la concentration en Pi du milieu est dosée par la méthode au vert de malachite (Ali et al., 2009 ; Annexe 2). Ensuite, 5 seringues sont arrêtées en totalité (60 mL du milieu d'interaction, thalles si présents, pins si présents) et une plante de chaque seringue restante est prélevée. Le poids frais des parties aériennes et racinaires ainsi que des thalles est mesuré. Les pins et les thalles sont fixés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.

### **4.3 – Quantification de l'expression des gènes *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2***

Les thalles de *H. cylindrosporium* sont broyés à l'azote liquide grâce à un pilon et un mortier. La fine poudre obtenue est conservée à -80°C (Annexe 3). L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir de 100 à 200 mg de broyat grâce au kit « Rneasy Plant Mini kit » (Qiagen) (Annexe 3). Une fois extraits, les concentrations en ARN sont mesurées par ribogreen (Quant-iT Ribogreen RNA

assay kit, molecular probes, Invitrogen,) dans un Thermocycleur (C1000, CFX96 Real-Time System, Bio-Rad) et 6µL sont déposés sur un gel à 1 % d'agarose.

500 ng d'ARN totaux sont utilisés pour synthétiser les ADNc par une réaction de transcription inverse (Annexe 3, Tableau 2) grâce à l'enzyme M-MLV reverse transcriptase Rnase H minus (M3682, Promega) et à des oligo(dT) utilisés comme amorces.

Les mesures du niveaux d'expression de *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* sont quantifiés par PCR quantitative (Annexe 3, tableaux 3 et 4) à partir de 2 µL de solution de RT diluée deux fois et 8 µL de mix PCR (contenant une Taq DNA polymérase et un tampon (SYBR Green) (Absolute QPCR SYBR Green ROX mix, Abgene). Le gène de la tubuline est utilisé comme gène de référence.

#### **4.4 - Clonage du promoteur fragmenté de *HcPT1.2***

Une délétion de promoteur est réalisée sur la région promotrice du gène *HcPT1.2*. Le promoteur PPT1.2 est ainsi délété en quatre fragments de 937 bp, 716 bp, 592 bp et 184 bp (Annexe 4, tableau 1), amplifiés, à partir d'une banque d'ADNg de *H. cylindrosporum*, par une réaction PCR (Annexe 4, tableau 2) grâce à une polymérase haute fidélité (i Proof High Fidelity DNA Polymerase, BIORAD). La totalité du volume de la réaction d'amplification est déposée sur un gel à 1% d'agarose. Les fragments amplifiés sont récupérés en découpant les bandes correspondantes du gel, purifiés grâce au kit « Gene JET PCR purification kit » (Fermentas) (Annexe 4) puis la concentration est déterminée par Nanodrop 1000. Les fragments sont ensuite ligués dans le vecteur pCR2.1 (Fig. 13) grâce au kit « Zero Blunt PCR Cloning kit » (Invitrogen) (Annexe 4, tableau 3). Le vecteur est transféré dans *E.coli* (souche DH5a) par choc thermique (Annexe 4). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu LB (Annexe 4, tableau 4) supplémenté en kanamycine (50 µg/mL). La présence du fragment de promoteur inséré dans le bon sens est vérifiée par PCR sur colonie (Annexe 4, tableau 5). L'ADN plasmidique est ensuite extrait des clones positifs par le kit « Gene JET Plasmide Miniprep kit » (Fermentas) (Annexe 4) puis digéré par SpeI (Fermentas) (Annexe 4, tableau 6). Les fragments de promoteur PPT1.2 sont purifiés sur un gel avant leur ligation avec le vecteur pPZP133 (fig. 12) contenant une cassette *eGFP* et un terminateur T35S, préalablement digéré par SpeI et déphosphorylé (Annexe 4, tableau 6). La ligation est effectuée par la T4 DNA ligase (Fermentas) pendant 4h à température ambiante (Annexe 4, tableau 7). Après transformation de *E.coli* (DH5a) par choc thermique, les clones positifs sont sélectionnés grâce à leur cassette de résistance à la kanamycine et la présence de l'insert dans le vecteur pPZP133 est vérifiée par PCR (Annexe 4, tableau 8). Les vecteurs pPZP133 contenant chaque fragment du promoteur PPT1.2 fusionné à la *eGFP* et à un terminateur 35S sont envoyés à séquencer.

## **4.5 - Transformation du champignon *Hebeloma cylindrosporium* par *Agrobacterium tumefaciens***

### **4.5.a – Préparation du partenaire fongique**

Le champignon est cultivé dans des boîtes de Pétri de 90 mm contenant environ 20 mL de milieu YMG liquide (Annexe 4, tableau 9). Un mois avant la transformation, deux thalles sont broyées à l'ultra-turrax dans 80 mL de milieu YMG liquide et répartis dans quatre boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Après une semaine, les thalles reformés sont de nouveau broyés de la même façon. Le but étant de rapprocher les étapes de broyage afin d'obtenir la formation d'un nouveau thalle en un jour. Le thalle est alors prêt pour être agrotransformé.

### **4.5.b – Préparation du partenaire bactérien**

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA1126 est transformée avec les plasmides pPZP133 contenant les différents fragments du promoteur PPT1.2 fusionnés à la *eGFP* et à un terminateur 35S via un protocole de transformation standard (Annexe 4). Après deux jours de culture à 28 °C, des colonies apparaissent. La veille de l'agrotransformation, une colonie de chaque boîte est prélevée, inoculée dans 20 mL de LB modifié (Annexe 4, tableau 10) supplémenté en kanamycine (50 µg/mL) et en carbénicilline (50 µg/mL) et incubés à 28 °C sous agitation pendant environ 16 heures. Le lendemain, la suspension bactérienne est centrifugée à 3500 rpm pendant 10 minutes et le culot est repris dans 5 mL de milieu d'induction (Annexe 4, tableau 11). La suspension bactérienne est diluée afin d'obtenir une absorbance à 660 nm de 0,15 dans 5 mL de milieu d'induction. Finalement, la suspension est incubée 4-6 heures à 28 °C afin d'obtenir une absorbance de 0,3 à 0,4 juste avant l'agrotransformation.

### **4.5.c – Préparation des « disques de transformation »**

Chaque agrotransformation faisant intervenir des plasmides différents est répétée 50 fois. Pour cela, 200 disques de microfibre de verre de 6 mm de diamètre sont placés dans des boîtes de verre de 140 mm de diamètre et stérilisées au four pasteur pendant 3h à 180 °C.

### **4.5.d – Transformation du champignon**

La transformation de la souche h7 du champignon *Hebeloma cylindrosporium* est réalisée selon le protocole décrit par Combiér (2003) (Annexe 4). Deux thalles de *H. cylindrosporium* nouvellement formés sont broyés ensemble dans 80 mL de milieu YMG. 50 µL de broyats sont déposés sur chaque disque (50 filtres/vecteurs) de fibre de verre. Les filtres inoculés sont ensuite

déposés dans une boîte de Pétri carré de 12 cm de côté (25 filtres/boîte) contenant du milieu d'induction solide (Annexe 4, tableau 12). Ensuite, 40  $\mu$ L de suspension bactérienne sont déposés sur chaque filtre. Les boîtes sont incubées à 24 °C pendant 72 heures, ce qui permet à la bactérie de transférer son ADN-T aux cellules fongiques. Les filtres sont, par la suite, transférés dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant un milieu de sélection solide (Annexe 4, tableau 13) supplémenté en carboxine, rifampicine et vancomycine afin d'éliminer l'agrobactérie et de sélectionner les transformants.

#### 4.5.e – Sélection des transformants

Les transformants apparaissent après 10 jours de contact sur le milieu sélectif. Ils sont alors repiqués individuellement dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre contenant du milieu sélectif supplémenté en carboxine ce qui permet de confirmer le phénotype de résistance.

Pour confirmer la présence des constructions dans les souches mutantes obtenues, 9 transformants pour chaque construction sont repiqués dans un pot Copro de 50 mL contenant 15 mL de milieu nutritif complet (N6 +P ; 3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Annexe 4, tableau 14). Les thalles sont cultivés pendant une semaine à 25 °C et à l'obscurité. Les thalles sont immédiatement broyés à l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon afin d'obtenir une fine poudre, conservée à – 80°C (Annexe 4) jusqu'à l'extraction de l'ADN effectuée sur la totalité du matériel, par un protocole standard (Annexe 4). La présence des constructions est vérifiée par amplification PCR par des amorces forward des fragments de promoteur (Annexe 4, tableau 1) et une amorce reverse ciblant la *eGFP*. La taille des amplicons contenus dans 5  $\mu$ L de produit PCR est visualisée sur un gel d'agarose (1%).

#### 4.6- Quantification de l'expression de la *eGFP* sous le contrôle du promoteur PPT1.2

Pour chaque construction, 9 transformants sont repiqués dans deux pots Copro de 125 mL contenant 30 mL de milieu liquide (composition du milieu et conditions de culture identiques au paragraphe 4.5). Après 10 jours, la moitié des thalles est transférée dans un nouveau milieu N6 +P liquide et l'autre moitié dans un milieu N6 -P (0,05 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) liquide (Annexe 4, tableau 17) pendant 3 jours supplémentaires. Les thalles sont broyés manuellement à l'azote liquide et le matériel obtenu est conservé à – 80°C (Annexe 4).

Les ARN sont extraits à partir de la totalité du broyat obtenu en suivant le protocole d'extraction au trizol (Annexe 4). Après extraction et quantification au NanoDrop 1000, les acides nucléiques sont soumis à un traitement DNase pendant 30 minutes à 37 °C (DNase I, RNase free, Fermentas) (Annexe 4, tableau 18). Pour vérifier la qualité des ARN purifiés, une réaction PCR (40 cycles) est réalisée à partir de 0,5  $\mu$ L d'ARN extraits grâce à des amorces tubulines ciblant l'ADN

(Annexe 4, tableau 19). Les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1 %. En parallèle, 1 µL des ARN extraits et traités à la DNase sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % et mis à migrer 1h à 50 mV. Les ARN purifiés sont dosés au NanoDrop 1000. Finalement, les ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN grâce au kit « RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit » (Fermentas) (Annexe 4, Tableau 20).

La mesure du niveau d'expression de la *eGFP* et des gènes endogènes *HcPT1.1*, *HcPT1.2* est réalisée par une PCR quantitative (Annexe 4, tableaux 21, 22, 23, 24) à partir de 2 µL d'ADNc dilué deux fois et 6 µL de mix PCR (contenant une Taq DNA polymérase et un tampon (SYBR Green) (Light Cycler 480 SYBR Green I Master, Roche). Le gène de la tubuline est utilisé comme gène de référence.

#### **4.7- Traitements statistiques des données**

Les résultats obtenus sont analysés statistiquement par un test non paramétrique « Mann-Whitney » à  $p=0,05$  grâce au logiciel Excel STAT.

## **5 – Références**

- Ali MA, Louche J, Legname E, Duchemin M, Plassard C** (2009) *Pinus pinaster* seedlings and their fungal symbionts show high plasticity in phosphorus acquisition in acidic soils. *Tree physiology* **29**: 1587-1597
- Arvieu JC, Leprince F and Plassard C** (2003) Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Annals of forest science* **60**: 815-821
- Ashord AE and Allaway WG** (2002) The role of the motile tubular system in mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 177-187
- Bagar T, Altenbach K, Read ND and Beneina M** (2009) Live-cell imaging and measurement of intracellular pH in filamentous fungi using a genetically encoded ratiometric probe. *Eucaryotic cell* **8**: 703-712
- Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L and Bonfante P** (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular plant microbe interaction* **20**: 1055-1062
- Batjes NH** (1997) A world data set of derived soil properties by FAO\_UNESCO soil unit for global modeling. *Soil Use Manage* **13**: 9-16
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L** (2005) Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**: 620-627
- Bolan NS** (1991) A critical review on the rôle of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* **134**: 189-207
- Bonneau M** (1995) Fertilisation des forêts dans les pays tempérés. Nancy : Ecole nationale du Génie rural, des Eaux et des Forêts. 367 pages
- Bucher M, Rausch C and Daram P** (2001) Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. *Journal of plant nutrition and soil science* **164**: 209-217
- Bucher M** (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhizal interfaces. *New phytologist* **173**: 11-26
- Bun-ya N, Nishimura M, Harashima S and Oshima Y** (1991) The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Molecular and cellular biology* **11**: 3229-3238
- Casarin V, Plassard C, Souche G and Arvieu JC** (2003) Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. *Agronomie* **23**: 461-469
- Casarin V, Plassard C, Hinsinger P and Arvieu JC** (2004) Quantification of ectomycorrhizal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New phytol* **163**: 177-195
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D and Botton B** (2002) An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant Soil* **244**: 165-175
- Chen A, Gu M, Sun S, Zhu L, Hong S and Xu G** (2011) Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and P1BS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species. *New Phytologist* **189**: 1157-1169
- Chiou TJ, Liu H and Harrison MJ** (2001) The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *The plant journal* **25**: 281-293
- Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Gay G, Marmeisse R** (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

- transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. FEMS Microbiology letters **220**: 141-148
- Condrón LM and Tiessen H** (2005) Organic phosphorus in the environment. In organic phosphorus in terrestrial ecosystems, Eds. Turner BL, Frossard E and Baldwin DS. CABI Publishing, Wallingford, p 295-307
- Courty PE, Buée M, Diedhou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault MP, Uroz S and Garbaye J** (2010) The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. Soil biology and biochemistry **42**: 679-698
- Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M** (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. Planta **206**: 225-233
- Debaud JC and Gay G** (1987) In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* associated with *Pinus pinaster*. New Phytol **105**: 429-435
- Drissner D, Kunze G, Callewaert N, Gehrig P, Tamasloukht M, Boller T, Felix G, Amrhein N and Bucher M** (2007) Lyso-Phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Science **318**: 265-268
- Ekblad A, Wallander H, Carlsson R and Huss-Danell K** (1995) Fungal biomass in roots and extramatrical mycelium in relation to macronutrients and plant biomass of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* and *Alnus incana*. New phytol **131**: 443-451
- Ezawa T, Smith SE and Smith FA** (2002) P metabolism and transport in AM fungi. Plant and soil **244**: 221-230
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA and Ohtomo R** (2003) Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. New phytologist **161**: 387-392
- Fristedt U, Berhe A, Ensler K, Norling B and Persson BL** (1996) Isolation and characterization of membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* harboring the high-affinity phosphate transporter. Archive of biochemistry and biophysics **330**: 133-141
- Gianinazzi-Pearson SE, Smith SE, Gianinazzi S and Smith FA** (1991) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytol **117**: 61-74
- Gianinazzi-Pearson V, Arnould C, Oufattole M, Arango M and Gianinazzi S** (2000) Differential activation of H<sup>+</sup> -ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. Planta **211**: 609-613
- Haider MZ, Garcia K, Corratgé-Faillie C, Conéjero G, Delteil A, Tatry MV, Plassard C, Sentenac H and Zimmermann S** (2012) Promoter-GFP fusion and *in situ* hybridization reveal localization and Pi-dependent expression of the fungal Pi transporter *HcPT1* within ectomycorrhiza. Soumis New Phytol
- Harrison MJ, VanBuuren ML** (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *glomus versiforme*. Nature **378**: 626-629
- Harrison MJ, Dewbre GR and Liu J** (2002) A phosphate transporter from *Megicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. The plant cell **14**: 2413-2429
- Hinsinger P** (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil **237**: 173-195

- Horst WJ, Kamh M, Jibrin JM, Chude VA** (2001) Agronomic measures for increasing P availability to crops. *Plant and soil* **237**: 211-233
- Hyde G, Cole L and Ashford AE** (1997) Mycorrhiza movies. *Mycorrhiza* **7**: 167-169
- Javot H, Varma Penmetsa R, Terzaghi N, Cook DR and Harrison MJ** (2007) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **104**: 1720-1725
- Javot H, Pumplin N and Harrison MJ** (2007) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, cell and environment* **30**: 310-322
- Karandashov V, Nagy R, Wegmuller S, Amrhein N and Bucher M** (2004) Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **101**: 6285-6290
- Kempainen MJ and Pardo AG** (2009) pHg/pSILBA vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes: optimization of ihpRNA-triggering in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbial Biotechnology* **3**: 178-200
- Krajinski F, Hause B, Gianinazzi-Pearson V and Franken P** (2002) *Mth1* plasma membrane H<sup>+</sup> - ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant biology* **4**: 754-761
- Lambers H, Raven JA, Shaver GR and Smith SE** (2008) Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in ecology and evolution* **23**: 95-103
- Leggewie G, Willmitzer L and Riesmeier JW** (1997) Two-cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *The plant cell* **9**: 381-392
- Liu C, Muchhal VS, Mukatira U, Kononowicz AK, Raghothama KG** (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant physiology* **116**: 91-99
- Liu H, Trien AT, Blaylock LA, Harrison MJ** (1998) Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular plant-microbe interactions* **11**: 14-22
- Liu J, Uhde-Stone C, Li A, Vance CP, Allan DL** (2001) A phosphate transporter with enhanced expression in proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and soil* **237**: 257-266
- Liu Q, Loganathan P, Hedley MJ and Skinner MF** (2004) The mobilisation and fate of soil and rock phosphate in the rhizosphere of ectomycorrhizal *Pinus radiata* seedlings in an Allophanic soil. *Plant soil* **264**: 219-229
- Louche J** (2009) Régulation de la sécrétion des phosphatases acides des champignons ectomycorhiziens et mobilisation de phosphore organique dans la rhizosphère des arbres forestiers : approches biochimiques et moléculaires. Thèse.
- Louche J, Ali MA, Cloutier-Hurteau B, Sauvage FX, Quiquampoix H and Plassard C** (2010) Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 323-335
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR and Harrison MJ** (2001) A phosphate transporter gene from the extra-

radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 1140-1148

- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combiér JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L and Debaud JC** (2004) *Hebeloma cylindrosporum* – a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist* **163**: 481-498
- Miesenbock G, De Angelis DA and Rothman JE** (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**: 192-195
- Muchhal US, Pardo JM and Raghothama KG** (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **93**: 10519-10523
- Muchhal US and Raghothama KG** (1999) Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **96**: 5868-5872
- Nagy R, Karandashov V, Chaque W, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu GH, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N, Bucher M** (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant journal* **42**: 236-250
- Nagy R, Vasconcelos M, Zhao S, McElver J, Bruce W, Amrhein N, Raghothama K, Bucher M** (2006) Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from Maize (*Zea mays* L.). *Plant biology* **8**: 186-197
- Ngari C, Combiér JP, Doré J, Marmeisse R, Gay G and Melayah D** (2009) The dominant Hc.SdhR carboxin-resistance gene of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* as a selectable marker for transformation. *Current genetics* **2**: 223-231
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP** (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **99**: 13324-13329
- Pearson I, Abbott LK and Robson AD** (1992) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist* **120**: 509-516
- Pearson JN and Jakobsen I** (1993) Symbiotic exchange of carbon and phosphorus between cucumber and three arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **124**: 481-488
- Plassard C, Barry D, Eltrop L and Mousain D** (1994) Nitrate uptake in maritime pine (*Pinus pinaster* Soland in Ait.) and the ectomycorrhizal fungus, *Hebeloma cylindrosporum*: effect of ectomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany* **72**: 189-192
- Plassard C and Dell B** (2010) Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees: a review. *Tree physiology* **30**: 1129-1139
- Raghothama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **50**: 665-693
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M** (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**: 462-466

- Rees B, Shepherd VA and Ashford AE** (1994) Presence of a motile tubular vacuole system in different phyla of fungi. *Mycological Research* **98**: 985-992
- Schachtman DP, Reid PJ and Ayling SM** (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiology* **116**: 447-453
- Selosse MA** (2009) La symbiose : structures et fonctions, rôle écologique et évolutif. Vuibert 141 page
- Smith FW, Ealing PM, Dong B and Delhaize E** (1997) The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant journal* **11**: 83-92
- Smith SE, Smith FA and Jakobsen I** (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant physiology* **133**: 16-20
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I** (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: The contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* **162**: 511–524
- Smith SE and Read DJ** (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. Academic Press, London
- Smith SE and Smith FA** (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review Plant Biology* **62**: 227-250
- Sola-Landa A, Rodriguez-Garcia A, Franco\_Dominguez E and Martin JF** (2005) Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Molecular Microbiology* **56**: 1373-1385
- Tatry MV, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H and Plassard C** (2009) Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant journal* **57**: 1092-1102
- Torres Aquino M** (2003) Approches physiologiques du rôle du partenaire fongique sur l'accumulation et le transfert de P vers la plante-hôte dans la symbiose ectomycorhizienne modèle *Hebeloma cylindrosporum/Pinus pinaster*. Thèse.
- Torres Aquino M and Plassard C** (2004) Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 149-156
- Turner BL** (2008) Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. *Journal of ecology* **96**: 698-702
- Uetake Y, Kojima T, Ezawa T and Saito M** (2002) Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New phytologist* **154**: 761-768
- Vance CP, Uhde-Stone C and Allan DL** (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource: a review. *New phytologist* **157**: 423-447
- Van Tichelen KK and Colpaert JV** (2000) Kinetics of phosphate absorption by mycorrhizal and non mycorrhizal Scots pine seedlings. *Physiologia plantarum* **110**: 96-103





## Plan des annexes

<b>Annexe 1 : Obtention du matériel biologique.....</b>	<b>1</b>
Culture des plantules du <i>Pinus pinaster</i> .....	1
Culture du champignon <i>Hebeloma cylindrosporum</i> .....	2
<b>Annexe 2 : Mise en contact <i>H. cylindrosporum</i> et <i>P. pinaster</i> « in vitro ».....</b>	<b>4</b>
Préparation des plantes.....	4
Préparation des thalles.....	4
Mise en contact des thalles de <i>H. cylindrosporum</i> et des racines de <i>P. pinaster</i> .....	5
<b>Annexe 3 : Quantification de l'expression de <i>HcPT1.2</i>.....</b>	<b>8</b>
Extraction des ARN totaux du champignon <i>Hebeloma cylindrosporum</i> .....	8
Mesure de l'expression de <i>HcPT1.2</i> .....	9
<b>Annexe 4 : Visualisation de l'activité du promoteur du gène <i>HcPT1.2</i>.....</b>	<b>10</b>
Clonage du promoteur PPT1.2 délété en quatre fragments.....	10
Transformation du champignon <i>Hebeloma cylindrosporum</i> .....	14
Quantification de l'expression de PT1.2, en réponse au Pi extérieur, par RT-qPCR.....	18

## Annexe 1 : Obtention du matériel biologique

### Culture de plantules de *Pinus pinaster*.

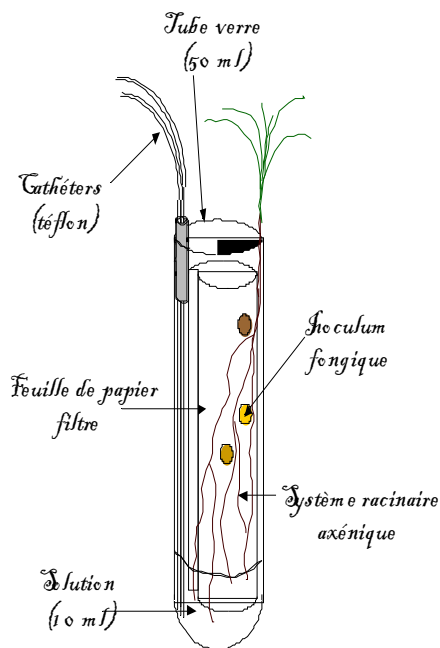
Les graines de *Pinus pinaster* sont stérilisées et mises en germination selon le protocole suivant :

- Les graines sont conservées en réfrigérateur à l'obscurité à 4°C.
- Les graines sont placées dans un récipient contenant de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) pendant 40 min pour les stériliser, puis rincées avec 2L d'eau stérile.
- L'eau est éliminée et les graines sont séchées sous la hotte pendant environ 3h.
- Les graines sont mises à incuber pendant 48h dans de l'eau stérile en chambre froide, à l'obscurité à 4°C (levée de la dormance).
- Les graines sont ensuite séchées sur un papier filtre et déposées par rangée de 8 graines sur des boîtes de Pétri contenant un milieu composé de 10g d'agar par litre pour 2g/L de glucose. Les boîtes sont fermées avec du parafilm.
- Les boîtes sont placées en chambre de culture sur la tranche (période jour/ nuit : 16h/8h ; température jour / nuit : 24°C/20°C ; humidité relative : 80% ; éclairage de niveau 1 : 320  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) pendant 15 jours (germination des graines).

Les tubes à essai sont préparés selon le protocole suivant :

- Un Cathéter (fin tuyau de plastique) qui servira à arroser les plantules, un rectangle de papier filtre (8 cm\*2 cm) et 10 ml d'eau distillée glucosée à 2g/L sont ajoutés aux tubes.
- Les tubes à essai sont placés sur un portoir et enfermés dans deux sacs fenêtre.
- Les tubes sont autoclavés deux fois à 48h d'intervalle pendant 45 min à 115°C.
- Quand les graines ont germées, la solution glucosée est éliminée et remplacée par 15-20 ml de solution nutritive N1 +P (Tableau 1) puis les plantules sont ajoutées :
  - non mycorhizées ; ajout de trois implants d'agar, à proximité de la racine, entre la paroi du tube de Pyrex et le papier filtre
  - mycorhizées ; ajout de trois implants mycéliens de *H. cylindrosporum* provenant d'une culture fongique sur milieu solide, à proximité de la racine, entre la paroi du tube de Pyrex et le papier filtre.

Les plantes, mycorhizées ou non, sont utilisées après deux mois de croissance en chambre de culture (PP : 16h8h ; T : 20 °C ; HR: 60% ; PPFD : 300  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).



**Figure 1.** Représentation schématique et photographie des tubes test utilisés pour la mycorhization

**Tableau 1.** Composition du milieu de culture N1 +P

Solution mère (molarité)	Concentration finale
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0,5M)	0,2 mM
KNO <sub>3</sub> (1M)	0,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M)	0,2 mM
MgSO <sub>4</sub> (1M)	1 mM
KCl (1M)	0,2 mM
Citrate ferrique (1%)	0,5 ml/L
Thiamine (100µg/L)	1 ml/L
Oligoéléments <sup>1</sup>	0,2 ml/L

Composition de la solution d'oligoélément par litre<sup>1</sup> : 2,82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 98 mg CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O ; 3,08 g MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O ; 0,29 g NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O ; 4,41 g ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O. Cette solution est gardée à 4°C.

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 avec Ca(OH)<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, avant d'être stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

#### Culture du champignon *Hebeloma cylindrosporum* (souche h7 et souche D2).

Les souches monocaryotique (h7) et dicaryotique (D2) du champignon *H. cylindrosporum* sont cultivées sur le milieu N6 +P (Tableau 2). Le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 120 °C puis coulé dans des boîtes de Pétri. Le champignon est repiqué sur les boîtes sous une hôte à flux horizontal. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant deux semaines à 25°C à l'obscurité.

**Tableau 2.** Composition du milieu de culture N6 +P solide

Solution mère (molarité)	Concentration finale
KNO <sub>3</sub> (1M)	6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1M)	1 mM
KCl (1M)	4 mM
CaCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,5 mM
Citrate ferrique (1%)	1 ml/L
Thiamine (100µg/L)	1 ml/L
Oligoéléments <sup>1</sup>	0,2 ml/L
Glucose	5 g/L

Composition de la solution d'oligoélément par litre<sup>1</sup> : 2,82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 98 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O ; 3,08 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ; 0,29 g NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 4,41 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Cette solution est gardée à 4°C.

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 avec Ca(OH)<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 15g d'agar sont ajoutés avant d'être stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

## Annexe 2 : Mise en contact *H. cylindrosporum* et *P. pinaster* « in vitro »

### Préparation des plantes.

Les plantes sont préparées selon le protocole décrit en annexe 1. Au bout de 2 mois de culture, 60 plantes non mycorhizées sont sélectionnées.

#### Etape 1 : Rinçage des plantes.

Après deux mois, la solution N1 +P est éliminée en totalité et les tubes sont rincés avec une solution de CaSO<sub>4</sub> 0,2 mM stérile (20 ml/tube) avant d'être complètement remplis avec 30 ml de CaSO<sub>4</sub> 0,2 mM stérile. Les plantes sont incubées en chambre de culture (PP : 16h8h ; T : 20 °C ; HR: 60% ; PPF<sub>D</sub> : 300 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) pendant une semaine. La solution de chaque tube est aérée par de l'air stérile. Cette étape permet de laver le système racinaire et principalement d'éliminer le Pi.

#### Etape 2 : Acclimatation des plantes dans le « milieu d'interaction ».

Après une semaine, le CaSO<sub>4</sub> 0,2 mM est remplacé par 30 mL de « milieu d'interaction » (MI) stérile à pH 5,5 (expérience 1) et à pH 7,1 (expérience 2) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Composition du « milieu d'interaction » (MI)

Solution mère	Concentration finale
MgSO <sub>4</sub> (1M)	0,2 mM
CaCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,5 mM
TRIS	5 mM
MES	5 mM

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 (expérience 1) ou à 7,1 (expérience 2) avec de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, avant d'être stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Les plantes sont incubées en chambre de culture pendant 24h. La solution de chaque tube est aérée par de l'air stérile.

### Préparation des thalles.

#### Etape 1 : Culture liquide des thalles D2.

60 implants fongiques de D2 de 8 mm de diamètre provenant de cultures solides fraîches sont repiqués sur 40 mL de milieu N6 +P 1 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) liquide (Tableau 2) dans des flacons de 125 mL.

**Tableau 2.** Composition du milieu N6 +P 1 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) liquide

Solution mère (molarité)	Concentration finale
KNO <sub>3</sub> (1M)	6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1M)	1 mM
KCl (1M)	4 mM
CaCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,5 mM
Citrate ferrique (1%)	1 ml/L
Thiamine (100µg/L)	1 ml/L
Oligoéléments <sup>1</sup>	0,2 ml/L
Glucose	5 g/L

Composition de la solution d'oligoélément par litre<sup>1</sup> : 2,82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 98 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O ; 3,08 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ; 0,29 g NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 4,41 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Cette solution est gardée à 4°C.

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 avec Ca(OH)<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, avant d'être stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Les thalles sont cultivés en chambre de culture (25 °C, obscurité) pendant 1 semaine dans ce milieu.

Etape 2 : Mise en carence des thalles.

Après une semaine, les 55 thalles sont égouttés, rincés dans des béciers stériles contenant du milieu N6 -P puis transférés dans un milieu N6 -P (Tableau 3) et cultivé en chambre de culture pendant 5 jours. 5 thalles sont conservés en milieu N6 +P.

**Tableau 3.** Composition du milieu N6 -P liquide

Solution mère (molarité)	Concentration finale
KNO <sub>3</sub> (1M)	6 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1M)	1 mM
KCl (1M)	4 mM
CaCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,5 mM
Citrate ferrique (1%)	1 ml/L
Thiamine (100µg/L)	1 ml/L
Oligoéléments <sup>1</sup>	0,2 ml/L
Glucose	5 g/L

Composition de la solution d'oligoélément par litre<sup>1</sup> : 2,82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 98 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O ; 3,08 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ; 0,29 g NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 4,41 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Cette solution est gardée à 4°C.

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 avec Ca(OH)<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, avant d'être stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Les thalles sont cultivés en chambre de culture pendant 5 jours dans ce milieu.

Etape 3 : Charge des thalles.

Après 5 jours, on transfère les 50 thalles dans le milieu N6 +P 1 mM pendant 16 heures en chambre de culture. Les 5 thalles conservés en N6 +P et 5 thalles cultivés en N6 -P sont arrêtés avant la charge. Les thalles frais sont pesés, fixés dans l'azote et broyés. Ils sont ensuite conservés à – 80°C.

#### Mise en contact des thalles de *H. cylindrosporum* et des racines de *P. pinaster*.

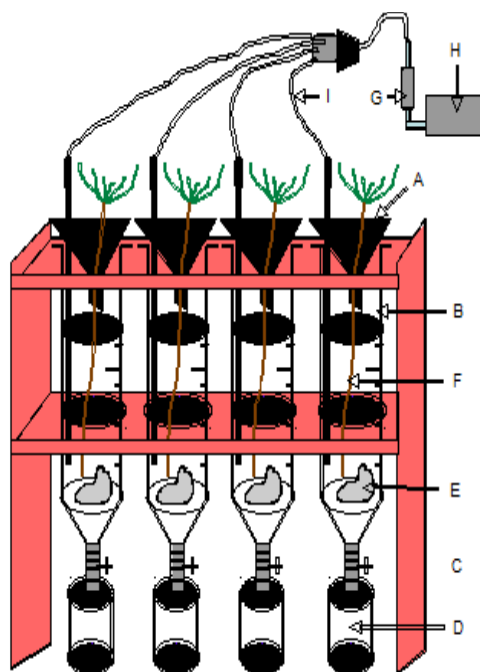
Etape 1 : Rinçage des thalles.

5 thalles sont arrêtés avant le rinçage. Les thalles frais sont pesés, fixés dans l'azote et broyés. Ils sont ensuite conservés à – 80°C. 35 thalles sont ensuite incubés dans 35 seringues de 60 mL contenant 15 mL de milieu d'interaction à pH 5,5 (expérience 1) et à pH 7,1 (expérience 2),

renouvelé toutes les 15 minutes pendant 1h30.

Etape 2 : Mise en contact.

A la fin du rinçage, 5 thalles sont arrêtés. Les thalles frais sont pesés, fixés dans l'azote et broyés. Ils sont ensuite conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ensuite, 60 mL de milieu d'interaction sont ajoutés dans chaque seringue (figure 1). Les différents traitements testés sont décrits dans le tableau 4.



**Figure 1.** Représentation schématique du dispositif expérimental permettant de mesurer l'efflux de  $\text{P}_i$  entre le champignon, *Hebeloma cylindrosporum* et la plante, *Pinus pinaster*. A. entonnoir ; B. seringue contenant le milieu d'interaction ; C. robinet ; D. récipient collecteur ; E. Thalle ; F. système racinaire ; G. filtre stérile ; H. pompe ; I. aération.

**Tableau 4.** Plan expérimental pour éliciter les hyphes de *Hebeloma cylindrosporum* en présence de *Pinus pinaster* dans un « milieu d'interaction ». L'effet de la plante est testée en ajoutant 3 plantes de Pin par seringue. 5 répétitions sont réalisées par temps d'incubation. 3 temps d'incubation sont effectués.

Traitement	Temps d'incubation	Pin (P)	Champignon (H)	Nombre de plantes	Nombre de champignon
PP	0h	+	-	15	
	6h	+	-	10	
	24h	+	-	5	
	48h	+	-	0	
HH	0h	-	+		15
	6h	-	+		10
	24h	-	+		5
	48h	-	+		0
PH	0h	+	+	15	15
	6h	+	+	10	10
	24h	+	+	5	5
	48h	+	+	0	0

Au temps 0h, pour chaque seringue, le volume est noté et 1 mL de milieu d'interaction sont prélevés. La concentration en P du milieu d'interaction est dosée.

Au temps 6h, pour chaque seringue, le volume restant est noté et 1 mL de milieu d'interaction sont prélevés. La concentration en P du milieu d'interaction est dosée. 5 seringues (5-10) de chaque traitements sont prélevées en totalité (60 mL du milieu d'interaction, thalles si présents, pins si présents). Pour toutes les autres seringues, une plante est prélevée. Le poids frais des parties aériennes et racinaires ainsi que des thalles est mesuré. Les pins et les thalles sont fixés dans de l'azote et conservés à -80°C.

Au temps 24h, pour chaque seringue, le volume restant est noté et 1 mL de milieu d'interaction sont prélevés. La concentration en P du milieu d'interaction est dosée. 5 seringues (6-10) sont arrêtées comme ci-dessus. Une plante est prélevée dans les seringues restantes.

Au temps 48h, pour chaque seringue, le volume restant est noté et 1 mL de milieu d'interaction sont prélevés. La concentration en P du milieu d'interaction est dosée. 5 seringues (7-15) sont récoltées.

Le dosage du Pi dans un milieu se fait selon le protocole suivant :

- Préparation d'une gamme étalon de 0 à 400 µg P/L.
- Dépôt de 200 µL de gamme ou de solution échantillonnée dans les puits d'une plaque 96 puits.
- Dépôt de 20 µL de réactif R1.
- Dépôt de 20 µL de réactif R2 (vert de malachite).

Le dosage du P se fait à une longueur d'onde de 630 nm.

### Annexe 3 : Quantification de l'expression de *HcPT1.2*

#### Extraction des ARN totaux du champignon *Hebeloma cylindrosporum*.

Etape 1 : Broyage des thalles.

Les thalles prélevés dans les seringues et conservés au congélateur sont plongés dans l'azote avant d'être broyés selon le protocole suivant :

- Déposer le champignon dans un mortier préalablement autoclaver à l'aide d'une pince.
- Verser de l'azote liquide dans le mortier et broyer le champignon en une poudre fine.
- Conserver le broyat dans un tube « epenforf » à – 80°C.

Etape 2 : Extraction des ARN totaux du champignon.

L'extraction des ARN du champignon est réalisée grâce au kit « Rneasy Pant Mini kit » selon le protocole suivant :

- Le tampon d'extraction (TE) est complété par du DTT (20 µL pour 1 mL de tampon).
- Ajouter rapidement à l'aide d'un cône 1000 coupé 1 mL de tampon TE complété.
- Mélanger par inversion.
- Homogénéiser 20 secondes à 6 m/s.
- Incuber 30 minutes en mélangeant de temps à autre.
- Transférer le liquide dans la colonne violette du kit.
- Centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm à 20 °C.
- Transférer le sous-nageant dans un tube de 2 mL sans toucher au culot et en reprenant le moins possible de particule en suspension.
- Ajouter un volume (environ 750 µL) d'éthanol 100 % et mélanger par inversion.
- Centrifuger 15 minutes à 13 500 rpm à 20 °C.
- Eliminer le surnageant avec un cône et sécher le tube avec un papier kimwips sans toucher au culot.
- Reprendre le culot dans 200 µL d'eau DEPC (Rnase free) en pipetant jusqu'à la dissolution complète.
- Ajouter 350 µL de tampon RTL supplémenté par du DTT (20 µL pour 1 mL de RTL) puis mélanger en pipettant.
- Transférer le liquide dans la colonne bague violette.
- Centrifuger 30 secondes à 10 000 rpm.
- Ajouter un volume (environ 250 µL) d'éthanol 100 % et mélanger par inversion.
- Déposer immédiatement le mélange sur la colonne Rneasy du kit (rose).
- Centrifuger 15 secondes à 10 000 rpm et éliminer le sous-nageant.
- Ajouter 700 µL de RW1.
- Centrifuger 15 secondes à 10 000 rpm et éliminer le sous-nageant.
- Ajouter 500 µL de RPE supplémenté en éthanol.
- Centrifuger 15 secondes à 10 000 rpm et éliminer le sous-nageant.
- Ajouter 500 µL de RPE supplémenté en éthanol.
- Centrifuger 15 secondes à 10 000 rpm et éliminer le sous-nageant.
- Centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm.
- Changer le tube collecteur.
- Centrifuger 1 minutes à 13 000 rpm.
- Mettre la colonne dans un tube de 1,5 mL.
- Ajouter 50 µL d'eau DEPC.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 1 minute à 13 000 rpm et jeter la colonne.

- Conserver l'ARN à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Une fois extrait les ARN sont dosés au Ribogreen (Quant-iT Ribogreen RNA assay kit, molecular probes, Invitrogen,) et 6  $\mu\text{L}$  sont déposés sur un gel à 1% d'agarose.

### Mesure de l'expression de *HcPT1.2*.

Etape 1 : Transformation des ARN en ADNc par RT-PCR.

La transformation de 500 ng d'ARN en ADNc est réalisée par une RT-PCR (Tableau 1) grâce à l'enzyme M-MLV reverse transcriptase Rnase H minus (M3682, Promega) et à des oligo(dT) utilisés comme amorces.

**Tableau 1. Transformation des ARN totaux en ADNc par une transcription inverse.**

Composé	Volume ( $\mu\text{L}$ )
ARN 500 ng	
Oligo dT 5 $\mu\text{M}$	2
H <sub>2</sub> O DEPC	Jsq 14
70 °C pendant 5 minutes	
Sur glace pendant 5 minutes	
Tampon 5X MMLV RT	5
dNTP 10 mM	2,5
Reverse transcriptase	1
42 °C pendant 1 heure	

Etape 2 : Mesure de l'expression de *HcPT1.2* par PCR quantitative.

La mesure du niveau d'expression de *HcPT1.2* (ainsi que de *HcPT1.1* et *HcPT2*) est réalisée par une PCR quantitative à partir de 2  $\mu\text{L}$  d'ADNc dilué deux fois et 8  $\mu\text{L}$  de mélange PCR (1 $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O, 1 $\mu\text{L}$  amorces forward (10  $\mu\text{M}$ ), 1 $\mu\text{L}$  amorce reverse (10  $\mu\text{M}$ ) (Tableau 2) et 5  $\mu\text{L}$  de mix contenant une Taq DNA polymerase et un tampon (SYBR Green) (Absolute QPCR SYBR Green ROX mix, Abgene)) (Tableau 3). La tubuline est utilisée comme gène de ménage.

Une gamme est réalisée à partir de dilutions de mini-préparations, précédemment obtenu, d'un facteur  $10^8$  à  $10^2$  pour quatre gènes (tubulines, *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2*). 2  $\mu\text{L}$  de chaque dilutions sont déposés dans des puits de la plaque pour 8  $\mu\text{L}$  de mélange PCR.

**Tableau 2. Boîtes d'amorces pour mesurer le niveau d'expression de la tubuline, de *HcPT1.1*, de *HcPT1.2* et de *HcPT2*.**

**Tableau 3. Amplification de fragments correspondant à la tubuline, *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2* dans une plaque 96 puits par les couples d'amorces décrit dans le tableau 3, par une PCR quantitative de 40 cycles.**

Composé	Volume/puits ( $\mu\text{L}$ )
Syber green mix 2X	5
Primer dir 10 $\mu\text{M}$	1
Primer rev 10 $\mu\text{M}$	1
H <sub>2</sub> O	1
ADNc	2

## Annexe 4 : Mesure de l'activité du promoteur du gène *HcPT1.2*

### Clonage du promoteur PPT1.2 délété en quatre fragments.

Etape 1 : Commande des amorces pour amplifier le promoteur PPT1.2.

Pour réaliser la délétion du promoteur PPT1.2, 4 couples d'amorces ont été commandé (Tableau 1). Ces amorces possèdent des sites de restriction SpeI. Les amorces sont utilisées à une concentration de 10 µM.

**Tableau 1.** Boîtes d'amorces pour le clonage du promoteur PPT1.2.

Amorces	Séquences (5' -> 3')	Amplifications
PPT1.2-For-SpeI-1	<b>ACTAGT</b> GAGTCGGTTCAAAAGTCGACT	Fragment 1 promoteur PPT1.2 (937 bp)
PPT1.2-Rev-SpeI	<b>ACTAGT</b> CCTGGATACTGTTCGAGTAGTT	
PPT1.2-For-SpeI-2	<b>ACTAGT</b> GCCACAGACACCAGTATCC	Fragment 2 promoteur PPT1.2 (716 bp)
PPT1.2-Rev-SpeI	<b>ACTAGT</b> CCTGGATACTGTTCGAGTAGTT	
PPT1.2-For-SpeI-3	<b>ACTAGT</b> CCATTCACCGATGATCCACTC	Fragment 3 promoteur PPT1.2 (592 bp)
PPT1.2-Rev-SpeI	<b>ACTAGT</b> CCTGGATACTGTTCGAGTAGTT	
PPT1.2-For-SpeI-4	<b>ACTAGT</b> ACAAACGACCTTCCGACATAC	Fragment 4 promoteur PPT1.2 (184 bp)
PPT1.2-Rev-SpeI	<b>ACTAGT</b> CCTGGATACTGTTCGAGTAGTT	

Etape 2 : Amplification des quatre fragments du promoteur PPT1.2.

L'amplification des fragments est réalisées par PCR (Tableau 2) grâce à une polymérase haute fidélité (i Proof High Fidelity DNA Polymerase, BIORAD).

**Tableau 2.** Amplification des quatre fragments du promoteur PPT1.2, grâce aux quatre couples d'amorces décrit dans le tableau 1, par une PCR de 30 cycles.

Composé	Vomule (µL)	Température (°C)	Temps (sec)
ANDg h7 (15 ng)	1	95	300
H <sub>2</sub> O	16,35	95	30
Tampon (10X)	5	58	30
dNTP (10 mM)	0,5	72	40
PPT1.2 For (10 µM)	1,25	72	120
PPT1.2 Rev (10 µM)	1,25	4	
i Proof polymerase	0,15		

Etape 3 : Purification sur gel des quatre fragments du promoteur PPT1.2.

La totalité du volume d'amplification (25,5 µL) est déposé sur un gel d'agarose à 1%. Les bandes d'amplifications sont récupérées avec un scapel sous une lumière UV puis purifié grâce au kit « Gene JET PCR purification kit » (Fermentas) selon le protocole suivant :

- Ajouter 200 µL de tampon de liaison « Binding buffer ».
- Chauffer au bain sec à 65 °C pour dissoudre les morceaux de gel.
- Transférer la solution dans la colonne de purification.
- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm.
- Éliminer le surnageant.
- Ajouter 700 µL de tampon de lavage « Wash buffer ».
- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm.

- Eliminer le surnageant.
- Centrifuger la colonne vide pendant 1 min à 13 000 rpm.
- Placer la colonne dans un tube ependorf de 1,5 mL.
- Ajouter 30 µL d'eau ultra purification.
- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm.
- Doser l'ADN purifié par nanodrop 1000.

Etape 4 : Ligation des fragments dans le vecteur pCR1.2.

Les fragments du promoteur PPT1.2 sont insérés dans le vecteur pCR1.2 (Tableau 3) par une étape de ligation grâce au kit « Zero Blunt PCR Cloning Kit » (Invitrogen) pendant 4h à température ambiante.

**Tableau 3.** Ligation des fragments du promoteur PPT1.2 dans le vecteur pCR1.2, avec un ratio plasmique/insert : 1 pour 3.

Composé	Volume (µL)
PCR2.1 vector (25 ng/µL)	1
Insert	3 [plasmide]
Tampon 10X	2
T4 DNA ligase	1
H <sub>2</sub> O	>20 µl

Etape 5 : Transformation des bactéries par les vecteurs pCR2.1 contenant les fragments du promoteur PPT1.2.

La transformation des bactéries est effectuée selon le protocole suivant :

- Les bactéries compétentes, aligotés dans des tubes de 50 µL, sont décongelées sur glace.
- 10 µL de ligation sont mélangés avec 25 µL de bactéries compétentes.
- Incubation pendant 30 minutes dans de la glace.
- Un choc thermique est réalisé pendant 45 secondes à 42 °C.
- Incubation pendant 5 minutes dans de la glace.
- 400 µL de milieu LB (Luria Broth) (Tableau 4) sont ajoutés sous hotte.
- Incubation pendant 1 heure à 37 °C, sous agitation.
- Étaler 100 µL sur des boîtes LB/Kanamycine (1µL/mL), sur la nuit à 37°C.

**Tableau 4.** Composition du milieu LB (Luria Broth).

Composants	Concentration (g/L)
Metapetone	10
NaCl	5
Extrait de levure	5
Agar	15

Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

Etape 6 : PCR sur colonies.

Une PCR sur colonies (Tableau 5) est réalisée sur les colonies obtenues pendant la nuit grâce à la GoTaq DNA Polymerase (Promega). Cette PCR permet d'identifier les clones positifs, c'est à dire ceux qui contiennent notre insert (fragments du promoteur PPT1.2).

**Tableau 5.** Amplification de chaque fragments du promoteur PPT1.2, par une PCR de 25 cycles.

Composé	Vomule (µL)	Température (°C)	Temps (sec)
H <sub>2</sub> O	16,875	95	300
Tampon (5X)	5	95	60
dNTP (10 mM)	0,5	58	60
M13 For (10 µM)	1	72	75
M13 Rev (10 µM)	1	72	120
Gotaq polymerase	0,075	4	

Les clones positifs sont ensuite mis en culture dans 3 mL de LB/Kanamycine (1µL/mL), sur la nuit à 37 °C, sous agitation.

Etape 7 : Minipréparation.

Les fragments du promoteur PPT1.2 insérés dans les vecteurs pCR2.1 sont récupérés grâce au kit « Gene JET Plasmide Miniprep kit » (Fermentas) selon le protocole suivant :

- Centrifuger la culture liquide 10 minutes à 12000 g.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter au culot 250 µL de tampon de resuspension « Resuspension buffer » et resuspendre le culot en vortexant.
- Ajouter 250 µL de tampon de lyse « Lysis buffer » et mélanger en inversant le tube (6 fois).
- Ajouter 350 µL de tampon de neutralisation « Neutralisation buffer » et mélanger en inversant le tube (6 fois).
- Centrifuger 5 minutes à 12000 g.
- Transférer le surnageant dans les colonnes de purification.
- Centrifuger 1 minute à 12000 g.
- Éliminer le sous-nageant.
- Ajouter 500 µL de tampon de lavage « Wash buffer », centrifuger 1 minute à 12000 g et éliminer le sous-nageant.
- Répéter la même opération une deuxième fois.
- Centrifuger la colonne vide 1 minute à 12000 g.
- Placer la colonne dans un tube ependorf de 1,5 mL.
- Ajouter 50 µL d'eau ultra pur et incubé pendant 2 minutes.
- Centrifuger 2 minutes à 12 000 g.
- Doser l'ADN purifié par nanodrop 1000.

Etape 8 : Digestion des minipreps et du vecteur pPZP133 contenant une cassette GFP et un terminateur T35S.

Les fragments du promoteur PPT1.2 insérés dans le vecteur pCR2.1 sont récupérés grâce à une digestion par l'enzyme de restriction SpeI (Fermentas) (Tableau 6) pendant 1h30 à 37 °C. Lorsqu'un vecteur est coupé par une seule enzyme de restriction, il est nécessaire de le déphosphoryler en ajoutant 1 µL d'alcaline phosphatase (AP) et 2 µL de tampon (AP) pendant 30 minutes à 37 °C.

**Tableau 6. Récupération des fragments du promoteur PPT1.2 à partir du vecteur pCR1.2 par une digestion par SpeI.**

Composé	Volume (µL)
Miniprep	5
Tampon fast digest (10X)	2
SpeI	1
H <sub>2</sub> O	12

Etape 9 : Purification sur gel.

La totalité du volume de digestion (20 µL) est déposé sur un gel d'agarose à 1%. Les bandes sont récupérées avec un scalpel sous une lumière UV puis purifié grâce au kit « Gene JET PCR purification kit » (Fermentas).

Etape 10 : Ligation des fragments dans le vecteur pPZP133 contenant une cassette GFP et un terminateur T35S.

Les fragments du promoteur PPT1.2 sont insérés dans le vecteur pPZP133 (Tableau 7) par une étape de ligation pendant 4h à température ambiante.

**Tableau 7. Ligation des fragments du promoteur PPT1.2 dans le vecteur pPZP133, avec un ratio plasmique/insert : 1 pour 5.**

Composé	Volume (µL)
Vecteur pPZP133	1
Insert	5 [plasmide]
Tampon (10X)	2
T4 DNA ligase	1
H <sub>2</sub> O	>20 µl

Etape 11 : Transformation des bactéries par les vecteurs pPZP133 contenant les fragments du promoteur PPT1.2.

La transformation est réalisée selon le protocole décrit dans l'étape 5.

Etape 12 : PCR sur colonies.

Une PCR sur colonies (Tableau 8) est réalisée sur les colonies obtenues pendant la nuit grâce à la GoTaq DNA Polymerase (Promega). Cette PCR permet d'identifier les clones positifs, c'est à dire ceux qui contiennent notre insert (fragments du promoteur PPT1.2).

**Tableau 8. Amplification de chaque fragments du promoteur PPT1.2, par une PCR de 25 cycles.**

Composé	Vomule (µL)	Température (°C)	Temps (sec)
H <sub>2</sub> O	16,875	95	300
Tampon (5X)	5	95	60
dNTP (10 mM)	0,5	58	60
pPZP For (10 µM)	1	72	75
pPT2.1 rev (10 µM)	1	72	120
Gotaq polymerase	0,075	4	

Les clones positifs sont ensuite mis en culture dans 3 mL de LB/Kanamycine (1µL/mL), sur la nuit à 37 °C, sous agitation.

Etape 13 : Minipréparation.

Les fragments du promoteur PPT1.2 insérés dans les vecteurs pPZP133 sont récupérés grâce au kit « Gene JET Plasmide Miniprep kit » (Fermentas) selon le protocole décrit dans l'étape 7. Les minipreps sont dosés au nanodrop 1000.

Etape 14 : Séquençage.

25 µL de miniprep et 5 µL d'eau ultra pur sont envoyés à séquencer ...

#### Transformation du champignon *Hebeloma cylindrosporum*.

Etape 1 : Mise en culture d'*Hebeloma cylindrosporum* (souche h7)

Environ 1 mois avant la transformation, il est nécessaire de faire une pré-culture du mycélium selon le protocole suivant :

- Faire un boyat de thalle de h7 recouvrant une boîte de 90 mm.
- Le répartir dans deux boîtes de milieu YMG liquide (Tableau 10).
- Après une semaine, si le thalle a repoussé, broyer à l'ultra-turrax, deux thalles dans 80 mL du même milieu.
- Répartir ces 80 mL de milieu entre 4 boîtes de 90 mm de diamètre. Le but est de broyer de plus en plus fréquemment afin d'obtenir la formation d'un thalle en 24-48 heures. Il est alors prêt pour être Agrotransformé.

**Tableau 9.** Composition du milieu YMG liquide.

Composants	Concentration (g/L)
Extrait de levure	4
Extrait de malt	10
Glucose	4

Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Pour faire du YMG solide, il est nécessaire de rajouter 8,5 g/L d'agar.

Etape 2 : Mise en culture d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA1126)

La mise en culture d'*Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole suivant :

- Mettre une colonie des bactéries de la souche LBA1126 conservée dans des stock glycérol dans 50 mL de milieu LB modifié (Tableau 9) supplémenté par de la rifampicine (50 µg/mL).
- Incuber une nuit à 28°C.
- Centrifuger les 50 mL de culture à 6000 rpm pendant 5 minutes.
- Éliminer le surnageant et sécher le culot (tubes inversé et kimwipes)
- Resuspendre le culot dans 1 mL de CaCl<sub>2</sub> froid (20 mM) et conserver les bactéries dans la glace.

**Tableau 10.** Composition du milieu LB modifié (absence de NaCl).

Composants	Concentration (g/L)
Hydrolysate de caséine	10
Extrait de levure	5

Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Pour faire du LB modifié solide, il est nécessaire de rajouter 8,5 g/L d'agar.

Etape 3 : Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA1126)

La transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole suivant :

- Mélanger 100 µL d'agrobactéries avec 1 µL des minipréparations contenant les vecteurs

d'intérêts.

- Incuber dans la glace pendant 30 minutes.
- Congeler dans l'azote liquide rapidement.
- Incuber à 37 °C pendant 5 minutes.
- Ajouter 1 mL de LB modifié au mélange agrobactéries/plasmides.
- Incuber sous agitation à 28 °C pendant 2 heures.
- Etaler ce mélange sur des boîtes de LB modifié supplémenté par de la kanamycine (50 µg/mL).
- Incuber à 28 °C.
- Des colonies apparaissent après deux à trois jours de culture.

Etape 4 : Préparation de l'agroransformation d'*Hebeloma cylindrosporum* (souche h7)

50 disques de microfibre de verre de 6 mm de diamètre par vecteur doivent être découpés. Les filtres de microfibrilles de verre sont placés régulièrement dans des boîtes de verre de 140 mm de diamètre contenant une feuille de papier filtre stérile (100 filtres/boîte). Les boîtes de verre contenant les filtres sont stérilisées au four pasteur à 180°C durant 3-4 heures.

Le mycélium est broyé dans 80 mL de milieu YMG liquide, trois jours avant la transformation. Ces 80 mL sont répartis dans 4 boîtes de Pétri de 90 mm. La mise en culture et la transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* sont également réalisés ce jour là, comme décrit précédemment.

Le veille de la transformation du champignon, le mycélium est broyé, à nouveau, dans 80 mL de YMG liquide. Ces 80 mL sont répartis dans 4 boîtes de Pétri de 90 mm. 20 mL de milieu liquide LB modifié supplémenté en kanamycine (50 µg/mL) et en rifampicine (50 µg/mL) sont inoculés par une colonie de bactérie. Les bactéries sont incubées pendant 16 heures à 28 °C, sous agitation constante.

En cas de contaminations des thalles observée, les broyages sont fait dans du milieu YMG supplémenté en kanamycine (50 µg/mL), en streptomycine (30 µg/mL), en chloramphénicol (30 µg/mL) et en de carbenicilline (50 µg/mL).

Etape 5 : Agroransformation d'*Hebeloma cylindrosporum* (souche h7)

La transformation est réalisée selon le protocole suivant :

- Centrifuger la suspension bactérienne dans des tubes Falcon de 50 mL stériles à 3500 rpm pendant 10 minutes.
- Reprendre le culot dans 5 mL de milieu d'induction liquide (IM + MES + AS) (Tableau 11).
- Prélever 100 µL de la suspension, les diluer au 1/10 ème avec 900 µL de milieu d'induction. Lire l'absorbance à 660 nm.
- Diluer la suspension bactérienne avec du milieu d'induction liquide pour avoir une culture de 5 mL à un D.O à 660 nm de 0,15.
- Incuber sous agitation constante, à 28 °C pendant 4 à 6h.
- En théorie, la DO finale à 660 nm est égale à 0,3 à 0,4. Elle n'est pas mesurée.

**Tableau 11.** Composition du milieu d'induction liquide (100 mL de milieu).

Composants	Quantité
Solution mère de sels (2,5X) <sup>1</sup>	40 mL
Glucose (10 mM)	0,18 g
glycérol	0,5 mL
MES <sup>2</sup> (1M)	4 mL
AS <sup>3</sup> (10 mM)	2 mL

Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C, pendant 20 minutes avant l'ajout de MES et d'acétosyringone.

Composition de la solution mère de sels (MM) à 2,5X par litre<sup>1</sup> : 3,625 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 5,125 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,375 g NaCl ; 1,250 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O ; 0,125 g CaCl<sub>2</sub> ; 0,0062 g FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O ; 1,250 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cette solution est gardée à 4°C.

Composition de la solution mère de MES 1M pour 100 mL<sup>2</sup> : dissoudre 19,52 g de MES dans 70 mL d'eau. Ajuster le pH à 5,3 avec du KOH 1M. Compléter à 100 mL d'eau. Stériliser par filtration.

Composition de la solution mère d'acétosyringone (AS) 10 mM pour 10 mL<sup>3</sup> : Ajouter 19,62 mg de AS dans 10 mL d'eau. Agiter pendant au moins 2h, emballé dans de l'aluminium. Ajuster le pH à 8 avec du KOH 1M, pour avoir une coloration jaune. Stériliser par filtration.

- Après 4 à 6 heures de croissance de la bactérie, récupérer le mycélium qui recommence à former une galette, essorer le dans le couvercle de la boîte de Pétri et placer les thalles issus de deux boîtes de Pétri dans 80 mL de milieu YMG liquide.
- Broyer à l'Ultra-Turrax.
- Déposer 50 µL de suspension de mycélium homogénéisée sur chacun des disques de fibre de verre en utilisant des cônes préalablement coupés et stérilisés.
- Déposer les filtres inoculés avec le champignon dans une boîte de Pétri carré contenant du milieu d'induction solide (IM + MES + AS) (Tableau 12).
- Déposer 40 µL de suspension bactérienne sur les filtres.
- Parafilmer les boîtes et les mettre à incuber 72 heures à 24 °C.

La rapidité d'exécution entre le dépôt du champignon, le transfert sur milieu d'induction et l'ajout de la bactérie est primordiale.

**Tableau 12.** Composition du milieu d'induction solide (1 L de milieu).

Composants	Quantité
Solution mère de sels (2,5X) <sup>1</sup>	400 mL
Glucose (5 mM)	0,9 g
glycérol	5 mL
Agar	8,5 g
MES <sup>2</sup> (1M)	40 mL
AS <sup>3</sup> (10 mM)	20 mL

Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C, pendant 20 minutes avant l'ajout de MES et d'acétosyringone.

Composition de la solution mère de sels (MM) à 2,5X par litre<sup>1</sup> : 3,625 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 5,125 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,375 g NaCl ; 1,250 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O ; 0,125 g CaCl<sub>2</sub> ; 0,0062 g FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O ; 1,250 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cette solution est gardée à 4°C.

Composition de la solution mère de MES 1M pour 100 mL<sup>2</sup> : dissoudre 19,52 g de MES dans 70 mL d'eau. Ajuster le pH à 5,3 avec du KOH 1M. Compléter à 100 mL d'eau. Stériliser par filtration.

Composition de la solution mère d'acétosyringone (AS) 10 mM pour 10 mL<sup>3</sup> : Ajouter 19,62 mg de AS dans 10 mL d'eau. Agiter pendant au moins 2h, emballé dans de l'aluminium. Ajuster le pH à 8 avec du KOH 1M, pour avoir une coloration jaune. Stériliser par filtration.

Etape 6 : Sélection des transformants.

Le transfert sur milieu de sélection (YMG supplémenté en carboxine, rifampicine et vancomycine) a lieu trois jours après la transformation du champignon. 10 filtres sont placés sur des boîtes de

Pétri de 90 mm de diamètre contenant du milieu de sélection, soit 4 boîtes par transformation (Tableau 13). Les boîtes sont parafilmées et incubées à 24 °C.

**Tableau 13.** Composition du milieu de sélection solide (1 L de milieu).

Composants	Concentration (g/L)
Extrait de levure	4
Extrait de malt	10
Glucose	4
Agar	8,5

Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C, pendant 20 minutes avant l'ajout de rifampicine (200 mM) et de carboxyne (0,2 µg /mL) et de vancomycine.

Les transformants n'apparaissent pas avant 10 jours de contact sur le milieu sélectif. Au bout de 10 à 15 jours (pas plus), les transformants sont repiqués sur un milieu sélectif supplémenté en carboxine, en boîte de Pétri de 55 mm pour les individualiser et confirmer le phénotype de résistance. Il est nécessaire de réaliser une série de repiquages sur milieu non sélectif, pour chaque transformant, puis un dernier repiquage sur milieu sélectif pour confirmer la stabilité mitotique du trait de résistance apporté par le transgène.

Etape 7 : Confirmation de la présence des constructions chez les transformants.

Culture des souches mutantes :

9 transformants pour chaque construction sont repiqués dans un pot Copro de 50 mL contenant 15 mL de milieu N6 +P liquide (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) liquide (Tableau 14). Les thalles sont cultivés en chambre de culture (25 °C à l'obscurité) pendant 1 semaine.

**Tableau 14.** Composition du milieu de culture N6 +P liquide.

Solution mère (molarité)	Concentration finale
KNO <sub>3</sub> (1M)	6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1M)	1 mM
KCl (1M)	4 mM
CaCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,5 mM
Citrate ferrique (1%)	1 ml/L
Thiamine (100µg/L)	1 ml/L
Oligoéléments <sup>1</sup>	0,2 ml/L
Glucose	5 g/L

Composition de la solution d'oligoélément par litre<sup>1</sup> : 2,82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 98 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O ; 3,08 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ; 0,29 g NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 4,41 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Cette solution est gardée à 4°C.

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 avec Ca(OH)<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avant d'être stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Extraction de l'ADN génomique des transformants :

Les thalles sont broyés à l'azote liquide grâce à un pilon et un mortier. La fine poudre obtenue est conservée à – 80°C.

Pour extraire l'ADN génomique, le protocole suivant est suivi :

- Ajout de 1 mL de tampon d'extraction (Tableau 15) préchauffé à 65 °C au broyat obtenu.
- Incubation 10 minutes à température ambiante (RT).
- Centrifugation 15 minutes à 15 000 g.

- Un volume de phénol à pH 8 (environ 1 mL) est ajouté au surnageant.
- Incubation 10 minutes à température ambiante (RT).
- Centrifugation 15 minutes à 15 000 g.
- Un volume de CI (Chloroforme/alcool isoamylique (24/1 ; v/v) est ajouté (environ 1 mL) au surnageant.
- Incubation 10 minutes à température ambiante (RT).
- Centrifugation 15 minutes à 15 000 g.
- 400 µL d'isopropanol sont ajoutés au surnageant pour précipiter l'ADN pendant une nuit à 20 °C.
- Le lendemain, les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à RT puis centrifugés pendant 10 minutes à 15 000g.
- Le surnageant est éliminé et le culot est lavé par 1 mL d'éthanol à 70 %.
- Centrifugation 5 minutes à 15 000 g.
- Le surnageant est éliminé et le culot est séché pendant 15 minutes.
- Le culot est ensuite repris dans 20 µL d'eau ultra pur.
- Dosage de l'ADNg au nanodrop 1000.

**Tableau 15.** Composition du tampon d'extraction (TE).

Composé	Concentration finale
NaCl	0,5 M
SDS	1%
Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM
Tris-HCl	10 mM

Une PCR est réalisée (Tableau 16) pour vérifier la présence des fragments de promoteur (amorces forward tableau 1) et de la GFP (amorces eGFP390rev) dans les souches mutantes à partir de 1 µL d'ADNg dilué au 100ème.

**Tableau 16.** Amplification des fragments du promoteur PPT1.2 et de la GFP, par une PCR de 25 cycles.

Composé	Vomule (µL)	Température (°C)	Temps (sec)
H <sub>2</sub> O	16,875	95	300
Tampon (5X)	5	95	60
dNTP (10 mM)	0,5	58	60
pPT2.1 for (10 µM)	1	72	105
eGFP rev (10 µM)	1	72	120
Gotaq polymerase	0,075	4	

Quantification de l'expression de PPT1.2, en réponse au Pi extérieur, par RT-qPCR.

Etape 1 : Culture liquide des souches mutantes.

Pour chaque construction, 9 transformants sont mis en culture pendant 10 jours à 25 °C à l'obscurité dans deux pots Copro de 125 mL contenant 30 mL de milieu N6 +P liquide (Tableau 14).

Après 10 jours, la moitié des thalles est transvasé dans un nouveau milieu N6 +P liquide et l'autre moitié dans un milieu N6 -P liquide (Tableau 17) pendant 4 jours en chambre de culture.

**Tableau 17.** Composition du milieu de culture N6 -P liquide.

Solution mère (molarité)	Concentration finale
KNO <sub>3</sub> (1M)	6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1M)	1 mM
KCl (1M)	4 mM
CaCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	0,5 mM
Citrate ferrique (1%)	1 ml/L
Thiamine (100µg/L)	1 ml/L
Oligoéléments <sup>1</sup>	0,2 ml/L
Glucose	5 g/L

Composition de la solution d'oligoélément par litre<sup>1</sup> : 2,82 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 98 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O ; 3,08 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ; 0,29 g NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 4,41 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Cette solution est gardée à 4°C.

Le pH de ce milieu est ajusté à 5,5 avec Ca(OH)<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avant d'être stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Etape 2 : Extraction ARN totaux des transformants.

Les thalles sont broyées à l'azote liquide grâce à un pilon et un mortier. La fine poudre obtenue est conservée à - 80°C.

Pour extraire les ARN totaux, le protocole suivant est suivi :

- Ajouter 1 mL de Trizol et laisser incuber 15 minutes à température ambiante (RT)
- Centrifuger 12 000 g pendant 10 minutes à 4 °C et transférer le surnageant dans un tube de 2 mL
- Ajouter 200 µL de chloroforme et agiter vigoureusement pendant 15 secondes
- Incuber 5 minutes à RT
- Centrifuger à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C
- Transférer la phase aqueuse dans un tube de 1,5 mL et ajouter 400 µL d'isopropanol
- Incuber une nuit à - 20 °C
- Centrifuger à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 1 mL d'EtOH à 75 %
- Centrifuger à 10 000 g pendant 5 minutes à 4 °C
- Eliminer l'éthanol et sécher le culot à RT
- Ajouter 20 µL d'eau ultra pur et resuspendre le culot en pipetant
- Doser les ARN au nanodrop 1000

Etape 3 : Elimination de l'ADNg des ARN totaux extraits.

Les ARN totaux extraits sont ensuite soumis à un traitement DNase (Fermentas) (Tableau 18).

**Tableau 18.** Protocole pour la réalisation du traitement DNase sur les ARN totaux extraits.

Composé	Quantité
ARN totaux	1 µg
Tampon 10X-MgCl <sub>2</sub>	1 µL
DNase I, Rnase-free	1 µL
eau DEPC	-> 10 µL

La DNase agit pendant 30 minutes à 37 °C.

Etape 4 : Vérification de la qualité des ARN extraits.

Pour vérifier la pureté des ARN, après le traitement à la DNase, une PCR (Tableau 19) est réalisée grâce à la GoTaq DNA Polymerase (Promega) à partir d'amorces tubulines ciblant l'ADN génomique sur 0,5 µL d'ARN extraits et traités à la DNase.

**Tableau 19.** Amplification du gène de la tubuline par une PCR 40 cycles.

Composé	Vomule (µL)	Température (°C)	Temps (sec)
H <sub>2</sub> O	16,875	95	300
Tampon (5X)	5	95	60
dNTP (10 mM)	0,5	58	60
Tubuline For (10 µM)	1	72	40
Tubuline rev (10 µM)	1	72	120
Gotaq polymerase	0,075	4	

Le produit PCR est ensuite déposé sur un gel d'agarose à 1 %.

Pour vérifier que les ARN ne sont pas dégradés, 1 µL sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % et mis à migrer pendant 1h à 50 mV.

Les ARN purifiés sont ensuite dosés au nanodrop 1000 et la DNase est inhibé (ajout de 2 µL d'EDTA à 25 mM et incubation à 65 °C pendant 5 minutes).

Etape 5 : Transformation des ARN en ADNc par RT-PCR.

La transformation de 1 µg d'ARN en ADNc est réalisée par une RT-PCR (Tableau 20) grâce à au kit « RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit » (Fermentas) .

**Tableau 20.** Transformation des ARN totaux en ADNc par une transcription inverse.

Composé	Volume (µL)
ARN 1000 ng	
Oligo dT 5µM	2
H <sub>2</sub> O DEPC	Jsq 24
65 °C pendant 5 minutes	
Sur glace pendant 5 minutes	
Tampon 5X	8
dNTP 10 mM	4
Ribolock Rnase inhibitor	2
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase	2
42 °C pendant 1 heure	
70 °C pendant 5 minutes	

Etape 2 : Mesure de l'expression de la eGFP par PCR quantitative.

La mesure du niveau d'expression de la *eGFP* (ainsi que du gène *HcPT1.1*, *HcPT1.2* et *HcPT2*) est réalisée par une PCR quantitative à partir de 2 µL d'ADNc dilué deux fois et 6 µL de mélange PCR (Tableau 22) à partir des couples d'amorces d'écrit dans le tableau 21. La tubuline est utilisée comme gène de ménage.

**Tableau 21.** Boîtes d'amorces pour mesurer le niveau d'expression de la tubuline, de la *eGFP*, de *HcPT1.1*, de *HcPT1.2* et de *HcPT2*.

**Tableau 22.** Amplification de fragments correspondant à la tubuline, *HcPT1.1*, *HcPT1.2* (amorces concentrées à 600 nM) dans une plaque 384 puits par les couples d'amorces décrit dans le tableau 21, par une PCR quantitative de 40 cycles.

Composé	Volume/puits (µL)
Syber green mix 2X	4
Primer dir 10µM	0,48
Primer rev 10 µM	0,48
H <sub>2</sub> O	1,04
ADNc	2

**Tableau 23.** Amplification de fragments correspondant à la *eGFP* (amorces concentrées à 1,2 µM) dans une plaque 384 puits par les couples d'amorces décrit dans le tableau 21, par une PCR quantitative de 40 cycles.

Composé	Volume/puits (µL)
Syber green mix 2X	4
Primer dir 10µM	0,96
Primer rev 10 µM	0,96
H <sub>2</sub> O	0,08
ADNc	2

**Tableau 24.** Amplification de fragments correspondant à la PT2 (amorces concentrées à 300 nM) dans une plaque 384 puits par les couples d'amorces décrit dans le tableau 21, par une PCR quantitative de 40 cycles.

Composé	Volume/puits (µL)
Syber green mix 2X	4
Primer dir 10µM	0,24
Primer rev 10 µM	0,24
H <sub>2</sub> O	1,52
ADNc	2