



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



FACULTE DES SCIENCES



U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
 École Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement
 Département de Formation Doctorale Biologie - Agronomie - Environnement
 Secteur Biologie Forestière

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Biologie Végétale et Forestière

par Sébastien DUPLESSIS

**Caractérisation par ingénierie génomique des profils
 d'expression génique de *Pisolithus tinctorius* et
 d'*Eucalyptus globulus* au cours du développement de la
 symbiose ectomycorhizienne**

Soutenue publiquement le 18 Avril 2001

Membres du jury :

Président :	M. Jean-Pierre Jacquot	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	M. Christophe Plomion	Chargé de Recherche, I.N.R.A.-Bordeaux
	M. Patrick Saindrenan	Chargé de Recherche, C.N.R.S.-Strasbourg
Examineurs :	M. Jean-Claude Debaud	Professeur, Université Claude Bernard, Lyon I
	M. Francis Martin	Directeur de Recherche, I.N.R.A.-Nancy

A Mesdames Roche, Truchot et Barrière

*Respectivement enseignantes en biologie
en collège, lycée et université*

Remerciements

Je voudrais remercier en premier lieu Francis Martin, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, il y a quelques années de cela et aussi pour m'avoir soutenu et toujours conseillé dans les moments où j'en avais le plus besoin. Je le remercie pour sa très grande disponibilité, pour ses précieux conseils et pour la patience dont il a su faire preuve à mon égard dans bien des occasions. Je te remercie surtout Francis pour la façon dont tu as conçu notre relation dans le travail que nous avons réalisé ensemble... Notamment, pour la très grande confiance que tu m'as accordée et pour cette capacité que tu as à me motiver autant dans mes activités de recherche !

Je tiens à remercier Messieurs Patrick Saindrenan et Christophe Plomion pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse de Doctorat. L'avènement de ce manuscrit aura été plein de péripéties pour moi et agrémenté de "quelques" retards pour eux. Je tiens à les remercier pour leur indulgence et leur compréhension. Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger ce travail et pour leurs encouragements.

Je voudrais aussi remercier les deux personnes qui m'ont formé aux techniques de biologie moléculaire et de génomique : Denis Tagu et Catherine Voiblet (viviane de la BM !!)... Je te remercie pour ta sympathie, Denis, et surtout pour ta patience lors de la dernière ligne droite de la rédaction de la thèse. Tu m'as été d'un précieux secours et d'une très grande disponibilité. Je tiens aussi à remercier les stagiaires que j'ai eu plaisir à encadrer au cours de cette thèse, même si parfois, j'aurais voulu me montrer plus présent. Plus particulièrement, Marine et Natacha. Les travaux que vous avez réalisés étaient d'une grande qualité, et j'ai eu plaisir à partager ces moments avec vous !

Je tiens aussi à remercier Pascale Frey-Klett, Jean Garbaye, Frédéric Lapeyrie et François Le Tacon pour l'amabilité et la disponibilité dont ils ont fait preuve au cours de ces quatre années de "microbes" en commun. Je les remercie tous, ainsi que Francis et Denis pour la manière dont fonctionne leur équipe... Cette synergie se ressent fortement de la part des étudiants-chercheurs et elle est extrêmement bénéfique à la réalisation de nos projets.

Je remercie aussi l'ensemble des Microbes et tout ce qu'ils ont pu m'apporter : JLJ (My Copilote Enhancer !!), Sofia, Béou, Cricrou, Dominique, Daniel, Patrice, Jean-Louis, Hubert, Chantal, Franck, Anne, tous les post-doctorants et DEA, et tous ceux qui passent et repartent (Tarikoto il piloto, Aneta-Maria Rincòn Heranz etc, etc..., Mirco con questo caz*** di telefonino).

Enfin, je remercie toutes les personnes extérieures à l'UMR et qui ont contribué à la réussite de mon travail. Je les remercie pour leur soutien au cours de ces derniers mois difficiles. Mes pensées vont à mon italienne, à ma mère et à toute la family connection de Montpellier. ET AUSSI à Nico et Laurent (+ Zombie Eaters)... Vivement des passages plus fréquents sur Bordeaux !! Mais aussi à tous ces amis qui m'ont, sans le savoir, énormément soutenu par leur amitié dans cette ville qui était l'autre bout du monde pour moi il y a encore quelques années (Stéphan et la famille Cornevaux, Yves, Cé, Mario, Tonny, Fanfan, Big Jim, Frédo et tous les "branques" de Zajedni).

Sommaire

Abbréviations

INTRODUCTION

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Chapitre 1 : Living Together Underground: a Molecular Glimpse of the Ectomycorrhizal Symbiosis. Dans <i>Molecular Biology of Fungal Development</i> (H Osiewacz, ed.), "Mycology Series", Dekker & Dekker, New York. 2001, sous presse.	6
---	---

RESULTATS

Chapitre 2 : Identification des gènes régulés par la symbiose ectomycorhizienne <i>Eucalyptus globulus</i> - <i>Pisolithus tinctorius</i> par hybridation différentielle de filtres d'ADNc.	23
---	----

Identification of symbiosis-regulated genes in <i>Eucalyptus globulus</i> - <i>Pisolithus tinctorius</i> ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. Plant Journal 25:181-192.	25
--	----

cDNA array analysis of ectomycorrhiza development. Manuscrit en préparation pour la revue Plant Physiology.....	36
---	----

Chapitre 3 : Clonage et analyse de l'expression de l'ADNc HydPt-3codant une nouvelle hydrophobine de <i>Pisolithus tinctorius</i>	52
--	----

Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete <i>Pisolithus</i> . Current Genetics, soumis. Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete <i>Pisolithus</i> . Current Genetics (sous presse).	53
--	----

Chapitre 4 : Caractérisation et analyse de l'expression de gènes codant des protéines de voies de transduction chez <i>Pisolithus tinctorius</i>	69
---	----

DISCUSSION GENERALE.....	90
--------------------------	----

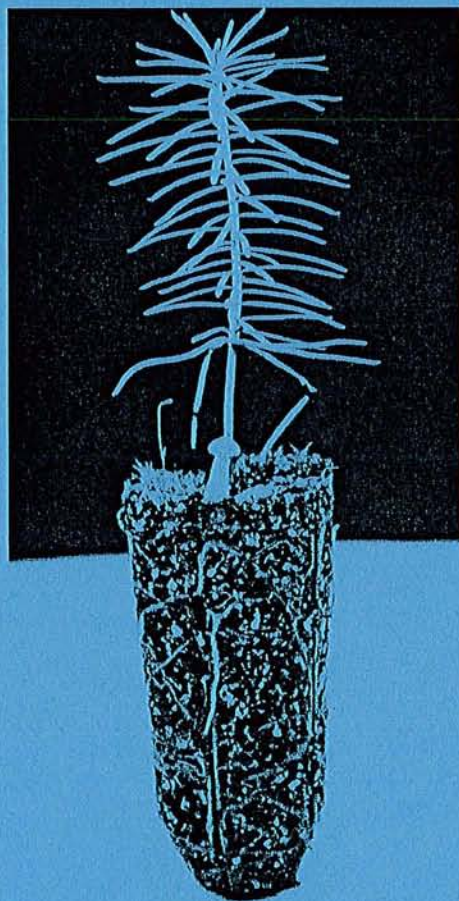
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	105
----------------------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	109
-----------------------------------	-----

Abbreviations

2D-PAGE	Electrophorèse bidimensionnelle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AIA	Acide Indole Acétique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
EST	Expressed Sequence Tag (Etiquette de gène exprimé)
Gène SR	Gène Régulé par la Symbiose
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilo paire de bases
kDa	Kilo Dalton
ORF	Open Reading Frame
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en chaine)
Protéine SR	Protéine régulée par la Symbiose
RT-PCR	Reverse tanscription-PCR
SOM	Self Organizing Maps
SRAP	Symbiosis Regulated Acidic Polypeptide
SSC	Sodium Sodium Citrate
SSH	Suppressive Subtractive hybridization

Introduction générale



A l'échelle de la planète, les forêts recouvrent environ 32% des terres émergées. Elles sont principalement localisées dans la zone intertropicale (environ 40%) mais les niches écologiques exploitées sont beaucoup plus vastes et les écosystèmes forestiers couvrent ainsi une partie des zones tempérées, boréales et montagneuses. Leur présence dans des milieux parfois défavorables s'explique par la capacité des arbres à établir des associations mutualistes avec d'autres organismes. Notamment au sein de la rhizosphère, de nombreux champignons (> 5000 espèces) sont capables d'établir des symbioses avec le système racinaire des arbres. Ces associations symbiotiques impliquant un végétal et un champignon se caractérisent par la mise en place d'organes mixtes différenciés : les ectomycorhizes (Smith & Read 1997).

Une telle association mutualiste permet aux deux partenaires d'en tirer des bénéfices essentiellement trophiques. Ainsi, la croissance de la plante sur des sols aux teneurs généralement limitées en éléments minéraux est favorisée. De même, le champignon assure sa croissance végétative dans le sol sous la forme d'un réseau dense d'hyphes mycéliens et la symbiose lui permet d'effectuer son cycle biologique (production de sporophores). Les symbioses entre plantes et champignons sont apparues au cours des temps géologiques sous différentes formes et impliquent différentes espèces. La symbiose ectomycorhizienne (LePage *et al.*, 1997) est rencontrée dans les écosystèmes forestiers des régions tempérées, boréales et montagneuses et concerne la plupart des arbres de ces écosystèmes (Fagacées, Salicacées, Pinacées,...) et certains champignons filamenteux du sol qui appartiennent aux ascomycètes et basidiomycètes. Cette symbiose se caractérise par une morphologie particulière développée sur le système racinaire des arbres lors de la mise en place d'un organe mixte et différencié : l'ectomycorhize. Au sein de cet organe, sont généralement distingués i) les hyphes extramatriciels qui s'étendent dans le sol environnant le système racinaire et ayant essentiellement un rôle de prospection et d'absorption, ii) les hyphes différenciés formant un manchon plus ou moins épais autour de l'organe racinaire et enfin iii) les hyphes ayant pénétré le cortex racinaire et mis en place avec les cellules racinaires une interface symbiotique appelée réseau de Hartig. C'est à ce niveau que sont généralement localisés les échanges les plus importants entre les deux partenaires de la symbiose : squelettes carbonés, eau, acides aminés et autres éléments minéraux. Les champignons améliorent ainsi la nutrition azotée et phosphatée du symbiote végétal mais aussi son statut hydrique (Hampp & Schaeffer 1999 ; Botton & Chalot 1999). D'autre part, l'arbre est une source majeure en squelettes carbonés pour le champignon, lui permettant ainsi d'assurer sa croissance végétative mais aussi d'assurer son cycle biologique en réalisant sa fructification et la dissémination de spores assurant ainsi la continuité de l'espèce. La maîtrise de la mycorhization en pépinière et en forêt permet d'améliorer la

croissance et la vigueur de plants forestiers (Grove & LeTacon, 1993), ainsi que la production de certains champignons comestibles (Danel & Camacho 1997 ; Guérin-Laguette *et al.*, 2000).

Les associations ectomycorhiziennes ont donc une importance autant écologique qu'économique, de par leur statut majeur au sein des écosystèmes forestiers. Dans le cadre d'une meilleure compréhension de leur écologie, de leur développement et de leur fonctionnement, l'étude de ces systèmes symbiotiques a intéressé de nombreux laboratoires. Ainsi, en quelques dizaines d'années, les connaissances concernant la physiologie et le fonctionnement des ectomycorhizes se sont considérablement accrues (Smith & Read 1997). Les mécanismes d'absorption, d'accumulation et de transports des différents métabolites échangés au sein de ces symbioses sont abordés par des équipes de plus en plus nombreuses (Chalot & Brun 1998 ; Nehls *et al.*, 1999). Au cours de la dernière décennie, à travers les avancées spectaculaires qu'a connu la biologie moléculaire, les efforts de recherche ont porté sur le contrôle génétique du développement et du fonctionnement de cette symbiose (Martin & Tagu 1999). Ce contrôle se place probablement à différentes étapes du processus développemental, dans les différents tissus, chez chacun des symbiotes et s'initie précocément lors des processus de reconnaissance entre les deux partenaires (Martin *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 1999). Il se poursuit lors des premiers contacts, puis plus tardivement lorsque les structures différenciées se mettent en place, alors qu'une réorganisation des schémas métaboliques chez la plante et chez le champignon est observée (Botton & Chalot, 1999 ; Hampp & Schaeffer 1999).

L'objectif du projet de recherche, dans lequel cette thèse s'inscrit, est la **compréhension des mécanismes moléculaires induisant, contrôlant et accompagnant l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne**. Il s'agit notamment de caractériser les **signaux**, les **protéines** et les **gènes** affectant et affectés par ces processus de différenciation. Au delà des informations pouvant être acquises dans le cadre de l'étude des ectomycorhizes, ce sont les relations entre la plante et son cortège de microorganismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui sont ainsi appréhendées.

Depuis 1986, le laboratoire de Microbiologie Forestière du Centre INRA de Nancy (Unité Mixte de Recherche INRA/UHP "Interactions Arbres/Micro-Organismes" depuis Janvier 2001) a développé différentes stratégies de recherche afin d'identifier et de caractériser les signaux échangés entre les deux partenaires (Béguiristain *et al.*, 1995 ; Béguiristain & Lapeyrie 1997 ; Ditengou & Lapeyrie 2000 ; Ditengou *et al.*, 2000 ; Lagrange *et al.*, 2001) et de caractériser les fonctions cellulaires (au travers de leurs gènes et protéines) activées ou réprimées lors de la symbiose ectomycorhizienne (Hilbert *et al.*, 1991 ; Burgess *et al.*, 1995 ; Tagu *et al.*, 1996 ; Martin *et al.*, 1997). Le modèle expérimental étudié — l'ectomycorhize *Eucalyptus* spp. - *Pisolithus tinctorius* — a été choisi car il est facilement manipulable *in vitro*, permet l'obtention de mycorhizes en quelques jours et en quantité suffisante pour des analyses biochimiques et moléculaires. Le genre *Eucalyptus* est très vaste (recouvre plus de 600 espèces) et est l'essence la plus plantée dans le monde. Cependant, son intérêt dans nos pays tempérés est limité au sud de

l'Europe. Le basidiomycète ectomycorhizien *Pisolithus* recouvre un complexe d'espèces associées à l'eucalyptus, aux pins et à d'autres essences forestières (Chambers & Cairney 1999). Sa distribution est mondiale et il est très utilisé dans l'hémisphère sud pour le reboisement.

Sur ce modèle expérimental, l'équipe a acquis un grand nombre de données notamment sur les signaux moléculaires échangés et sur les protéines et les gènes régulés par le processus symbiotique (Martin *et al.*, 1997 ; Martin & Tagu 1999). La comparaison de cartes polypeptidiques des partenaires libres et associés a permis notamment d'identifier des protéines réprimées (Hilbert & Martin 1988 ; Hilbert *et al.* 1991) ou stimulées (Hilbert *et al.*, 1991 ; Burgess *et al.*, 1995) lors de l'interaction. Parmi ces protéines se trouvent des polypeptides fongiques acides de 30-32 kDa régulés par la symbiose (SRAP32, pour Symbiosis Regulated Acidic Polypeptides), de fonction inconnue et très abondants dans les parois de *Pisolithus* (Laurent *et al.*, 1999). Des criblages différentiels de banques d'ADNc d'ectomycorhizes (Tagu *et al.*, 1993) ou des clonages d'ADNc en utilisant des sondes hétérologues ont permis d'identifier chez la racine d'eucalyptus des transcrits régulés par la symbiose : il s'agit de ceux codant l' α -tubuline (*EgTubA1*, protéine du cytosquelette) (Carnero Diaz *et al.*, 1996), une glutathion-S-transférase (*EgHypar*, régulée par l'hypaphorine) (Nehls *et al.*, 1998) et de l'isocitrate déshydrogénase (*EgIcdh*) (Boiffin *et al.*, 1998). De même, chez le partenaire fongique, plusieurs gènes stimulés par la symbiose et codant des protéines pariétales (les hydrophobines) (Tagu *et al.*, 1996), la glutamate déshydrogénase à NADP (Lorillou 1995) et des protéines du protéasome (Mourer 1998) ont été décrits.

Cette dizaine de gènes et de protéines sont autant de marqueurs du développement de l'ectomycorhize entre *Eucalyptus globulus* et *Pisolithus tinctorius*. Ils ne représentent cependant que quelques éléments dans le réseau très complexe d'interactions génétiques et épigénétiques accompagnant la mise en place des structures différenciées de l'ectomycorhize. Afin d'obtenir une vision plus étendue des fonctions cellulaires en activité dans la symbiose et de proposer une image générale et intégrée de son fonctionnement, la mise en place d'une approche globale d'identification des gènes exprimés au sein de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius* a été envisagée (Tagu *et al.*, 1993 ; Tagu & Martin 1995 ; Martin & Voiblet 1998). L'initiation d'un tel projet a pu voir le jour grâce au développement conséquent des techniques utilisées en génomique. Les différentes approches pouvant être retenues sont l'analyse complète des composantes protéiques des deux organismes dans la symbiose (le protéome), l'analyse de la partie transcrite du génome (le transcriptome) ou encore l'obtention de banques de mutants des deux partenaires altérés dans différentes fonctions cellulaires. L'utilisation de la mutagenèse reste encore à ce jour difficile sur ce système. Le *Pisolithus* est réfractaire jusqu'à présent aux différentes techniques de transformation génétique testées (électroporation, biolistique, transformation par *Agrobacterium tumefaciens* actuellement en cours d'étude...). Quant à l'eucalyptus, aucun protocole d'obtention en routine de plantes transgéniques n'est disponible. La stratégie la plus appropriée en 1995, au début de ce projet de génomique fonctionnelle, était

l'analyse du transcriptome des deux partenaires, l'eucalyptus et le pisolithe, d'une part, et de l'ectomycorhize les associant d'autre part.

Parmi les techniques disponibles, deux ont été développées au laboratoire, i) l'obtention de milliers d'ESTs (étiquettes de gènes exprimées) des tissus symbiotiques par séquençage systématique et ii) l'analyse des profils d'expression des gènes sur filtres d'ADNc. Ce travail a été initié par Catherine Voiblet (1999) et s'est poursuivi au cours de mon projet de thèse. Catherine Voiblet a obtenu un premier catalogue de plus de 600 ESTs parmi une banque de plusieurs millions d'ADNc d'ectomycorhize *E. globulus-Pisolithus* : ces ADNc ont été obtenus par clonage aléatoire ou criblage différentiel à un stade de développement correspondant à la formation du manteau fongique. Elle a également développé les techniques permettant l'analyse des profils d'expression de ces gènes chez les deux partenaires isolés et dans l'ectomycorhize. Les résultats obtenus ont notamment souligné une régulation forte des gènes fongiques codant des protéines de parois, comme les SRAPs ou les hydrophobines (Voiblet *et al.*, 2001). Il semble donc que la formation du manteau ectomycorhizien provoque une réorganisation importante des composants protéiques pariétaux (Martin *et al.*, 1999).

Afin de mieux comprendre les processus moléculaires qui régissent les interactions plantes-microorganismes, ce projet de génomique fonctionnelle se proposait de répondre à la question suivante : *quelle est l'amplitude des modifications du transcriptome de l'ectomycorhize ?*

L'objectif de ma thèse a été d'analyser les variations de l'expression génique de racines d'Eucalyptus et du mycélium de Pisolithus aux différentes étapes du développement symbiotique.

Pour cela, j'ai recherché et caractérisé ; en utilisant les techniques de la génomique fonctionnelle (ESTs, filtres d'ADNc, bioinformatique) :

- les fonctions cellulaires dont l'activité est modulée dans la symbiose,
- les vagues d'expression de différentes catégories de gènes (ou régulons) au cours des différentes phases du développement symbiotique,
- des gènes dont l'activité est importante pour le fonctionnement symbiotique lors des phases de colonisation et de formation du manteau (gène-SR *HydPt-3* et gènes codant des protéines des voies de transduction).

Mon projet de thèse s'articule donc autour de trois axes :

- (1). J'ai dans un premier temps complété l'index de gènes de l'ectomycorhize par séquençage d'ADNc obtenus par SSH, puis j'ai analysé l'ensemble des profils d'expression des gènes dans l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius*

au stade de formation du manteau fongique. Cette étude a été effectuée en collaboration avec C. Voiblet et N. Encelot ; elle a fait l'objet de la publication n° 2 (Voiblet *et al.*, 2001).

(2). Afin de comprendre la régulation de l'expression des gènes au cours de la formation de la mycorhize d'*Eucalyptus* - *Pisolithus*, j'ai analysé à l'aide des filtres à haute densité en ADNc, la régulation temporelle de 715 gènes de l'ectomycorhize, en comparant les niveaux des transcrits aux différents stades de différenciation de l'ectomycorhize (colonisation, formation du manteau, formation du réseau de Hartig, mise en place du métabolisme symbiotique). Afin d'affiner cette analyse, j'ai introduit au laboratoire les outils de statistiques bioinformatiques nécessaires à la mise en évidence des régulons (manuscrit en préparation, Chapitre 2).

(3). Au delà de l'analyse globale du transcriptome symbiotique, j'ai effectué une série d'études détaillées sur quelques gènes dont l'expression est cruciale pour la morphogenèse de l'ectomycorhize. Il s'agit d'un membre de la famille multigénique codant une hydrophobine (publication n° 3, Duplessis *et al.*, 2001b), et de plusieurs gènes impliqués dans les voies de transduction de signaux.

Ce manuscrit comporte :

- Une analyse bibliographique (Chapitre 1 ; Duplessis *et al.*, 2001a), qui se propose de faire le point sur nos connaissances actuelles dans le domaine du développement de l'ectomycorhize,

- La présentation des résultats (Chapitres 2, 3 et 4),

- Une discussion générale qui s'efforcera de replacer dans le contexte plus général des interactions plantes/micro-organismes nos résultats et enfin les conclusions et perspectives ouvertes par ce travail.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Living Together Underground: a Molecular Glimpse of the Ectomycorrhizal Symbiosis

Publication n° 1

Living Together Underground: a Molecular Glimpse of the Ectomycorrhizal Symbiosis

Sébastien Duplessis, Denis Tagu and Francis Martin*

Unité Mixte de Recherche INRA-UHP "Interactions Arbres/Micro-organismes", Centre de Recherches de Nancy, 54280 Champenoux, France

SUMMARY

Ectomycorrhiza is the result of a series of complex interactions leading to a finely tuned mutualistic symbiosis between a plant and a compatible soil fungus. Ultrastructural observations combined with cytochemical and biochemical studies revealed that morphological and metabolic changes in the symbiont cells lead to the final phenotype of the active ectomycorrhizal roots. What could be the molecular basis of such a progressive, highly organized ontogenic process? What is the role of rhizospheric chemicals in symbiosis development? How many genes control ectomycorrhiza development—as distinct from providing the housekeeping functions of the fungal and plant cells? After a brief overview of the evolution, biology and anatomy of ectomycorrhiza, these are some of the most important questions that will be discussed in the present chapter. Proteomics and genomics have demonstrated that symbiosis formation induces major changes in gene expression. The expression of about 17% of the genes analyzed arrays in the *Eucalyptus/Pisolithus* ectomycorrhiza by cDNA are regulated upon symbiosis development. Those symbiosis-regulated genes include several fungal multigene families encoding for cell wall and membrane proteins. In colonised roots, expression of genes coding for metabolic, stress and defence functions is enhanced. As a result, alterations in gene expression is associated with extensive changes in protein biosynthesis. These initial results presage a wealth of information that will be obtained from the application of genomics to various ectomycorrhizal associations.

Key words: cell wall proteins; ectomycorrhiza development; genomics; protein patterns; rhizospheric signals; symbiosis; symbiosis-regulated gene.

* For correspondence: Fax +33 383 39 40 69; e-mail: fmartin@nancy.inra.fr

I. INTRODUCTION

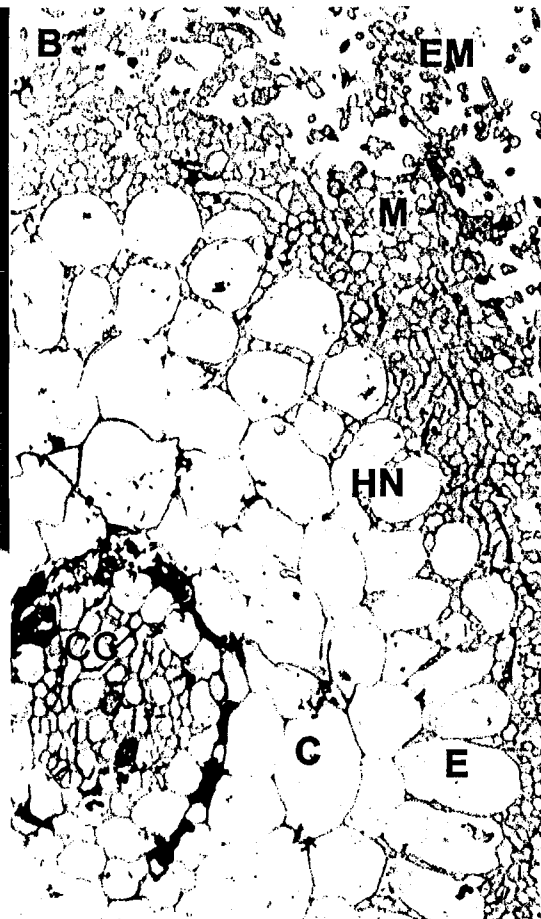
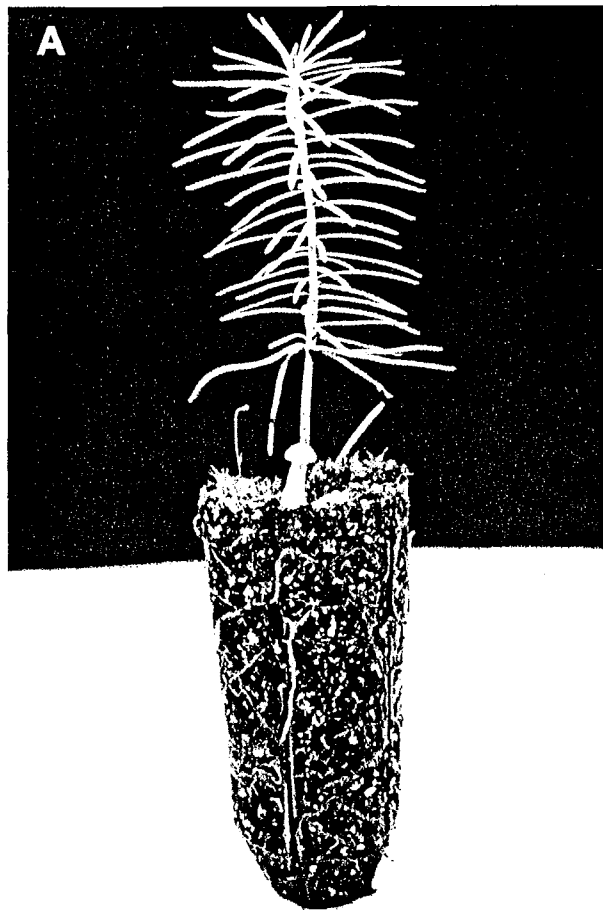
Within the rhizosphere which hosts a large and diverse community of prokaryotic and eukaryotic microbes that compete and interact with each other and with plant roots, mycorrhizal fungi are almost ubiquitous. The ectomycorrhizal hyphae and the root tips form a novel composite organ, so-called mycorrhiza, which is the site of nutrient and carbon transfer between the two symbionts. This association allows terrestrial plants to grow efficiently in suboptimal environments (1). Among the various types of mycorrhizal symbioses, the endomycorrhizal, ectomycorrhizal and ericoid associations are found on most annual and perennial plants (probably > 90%). About two-thirds of these plants are symbiotic with arbuscular mycorrhizal glomalean fungi (2). Ericoid mycorrhizas are ecologically important, but mainly restricted to heathlands (3). While a relatively small number of plants, ca 8000, form ectomycorrhiza, their global importance is amplified by their wide occupancy of terrestrial ecosystems. Trees of Betulaceae, Cistaceae, Dipterocarpaceae, Fagaceae, Pinaceae, Myrtaceae, Salicaceae and several tribes in Fabaceae are ectomycorrhizal plants (Fig. 1A), dominating boreal, temperate, mediterranean and some subtropical forest ecosystems (1). Within days after their emergence in the upper 10 cm of the soil profiles (e.g. organic humus and mor layer), most of the short roots of these ectomycorrhizal shrubs and trees are colonised by ectomycorrhizal fungi, and in most cases symbiotic colonization is close to 100% (4). The fungal mycelium and the root tips form a novel composite organ, so-called ectomycorrhiza, which is the site of nutrient and carbon transfer between the two symbionts (5, 6).

Ectomycorrhiza is structurally characterized by (i) the presence of an extensive extramatrical mycelial web prospecting the soil and gathering nutrients, (ii) a mantle of fungal hyphae ensheating the root and mainly acting as a storage compartment, and (iii) a network of hyphae growing in the apoplastic space of the rhizodermis (in angiosperms) and cortex (in conifers) root cells (Fig. 1B). The fungus gains access to sugars from the plant while plant nutrient and water uptake is mediated via the fungus (Fig. 2). In addition, the establishment of the symbiosis is requested for the completion of the fungal life cycle (i.e., formation of fruiting bodies) (Fig. 1A). The formation of the symbiosis requires several days and induces major morphological changes including a novel spatial tissue organization, changes in cell

shape, and the generation of different cell types (7, 8). Ectomycorrhiza formation therefore involves a series of complex and overlapping ontogenic processes in the mycobiont and the host plant: increased rhizogenesis, enhanced hyphae branching, aggregation of the proliferating hyphae, arrest of meristematic activity in roots surrounded by the fungal mantle, radial elongation of epidermal cells. These morphological changes are accompanied by the onset of novel protein patterns (9) and metabolic organizations (10, 11) in fungal and plant cells leading to the functioning symbiosis. What could be the molecular basis of such a progressive, highly organized ontogenic process? What is the role of cell-to-cell signaling in symbiosis development? How many genes control ectomycorrhiza development—as distinct from providing the housekeeping functions of the fungal and plant cells? After a brief overview of the evolution, biology and anatomy of ectomycorrhiza, these are some of the most important questions that will be tackled in the present chapter.

II. MYCORRHIZAS ARE ANCESTRAL SYMBIOTIC INTERACTIONS

The first mycorrhizal associations must have been derived from earlier types of plant-fungus interactions, such as the fungus *Geosiphon pyriforme* forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria) (12) and endophytic fungi found in the bryophyte-like precursors of vascular plants (13). Structures similar to arbuscular mycorrhiza have been observed in plant fossils from the Early Devonian (14), whereas fossil ectomycorrhiza have been found in the middle Eocene (15). Based on phylogenetic analysis of the rRNA gene, it has been suggested that ectomycorrhizal basidiomycetes evolved convergently from saprophytic ancestors (16). The switch between saprophytic and mycorrhizal lifestyles likely happened many times during evolution of fungal lineages as revealed by recent molecular phylogenetic analyses (17). This may have facilitated evolution of ectomycorrhizal lineages with a broad range of physiological and ecological functions reflecting partly the activities of their disparate saprotrophic ancestors. These symbioses have had major consequences for the diversification of both the mycobiont and their hosts (18). It remains to be determined whether the development of different lateral root structures (actinorrhiza, mycorrhiza, mycorrhizal nodules) are governed by the same set of genes (19). Current ectomycorrhizal fungal species (ca 6000) mainly belong to



homobasidiomycetes (agarics, bolets), although many species are found within the ascomycetes (truffles, terfez) and zygomycetes.

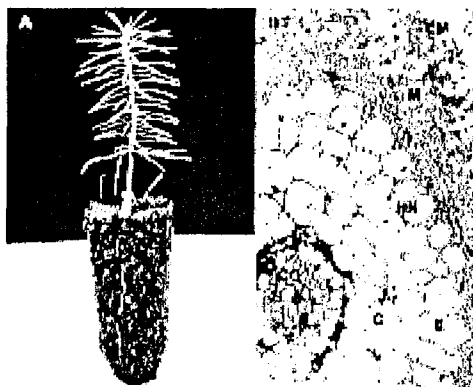


Fig. 1. The ectomycorrhizal symbiosis. A. A seedling of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) colonised by the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. The fungal mycelium has developed ectomycorrhizas on the root system and has produced a fruiting body above ground (Photograph courtesy of P. Frey-Klett). B. Transverse section of a *Eucalyptus/Pisolithus* ectomycorrhiza showing the extramatrical hyphae (EM), the mantle (M); the fungal hyphae have begun to penetrate between the epidermal cells (E) of the root cortex (C) to form the Hartig net (HN). Epidermal cells (E) are radially enlarged. CC, central cylinder (Photograph courtesy of B. Dell).

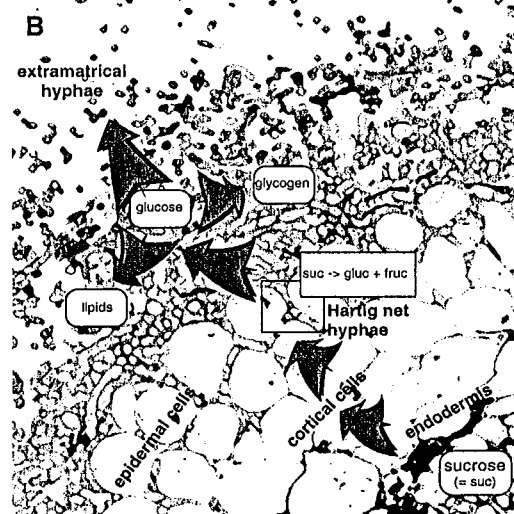
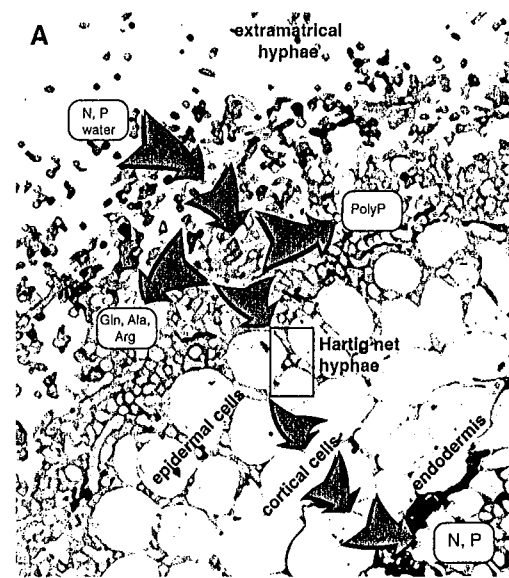
III. A BENEFICIAL SYMBIOSIS

Ectomycorrhizal communities are taxonomically diverse (20, 21) and are likely able to maintain a large degree of functional diversity (22). Although a few tree/fungus combinations are unique, a great many different fungi can combine with a great many different trees. A single host tree could simultaneously interact with dozens of fungal species (4) and this high symbiont diversity likely allows ectomycorrhizal associations to use most N and P forms present in forest soils (23). The symbiosis between trees and soilborne ectomycorrhizal fungi results in an intimate relationship between the plant and its symbiotic partner (Fig. 1B). It provides several benefits to both the host plant and its fungal associate(s). The prospecting and absorbing extraradical hyphal web (1000 m of hyphae/m of root) captures soil minerals (phosphate, nitrogen, water, micronutrients) (1) and organic nitrogen (24, 25), assimilates and translocates a large proportion of them to the growing plant (1, 24) (Fig. 2A). Ectomycorrhizal fungi affect not only mineral and water uptake, but also adaptation to adverse soil chemical conditions (5) and susceptibility to diseases (1) and contribute substantially to plant productivity (6). On the

other hand, the fungus within the root is protected from competition with other soil microbes and, therefore, is a preferential user of the plant carbon (ca 20% of the host photoassimilates) (Fig. 2B). Mycorrhizal fungi represent an interface in the soil-plant system and have the ability to regulate plant metabolism. In addition, they constitute links in the chain of transfers by which carbon and nitrogen move between plant and soil compartments (26, 27) and can thus influence carbon and nitrogen cycling rates in host plants and forest ecosystems (23, 28, 29).

IV. ECTOMYCORRHIZA ONTOGENESIS: THE DANCE IS THE SAME, THE COUPLES ARE DIFFERENT

Morphological and anatomical changes that accompany ectomycorrhiza development have been studied and described in great detail in various associations [e.g. *Picea abies/Amanita muscaria* (7, 30); *P. abies/Hebeloma crustuliniforme* (31); *Eucalyptus/Pisolithus* (8, 32-34); *Alnus rubra/Alpova diplophloeus* (35); and *Betula pendula/Paxillus involutus* (36)]. The mature organization of ectomycorrhiza varies with the host and fungal species (37). In addition, a survey of almost any natural fungal population will reveal a considerable range in phenotypes (38). However, although some of the details vary, early stages of ectomycorrhiza development have well-characterized similar morphological transitions. In an effort to provide a useful framework in which to categorise existing data on gene expression and accomodate future efforts to categorize existing natural fungal variants and future experimental mutants, we have subdivided ectomycorrhiza formation in discrete stages from the preinfection (rhizospheric) phase to the morphogenesis *per se* (Fig. 3) (39). Spore germination and saprophytic growth of the hyphae is initiated in the rhizosphere (Fig. 4A). In most natural situations, hyphae are however invading a newly emerging root from previously established ectomycorrhiza. Extensive preinfection branching of hyphae requires the presence of host plant roots (Fig. 4C). After contact, hyphal growth on the root surface initiates swelling of the hyphal tips (pads) and formation of dense finger-like structures (Fig. 4D). Hyphae aggregate initially to form wefts and then ensheath the lateral roots (Fig. 4E). After root penetration, intraradical hyphae proliferate and form a coenocytic structure in the root apoplastic space (i.e., the Hartig net) (Fig. 4F). This intraradical fungal web is active in nutrient transfer and an active traffic of carbohydrates promotes extensive



growth of external hyphal web that gathers nutrient in soil. These morphological changes are concomitant with accelerated nuclear division, cytoskeletal rearrangements and synthesis of differentiation-related genes and proteins (see below). Growth and differentiation of the plant root and fungal hyphae must be tightly coordinated. This multistep development therefore implies the existence of a developmental strategy for building up an ectomycorrhiza that early on imposes a basic scheme, on top of which subsequent species-specific customizations occur. Behind every aspect of ectomycorrhiza development there must likewise be genetic control from the earliest proliferation of hyphae to the build up of the complicated symbiotic structure.

Since fungal mutants affected in their ability to form ectomycorrhiza are not yet available, one approach to identify the genetic processes that trigger and regulate ectomycorrhiza development is to look for natural variation in symbiosis structure. It has been shown that natural populations of sib-monokaryotic and dikaryotic strains of *Laccaria bicolor* (40), *H. cylindrosporum* (41) and *Pisolithus* (42) vary greatly in their ability to form mycorrhizas. Some *L. bicolor* variants undergo morphological changes that signal the onset of mycorrhiza formation but fail to complete the development process and do not move on to the next stage (43). They have been classified into different basic categories: intraradical hyphal network not formed, hyphal network formed but do not develop further, Hartig net development normal but failure of mantle to form. This suggests that the morphogenetic programmes for the differentiation of the mantle and the Hartig net are partly independent and they likely involve different set of genes. This has been recently confirmed by the differential effect of auxin transport inhibitors on the formation of the mantle and the Hartig net (44). Variation in mycorrhizal structures appears to be genetically determined, which should make it possible to identify the loci that contribute to this variation.

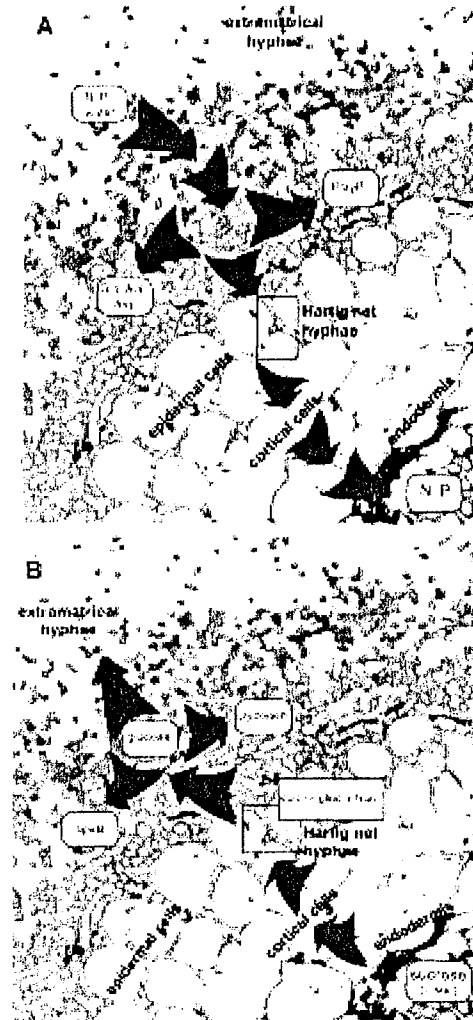


Fig. 2. Ectomycorrhiza: a mutualistic symbiosis. (A) Extramatrical hyphae prospect the soil, gather nutrients (N, P, H₂O) and translocate them to the mantle. Mineral and organic N are assimilated and the synthesized amino acids (Gln, Ala, and Arg), together with inorganic P polymers (PolyP, polyphosphates) are accumulated. Amino acids and Pi are then transferred through the intraradical hyphal net (the Hartig net) to the root cells and the other host tissues. (B), On the other hand, sucrose (suc) downloaded to the root cells is degraded by apoplastic invertases in glucose (gluc) and fructose (fruc). Glucose is then translocated to the fungal compartment through the Hartig net hyphae. The carbohydrate is then stored in the mantle as glycogen and lipids, or transported to the extramatrical hyphae.

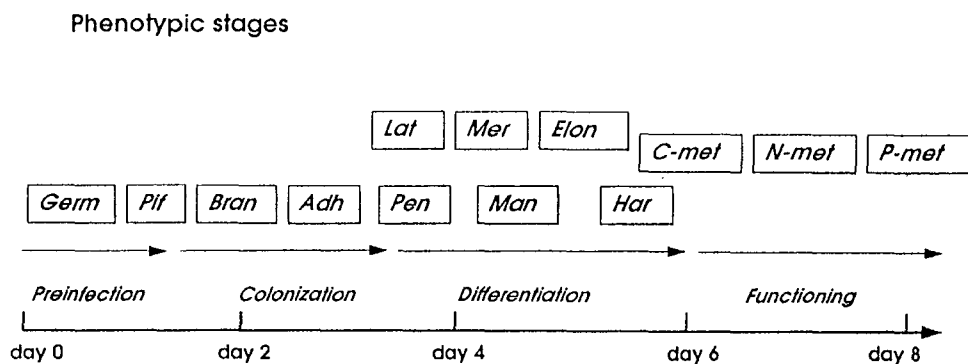


Fig. 3. Main phenotypic stages of ectomycorrhiza development. Abbreviations: *Germ*, Spore germination; *Pif*, Preinfection growth of hyphae; *Bran*, Hyphae branching on to root surface; *Adh*, Attachment of hyphae on root surface and formation of the adhesion pads; *Pen*, Penetration between epidermal cells; *Man*, Hyphae aggregation to form mantle; *Har*, Differentiation of the Hartig net; *Lat*, Increased formation of lateral roots; *Mer*, Changes in meristematic activity; *Elon*, Radial elongation of epidermal cells; *C-met*, *N-met*, and *P-met*, Changes in carbon, nitrogen, and phosphate metabolisms, including transfer between symbionts.

V. SIGNALLING CHEMICALS IN THE RHIZOSPHERE AND IN SYMBIOTIC TISSUES

In almost all plant-microbe interactions exchange of signals between the partners is the earliest step in a series of interaction events, leading to contact at the host surface and subsequent development of the microbial structures in the host-plant tissues (45) (Fig. 3). Signalling processes must exist to bring the mycobiont into the vicinity of susceptible host roots. This mechanism has been poorly investigated in ectomycorrhizal symbioses and a limited set of chemical signals produced by either the host or symbiont have been identified so far (46-49). Only the broad outlines of the signalling processes have been defined, but the little that is known suggests that some intriguing similarities exist between ectomycorrhizal associations and other plant-microbe symbioses (45, 50, 51).

No specific chemicals able to attract ectomycorrhizal fungi toward the root surface have been identified yet, although their occurrence has been suggested (52). However, there is evidence that host root exudates contain more than one kind of metabolites that can stimulate hyphal growth and/or morphological features of the colonising ectomycorrhizal hyphae and several factors likely help the partners match each other. Host plants secrete continuously a spectrum of chemicals able to attract rhizospheric microbes. Within these

compounds, C20 diterpene abietic acid is able to stimulate spore germination of ectomycorrhizal bolets, such as *Suillus* species (46). Among the secreted compounds are phenolic substances, especially flavonoids. The ectomycorrhizal *Pisolithus* spp. respond to traces of eucalypt flavonoids [e.g. the flavonol rutin (quercetin-3-rutinoside) (49)] by enhanced growth (Fig. 4A). Conjugates of flavonoids, such as rutin, are more soluble in water than their aglycones; thus, they diffuse readily and can be hydrolyzed to more-active metabolites (53). The presence of such compounds probably increases the possibility of the interaction. Interestingly, increased branching of the endomycorrhizal *Gigaspora rosea* in the presence of root exudates is enhanced by the rutin aglycone, quercetin (54). Cytokinin, such as zeatin, presents in the rhizosphere can alter hyphal branching of *Pisolithus* and mimicks some of the earliest step of the ectomycorrhizal interaction (Fig. 4A) (49). The branching is more numerous and compact in the presence of the phytohormone and this bushy type of hyphal branching pattern likely increases the chance for the hyphae to enter in contact with the root surface. In addition to altering fungal morphology, zeatin interacts with the metabolism of alkaloid in the hyphae. The presence of zeatin results in the increased accumulation and secretion of hypaphorine, a tryptophan betaine (55) able to trigger morphological changes in eucalyptus roots (e.g., arrest of root hair growth) (47, 48).

Although the colonization of emerging root tips by ectomycorrhizal hyphae is often initiated from older mycorrhizal parts of the root system, ectomycorrhizal fungi may be widely dispersed in the different soil horizons. It is tempting to speculate that extensive gradients of mixed chemicals in the soil provide the mechanisms by which the mycobionts are initially recruited to the root from the general rhizosphere populations of fungi. Then, after the hyphae accumulate in the mucigel that is adjacent to the root surface, the symbiosis can further proceed through the hyphae attachment and colonization (Fig. 4B). It is not known how these rhizospheric chemicals may play a role in setting up the ectomycorrhizal associations. In addition to attracting and stimulating ectomycorrhizal mycelium (and other symbiotic microbes) these plant metabolites, such as flavonoids, have numerous other activities (e.g. antimicrobial activities, modification of plant growth) (56) confirming a lack of specificity. The presence of multiple non-specific signals is ecologically consistent with the lack of specificity of the ectomycorrhizal symbiosis. It is highly improbable that the wide range of ectomycorrhizal trees species secrete a single universal signalling chemical to which all ectomycorrhizal fungi respond. Individual fungal species may sense one or a set of specific signal(s) within a complex cocktail of plant chemicals and would respond according to what is secreted by any given host plant. The composition and concentration of the signalling compounds mixture that is secreted in the host tree rhizosphere is probably crucial. Further investigation is currently underway to identify additional root chemicals involved in the alteration of hyphal morphology to fully understand signalling and recognition processes in ectomycorrhizas.

On the other hand, ectomycorrhizal fungi have the potential to morphologically alter the host root through refined intervention in the developmental programme of the host plant. Hyphae enter the root preferentially at the elongation or differentiation zone and then migrate intercellularly toward the exodermis (in most Angiosperms) (Fig. 1B) and to the endodermis in conifers. Intraradical proliferation of the Hartig net hyphae implies host cell wall openings away from the hyphal tips (57). Cell wall loosening and breakdown are likely involved in this apoplastic progression of the syncytial mycobiont. Multiple evidences have been provided that auxins, such as indole-3-acetic acid (IAA), play a role in this process and in additional early stage processes of ectomycorrhiza development (50, 58, 59). The hypothesis that

ectomycorrhizal fungi disturb root tissues by secreting IAA (and, in its wake, ethylene) is relatively old (60, 61). IAA-released by ectomycorrhizal fungi elicits similar root responses as those induced by ectomycorrhiza formation including an enhanced rhizogenesis and dichotomous branching of pine roots (62, 63). It has been suggested that the intraspecific variations in symbiotic structures of *L. bicolor*-*Pinus banksiana* mycorrhizas are related to the differences in IAA-synthesizing activity among the various fungal isolates (43). Tryptophan released in root exudates could be sufficient to trigger the increased biosynthesis of IAA or a homologue of this phytohormone in ectomycorrhizal fungi (64). Pine inoculated with mutant of *H. cylindrosporum* strains overproducing IAA produced an increased number of ectomycorrhizal roots (65) which presented a strikingly altered morphology (i.e. hyphae proliferation leading to a multiserial Hartig net) (57). It has been suggested that this Hartig net hypertrophy was the result of an increased cell wall loosening resulting from local increase in IAA concentration (57). The presence of increased concentration of IAA as a result of fungal colonization of root tissues has not yet been experimentally demonstrated.

The local increase in the auxin concentration could also be realized by stimulating the influx or inhibiting the efflux of auxins in the colonised root zone (66). To investigate the role of polar auxin transport in ectomycorrhiza development, Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings were exposed to the phytochrome triiodobenzoic acid (TIBA) (44, Rincon & Le Tacon, unpublished results). Subsequently roots were inoculated with the ectomycorrhizal basidiomycete *L. bicolor*. In lateral roots treated with TIBA, cross-sections revealed that TIBA inhibited the formation of the fungal mantle (44). Alternatively, the auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl)phthalamic acid (NPA) induced similar alteration of the mycorrhiza development (67). The failure of *L. bicolor* to aggregate to form the mantle in the phytochrome-treated seedlings points at a prominent role of polar auxin transport in early stages of mycorrhiza development. TIBA and NPA are known to block the basipetal transport of IAA in the outer cortex and epidermis through the inactivation of the auxin efflux carrier PIN (pin-formed) complexes (66). The pleiotropic effects of auxin-secreted by ectomycorrhizal fungi, the negative impact of phytochromes on the formation of symbiosis tissues and the data obtained with *Hebeloma* mutants overproducing IAA are strong indications for a crucial role of auxin (and ethylene) in ectomycorrhiza morphogenesis. The most parsimonious explanation of this set of

data obtained through different approaches is that hyphae proliferation to form the mantle and the growth of hyphae through plant walls is accompanied by a fungus-induced, local increase of the auxin concentration. This enhanced auxin concentration appears to be reached both through hyphae secretion and alteration of plant-synthesized auxin transport. A local accumulation of auxin during the early stages of ectomycorrhiza development is consistent with the expression of the auxin down-regulated transcripts *adr-6* and upregulation of the auxin-induced glutathion-*S*-transferase, *EgHypar*, in ectomycorrhizal tissues (68, 69). Whether tryptophan or/and other components of the plant exudates induces an IAA amplification loop in the rhizospheric mycelium, the IAA synthesis must be tightly controlled or compensated by other factors since above a certain level, exogenously supplied IAA inhibits root development. The latter may explain the observed arrest of root meristematic activity in mature mycorrhiza (33).

The fungal alkaloid, hypaphorine, a betaine of tryptophan, is the major indolic compound isolated from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* (55). It is produced in larger amount by this fungus during mycorrhiza development (47) and upon triggering by root exudates and zeatin (47, Lagrange and Lapeyrie, unpublished results). Hypaphorine acts as an IAA antagonist (48) and it affects root hairs of *Eucalyptus* seedlings by reducing their elongation rate (Fig. 4A), while it has no activity on root elongation and development (70). This indolic alkaloid induces drastic changes in the tubulin and actin cytoskeletons. For example, actin microfilament, which extend as long cables in untreated eucalypt root hairs, are markedly induced to form thicker bundles (Ditengou et al., unpublished results) following the application of hypaphorine.

It thus seems as if auxins, its derivatives and antagonists were master keys in ectomycorrhiza development. Although the above summarizes the scarce current knowledge on signalling processes in plant-ectomycorrhizal fungi associations, it does not explain why a particular tree establishes a symbiosis with a certain type of mycobiont, or why most host plants can interact with hundreds of ectomycorrhizal fungi. Most probably the solutions to these puzzles lie in the nature of signals and receptors themselves. Plants and fungi excrete a wide range of more- or less-attractive compounds (e.g., flavanoids, alkaloids). Both partners possess one to many types of signal receptors/sensors that may bind with several (or a number of) rhizospheric excreted signals. In turn, signals/sensors complexes activate/repress expression of

downstream genes including components of the signalling pathways, such as the ras GTPase and serine/threonine kinases (Duplessis & Martin, unpublished results). Once the fungal hyphae are within the root, other trophic and developmental inputs, from both symbionts, are likely necessary for successful symbiosis. In entering its novel niche, the colonizing hyphae need to adjust to its new environment. One essential modification is the alteration of the cell surface leading to the insulation of the mycobiont and/or changes in the permeability of the cell surface allowing the symbiotic traffic.

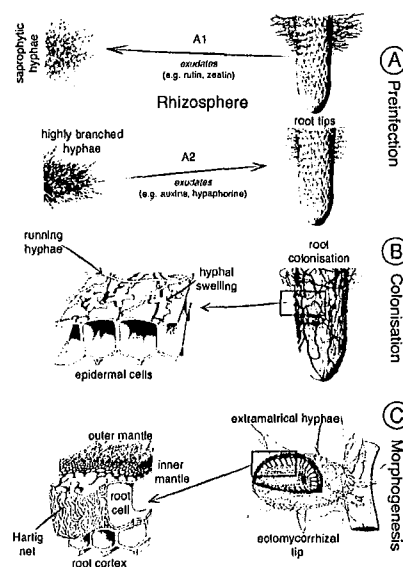


Fig. 4. The different interactions between the host root and the ectomycorrhizal fungus and the main morphogenetic stages observed during ectomycorrhiza development. **A.** The preinfection stage: **A1.** Host root releases chemicals (e.g., flavonoids, cytokinines) in the rhizosphere able to alter the morphology of the compatible ectomycorrhizal fungus (e.g., enhanced hyphal branching). **A2.** Conversely, the hyphae releases various compounds (auxins, alkaloids) eliciting changes in the root morphology (e.g., increased rhizogenesis, decay of root hairs). **B.** The colonization stage: running hyphae attach to the root surface and then, experienced drastic morphological changes, such as tip swelling, leading to a finger-like structure on the root epidermal cell. Hyphae initiate their aggregation between host cells to form hyphal webs. **C.** Morphogenesis *per se*: Massive and rapid aggregation of hyphae around the root lead to the formation of a pseudoparenchyma, the mantle; penetration between epidermal cells and cortical cells; and formation of the Hartig net with concomitant coordinated alteration in the root structure.

VI. CHANGING THE NATURE OF THE FUNGAL AND PLANT SURFACE

After chemotropism and exchange of rhizospheric signals, the earliest stages of ectomycorrhiza formation is characterized by the colonization of the root cap. At this stage, the hyphae is likely at a saprophytic stage (32-34). The symbiotic fungal infection is initiated in a discrete zone behind the growing root apex and in advance of the region where the primary cortex begins to deteriorate as the root matures (32, 33). The colonising hyphae secrete various types of extracellular material, much of which is composed of chitosans, β -1,3-glucans, and proteins (71-74). Although the precise mechanisms that govern this range of cell-cell interactions have not been fully defined, a number of specific cell surface molecules have been identified as critical elements in the interaction. The colonization of host surfaces by micro-organisms often requires specific polymer interactions between microbial ligands (so-called adhesins) and host receptors (75). Adhesins are often found on a dense network of radially projecting fibrils, so-called fimbriae, which are bridging the partners. In ectomycorrhiza, fungal attachment to the epidermal cells involves a polysaccharide mucigel and the secretion of oriented fibrillar materials, containing polysaccharides and glycoproteins, in which the whole of the sheath eventually becomes embedded (76). Cytological observations showed that these orientated fimbriae, containing ConA-recognized glycoproteins, are likely involved in the adhesion of the hyphae on the root surface (77). A layer of extracellular fibrillar polymers is present in the extracellular matrix of the free-living mycelium of *L. bicolor* (77) and *Pisolithus* (76, 78) even before the interaction with the root. However, at the contact sites between hyphae and root surface an increased secretion of these extracellular fibrillar polymers takes place in compatible ectomycorrhizal associations. Reorganization of the extracellular fibrillar polymers occurs, observed on microscopic sections as an accumulation and orientation of the extracellular polymeric fimbriae towards the host cell. In contrast, isolates of *P. tinctorius* with delayed symbiosis development do not secrete this fibrillar material (76, 78). This fibrillar material can bring about better contact or adhesion and lead to a better colonization.

A lectin purified from *Lactarius deterrimus* fruiting bodies preferentially bound to root hairs and tips of lateral roots of *Picea abies* (79) suggesting that lectin-polysaccharide

recognition play a role in the fungal adhesion. However, Lapeyrie and Mendgen (80) showed a low binding of fluorescein isothiocyanate-labelled lectins to the surface of free-living mycelium of *Pisolithus*. In addition, no change in fluorescein isothiocyanate-lectin binding during the interaction of *Pisolithus* with *Eucalyptus* roots was observed indicating that lectins play a minor, if any, role in this symbiosis.

Major changes in cell wall structure during the colonization process have not been observed in ectomycorrhizal associations (74). However, several of the symbiont responses to ectomycorrhiza development appear to be correlated with alterations in gene expression of cell wall proteins (81). Both preferential synthesis and down-regulation of polypeptide biosynthesis have been observed. Within these symbiosis regulated (SR)-proteins, two families have been characterized in detail: the hydrophobins and the 32-kD symbiosis-regulated acidic polypeptides (SRAP32).

VIA. HYDROPHOBINS: PROTEINS THAT FUNCTION AT THE SYMBIOTIC INTERFACE?

Twenty-two (ca. 3%) of the expressed sequence tags (EST) of *Eucalyptus/Pisolithus* ectomycorrhiza characterized by subtractive suppression hybridization (SSH) and cDNA array analyses shared a significant similarity with the cysteine-rich hydrophobins (69). Hydrophobins are small, secreted, moderately hydrophobic proteins with a conserved spacing of eight cysteine residues (82-84). They are either excreted in the medium or are trapped in the cell wall. In the latter case, hydrophobin assemblages confer an increased hydrophobicity to the hyphal surface which allows the adhesion to host surfaces or between hyphae (85). Hydrophobins have escaped detection until recently because they are tightly bound to cell wall polymers and could only be released by using concentrated formic acid or trifluoroacetic acid (86, 87). Hydrophobins have been widely found in various species of ascomycetes and basidiomycetes species (83). They have been involved in emergence of aerial hyphae (82, 85), fruiting body and conidia formation, dessication tolerance, pathogenesis and symbiosis (83, 84). It is clear that hydrophobins display a wide range of functions in different fungal species and within a single species. They have been recruited by several biotrophic fungi for surface interactions associated with the infection of their plant or animal host and they may play such a role in ectomycorrhiza (88). The expression of the transcripts *hydPt-1* and *hydPt-2*, coding for *Pisolithus* hydrophobins, is strongly upregulated during the symbiosis

formation (89). Additional hydrophobin genes, *hydPt-3* to *hydPt-8*, which shows 47 to 52 % homology with other *Pisolithus* hydrophobins (69) have been identified in *Eucalyptus/Pisolithus* mycorrhiza. The expression of their transcripts is increased 6 to 8-fold in the symbiotic tissues. Nonwetable and water-repellent mycorrhizas of *Eucalyptus* are often found in air pockets in soil (90). The most likely explanation for this lies in the observed deposition of hydrophobins in fungal cell walls (87). However, *Pisolithus* hyphae simultaneously express several types of hydrophobins in its wall during the formation of the symbiosis. Whether these different hydrophobins are involved in the adhesion of hyphae on the root surface, the mechanical penetration of hyphae between root cells, or the aggregation of hyphae to form the mantle (81, 88) remain to be determined by selective gene inactivation.

VI.B. SYMBIOSIS-REGULATED POLYPEPTIDES WITH ADHESIN-TYPE MOTIF

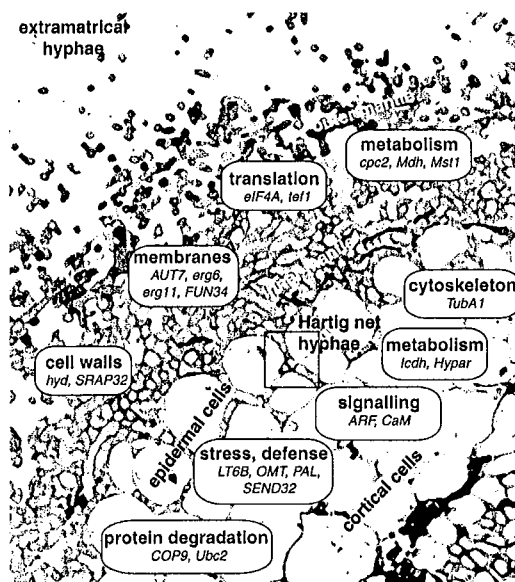
Many SRAPs, observed in soluble protein extracts of *Eucalyptus/Pisolithus* ectomycorrhizas (9, 91), are also abundantly accumulated in *Pisolithus* cell walls. A family of cell wall acidic polypeptides (so-called SRAP₃₂) composed of at least six isoforms with different charge and/or molecular mass has been isolated (92). These polypeptides are encoded by a multigene family and a dozen of slightly different sequences have been identified (Sorin, Voiblet & Tagu, unpublished results). The SRAP₃₂ proteins showed no significant homology with known proteins, but the central part of the deduced protein contains an Arg-Gly-Asp (RGD) motif. The RGD motif was first discovered in fibronectin as a cell attachment site (93) and was subsequently found to be the recognition sequence for a number of integrin receptors (94). The presence of the RGD motif suggests that SRAP₃₂ are coding for adhesion proteins (92). Comparing the upregulation of SRAP₃₂ transcript levels and the increased concentration of SRAP₃₂ polypeptides in ectomycorrhiza (9, 91, 92) showed that there was a good correlation between changes in protein synthesis and transcript levels (69, 92). Immunogold labelling confirmed that SRAP₃₂ and immunocross-reacting SRAP₃₁ are localised in cell walls of the free-living and symbiotic hyphae. These proteins could be found mainly associated to the flocculent material covering the hyphal surface, but they are never observed in the thin, delicate filaments

or fimbriae bridging hyphae or the fungal cells to the surface of the root.

Cell wall proteins are known to form cross-linked networks with other proteins and polysaccharides in fungal walls (75), but the structural properties and the functional significance of such networks are not yet known. It is tempting to speculate that high levels of SRAP₃₂, degradation of mannoproteins (72), and increased levels of hydrophobins (89) take place simultaneously to modify the molecular architecture of protein networks in a manner that allows new developmental fates for both fungal cell adhesion and root colonization by the fungus (75, 81). Further investigation of the structure and regulation of SR wall proteins will provide a more complete picture of their role in developing ectomycorrhizal tissues.

VII. ESTs AND cDNA ARRAYS FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS

It is increasingly clear that developmental pathways leading to the ectomycorrhizal symbiosis can be considered as modular (Fig. 2), and that developmental transitions are accompanied by global changes in the expression of specific complements of genes under the control of rhizospheric and intracellular signals (see above) (39, 50). To date, it is not possible to predict the number of symbiosis-specific fungal and plant genes. However, owing to the fact that ectomycorrhizas are widespread, a significant number of mycorrhiza-specific genes must exist. A goal of primary importance is to achieve a comprehensive description of the mechanisms induced in both symbionts at each stage of the symbiosis development. This molecular sketching of the ectomycorrhiza development should be carried out simultaneously on different associations to identify common 'molecular signatures' typical of this symbiosis. Over the last decade, changes in gene expression have mainly been studied by using two-dimensional gel electrophoresis. Up- and down-regulated proteins have been found in *Pisolithus/Eucalyptus* (9, 91), *Amanita muscaria/Picea abies* (95), *Paxillus involutus/Betula pendula* (96) and *Suillus bovinus/Pinus sylvestris* (97) associations. These investigations confirmed that ectomycorrhizal development leads to an alteration of gene expression in both symbionts and to the synthesis of ectomycorrhiza-specific proteins (ectomycorrhizins) (9, 91). However, this approach was limited because only a restricted set of proteins can be visualized on 2D gels. While such studies have been fruitful



in the past, their potential use in developing a complete and accurate understanding of the symbiotic factors during the course of the mycorrhiza development is limited. Although modulation of the symbiont interactions clearly implies post-translational modifications, regulation of transport mechanisms, and protein degradation, key mechanisms in fungal gene regulation take place at the transcriptional level. Consequently, detection of even subtle gene expression modulations will provide a comprehensive framework for studying events which affect cellular differentiation and metabolism, and regulation on a genomic scale. The fact that ectomycorrhizal fungi are not yet amenable to gene inactivation has prevented the application of forward genetics to decipher ectomycorrhiza development. Therefore, alternative molecular techniques for the identification of SR-genes have been developed. Subtractive cDNA hybridization and differential mRNA display were used to identify plant and fungal genes that are induced upon symbiosis development in ectomycorrhizal associations involving *Pisolithus/Eucalyptus* (68, 69), *L. bicolor/Pinus resinosa* (98, 99), and *A. muscaria/P. abies* (100). These investigations confirmed that ectomycorrhiza development is accompanied by striking changes in gene expression at the transcriptional level and allowed the identification of a dozen of SR-genes (Fig. 5). For example, hexose transporters of the symbionts in the *A. muscaria/P. abies* (101) and *P. involutus/B. pendula* (102) symbioses are regulated. The fungal gene coding for an hexose transporter, *AmMst1*, was upregulated (101, 104), whereas the *Picea* hexose transporter was slightly down-regulated (104). Similarly, the expression of *B. pendula* hexose- and sucrose-transporters, BpSUC1, BpHEX1 and BpHEX2, had been down-regulated in mycorrhizal roots (102). As stressed by the authors, the down-regulation of expression of these transporters is not compatible with the increased carbon fluxes taking place in the roots as a result of the carbon drain imposed by the mycobiont. Other transporters are likely involved in the symbiotic traffic. *A. muscaria* phenylalanine ammonium lyase gene, *AmPAL*, is likely regulated in ectomycorrhiza through changes in nitrogen and sugar levels (103). Whether gene expression of these metabolic genes is controlled by sugar-dependent regulation or by symbiosis-related developmental signals is not known. Nehls et al. (104) have suggested that the expression of hexose-transporter gene, *AmMst1*, is only regulated by the hexose concentration of the symbiotic apoplastic space of *Amanita/Populus* mycorrhiza. These findings illustrated the drastic molecular changes experienced by the

partners during the mycorrhiza development and functioning (105-107).

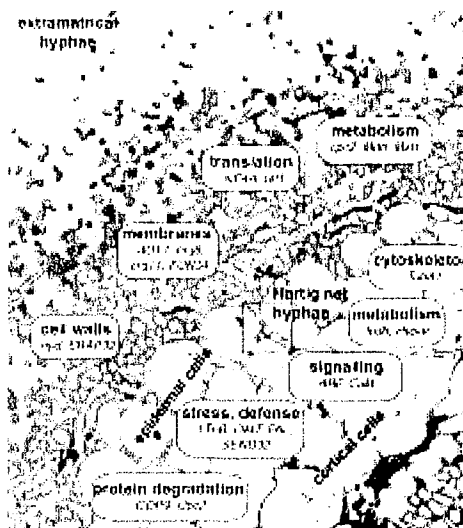


Fig. 5. Regulation of gene expression in the ectomycorrhizal symbiosis. This figure compiles the known upregulated genes in various types of ectomycorrhizas [*Pisolithus/E. globulus* (68, 69, 87, 89, 92, 119, 120); *Paxillus involutus/Betula pendula* (121); *L. bicolor/Pinus resinosa* (98, 99); and *A. muscaria/P. abies* (100)]. *ARF*, ADP-ribosylation factor; *AUT7*, vesicular transport and autophagocytosis; *CaM*, calmodulin; *COP9*, constitutive photomorphogenic subunit (related to proteasome); *cpc2*, cross-pathway control WD-repeat protein; *elf4A*, elongation initiation factor 4A (dead-box helicase); *erg6*, δ -(24)-sterol c-methyltransferase; *erg11*, sterol-14-alpha-demethylase; *FUN34*, transmembrane protein; *hyd*, hydrophobins; *Hypar*, hypaphorine- and auxin-regulated glutathion-S-transferase; *Icdh*, NADP-isocitrate dehydrogenase; *LT6B*, Salt-stress induced LTI6B protein; *Mdh*, mitochondrial malate dehydrogenase; *Mst1*, monosaccharide transporter; *OMT*, O-methyltransferase; *PAL*, phenylammonia lyase; *SEND32*, Senescence down-regulated protein; *tefl*, Translation elongation factor 1 α ; *TubA1*, α -tubulin; *Ubc2*, Ubiquitin-conjugating enzyme E2.

To identify cellular functions expressed in the symbiosis on a wider scale, EST programmes have been developed on several ectomycorrhizal fungi (*A. muscaria*, *H. cylindrosporum*, *P. tinctorius*, *Tuber borchii*) (69, 108, 109 ; P Bonfante, U Nehls, H Sentenac, pers. comm.) and ectomycorrhizal associations (*Eucalyptus/Pisolithus*, 69; *B. pendula/P. involutus*, A Tunlid & B Söderström, pers. comm.). As the number of ESTs increases, comparisons across genera, species, ecotypes, and strains of symbiotic fungi will become possible through 'digital northern' (110). With multiple EST programmes dealing with pathogenic (111-114) and mutualistic fungi, we will have in a near future an unparalleled opportunity to ask which genetic features are responsible for common/divergent traits involved in

pathogenesis and symbiosis. A few of the many possible breakthroughs will be in characterisation of common transduction networks, identification of novel surface proteins that play critical roles in plant-fungus interactions and new insights into unique metabolic routes critical for mycorrhiza functioning.

Quantitative analysis of the transcriptome has become possible through 'hybridization signature' methods which allow large scale measurement of gene expression (115-117). cDNA array analyses are currently providing efficient means of acquiring large amounts of biological information for identifying processes involved in plant-microbe interactions (114, 118). To take advantage of the available ESTs from the *Eucalyptus/Pisolithus* ectomycorrhiza, we have constructed miniarrays of fungal and plant ESTs (69). These miniarray analyses provided a tool to broadly analyze the expression of several hundreds genes during the symbiosis development, to identify SR genes, and to identify candidate genes for further more detailed analysis. About 80 SR genes (17%) were identified by differential screening of 480 arrayed cDNAs between free-living partners and symbiotic tissues (69). Even this modest collection of genes begins to provide an indication of symbiosis environment as perceived by the symbionts (Fig. 5). Within the cellular functions which are strikingly regulated by symbiosis development, we have identified: cell wall and membrane synthesis, stress and defence responses, protein degradation (in plant cells), and protein synthesis (in hyphae) (Fig. 5). EST/cDNA array analyses confirmed that most members of the hydrophobin and SRAP₃₂ gene families are dramatically up-regulated (up to 8-fold) during fungal mantle formation (see section VI.B). *Egubc2*, which encodes a ubiquitin-conjugating (E2) enzyme, and *EgCops7a*, coding for a subunit of the proteasome-related complex, are highly up-regulated in ectomycorrhizal tips confirming that symbiosis development induces drastic plant protein degradation (9). Protein degradation may be a result of stress conditions experienced by the roots colonized by massive amount of hyphae.

This data suggests a highly dynamic environment in which symbionts are sending and receiving signals, exposed to high levels of stress conditions and remodeling tissues. A striking result of these study is the fact that all genes investigated are common to the nonsymbiotic and symbiotic stages. At the developmental stage studied, symbiosis development does not induced the expression of

ectomycorrhiza-specific genes, but a marked change in the gene expression in the partners.

VIII. CONCLUSIONS

As outlined in this review, ectomycorrhiza development influences both plant and fungus gene expression in a pleiotropic manner. A range of fungal tissues differentiates that can be distinguished by a combination of anatomical, cytological and molecular features. On the other hand, root tips proliferate and root cells experience major alteration in their shape and gene expression. Advances of recent years have provided insights on the molecular basis of ectomycorrhiza morphogenesis. With the identification of several developmentally-regulated proteins and genes and a description of their expression and activities, the ground is now set for recasting earlier models of symbiosis development in molecular terms. It is apparent from this brief review, however, that there is a vast complexity of genetic programmes with overlapping expression patterns. This include: induction of plant defence/stress reactions, the down-expression of plant protein biosynthesis, the initiation of lateral roots by fungal auxins, the morphogenetic switches of the fungal hyphae, and the establishment of novel cell walls and extracellular matrices. Among the many remaining challenges is the elucidation of mechanisms and inducer molecules that integrate the actions of these multiple programmes of gene expression in generating a mature symbiotic organ. Studies in areas such the identification of chemicals and genes/proteins involved in cell-cell interactions, control of cell expression at the level of signal transduction will be the source for many answers. A comparative study of gene expression in different types of ectomycorrhizas using the molecular approaches including genomics and gene inactivation might reveal to what extent similarities and differences in the various types of ectomycorrhizas are the result of variation in the basic mechanisms underlying the respective developmental programmes and the effects of the different trophic and environmental cues.

ACKNOWLEDGEMENTS

SD was supported by a Doctoral Scholarship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. We also appreciated partial support from the Groupement de Recherches et d'Étude des Génomes, the INRA Collaborative Research Programme in Microbiology, and the INRA GenoPop research grant. We thank Drs Frank Ditengou, Hubert Lagrange, Frédéric Lapeyrie and Catherine Voiblet for stimulating discussions.

REFERENCES

1. S. E. Smith and D. J. Read. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd Edition. Academic Press, London. 1997.
2. A. H. Fitter and B. Moyersoen. Evolutionary trends in root-microbe symbioses. *Philos. Trans. Royal Soc. of London B*. 351: 1367-1375 (1996).
3. D. J. Read. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47: 376-390 (1991).
4. A. F. S. Taylor, F. Martin and D. J. Read. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica* L.) along North-South transects in Europe. In: *Carbon and Nitrogen Cycling in European Forest Ecosystems*, Ecological Studies 142, ED Schulze (ed.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2000, pp. 343-365.
5. A. A. Meharg and J. W. G. Cairney. Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Adv. Ecol. Res.* 30: 69-112 (2000).
6. T. S. Grove and F. Le Tacon. Mycorrhiza in plantation forestry. *Adv. Plant Pathol.* 9: 191-227 (1993).
7. I. Köttke and F. Oberwinkler. The cellular structure of the Hartig net: coenocytic and transfer cell-like organization. *Nord. J. Bot.* 7: 85-95 (1987).
8. H. B. Massicotte, R. L. Peterson, C. A. Ackerley and A. E. Ashford. Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Can. J. Bot.* 65: 1940-1947 (1987).
9. J. L. Hilbert, G. Costa and F. Martin. Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiol.* 97: 977-984 (1991).
10. B. Botton and M. Chalot. Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizas. *Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function* 2nd Edition (A. K. Varma and B. Hock, eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, 1999, pp. 333-372.
11. R. Hampp and C. Schaeffer. Mycorrhiza - Carbohydrate and energy metabolism. *Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function* 2nd Edition (A. K. Varma and B. Hock, eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, 1999, pp. 273-303.
12. H. Gehrig, A. Schüßler and M. Kluge. *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J. Mol. Evol.* 43: 71-81 (1996).
13. M.-A. Selosse and F. Le Tacon. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol. Evol.* 13: 15-20 (1998).
14. T. N. Taylor, W. Remy, H. Hass and H. Kerp. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87: 560-573 (1995).
15. B. A. LePage, R. S. Currah, R. A. Stockey and G. W. Rothwell. Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. *Am. J. Bot.* 84: 410-412 (1997).
16. T. D. Bruns, T. M. Szaro, M. Gardes, K. W. Cullings, J. J. Pan, D. L. Taylor, T. R. Horton, A. Kretzer, M. Garbelotto and Y. Li. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Mol. Ecol.* 7: 257-272 (1998).
17. D. S. Hibbett, L. B. Gilbert and M. J. Donoghue. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407: 506-508 (2000).
18. M. Brundrett. The co-evolution of mycorrhizas and roots of land plants: evaluation of the structure and function of ancient and modern associations. *New Phytol.* in press (2001).
19. E. Duhoux, G. Rinaudo, H. G. Diem, F. Auguy, D. Fernandez, D. Bogusz, C. Franche, Y. Dommergues and B. Huguenin. Angiosperm *Gymnostoma* trees produce root nodules colonized by arbuscular mycorrhizal fungi related to *Glomus*. *New Phytol.* 149: 115-125 (2001).
20. M. Gardes and T. D. Bruns. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* 74: 1572-1583 (1996).
21. L. Jonsson, A. Dahlberg, M. C. Nilsson, O. Zackrisson and O. Kären. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Mol. Ecol.* 8: 205-215 (1999).
22. J. W. G. Cairney. Intraspecific physiological variation: implications for understanding functional diversity in ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9: 125-135 (1999).
23. T. Wallenda, C. Strober, H. Högbom, H. Schinkel, E. George, P. Högbom and D. J. Read. Nitrogen uptake processes in

- roots and mycorrhizas. *Carbon and Nitrogen Cycling in European Forest Ecosystems* Ecological Studies 142, ED Schulze (ed.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2000, pp. 122-143.
24. M. Chalot and A. Brun. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 21-44 (1998).
 25. F. Martin and S. Lorillou. Nitrogen acquisition and assimilation in ectomycorrhizal systems. *Trees - Contributions to Modern Tree Physiology* H Rennenberg, W Eschrich, H Ziegler (eds), Backhuys Publ., Leiden, The Netherlands, 1997, pp. 423-429.
 26. M. W. Simard, D. A. Perry, M. D. Jones, D. D. Myrold, D. M. Duralland and R. Molina. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579-582 (1997).
 27. B. Wu, K. Nara and H. Taizo. Can ¹⁴C-labeled photosynthetic products move between *Pinus densiflora* seedlings linked by ectomycorrhizal mycelia? *New Phytol.* 149: 137-146 (2001).
 28. P. Vivin, F. Martin and J-M. Guehl. Acquisition and within-plant allocation of ¹³C and ¹⁵N in CO₂-enriched *Quercus robur* plants. *Physiol. Plant.* 98: 89-96 (1996).
 29. A. H. Fitter, A. Heinemeyer and P. L. Staddon. The impact of elevated CO₂ and global climate change on arbuscular mycorrhizas: a myc-centric approach. *New Phytol.* 147: 179-187 (2000).
 30. I. Kötter and F. Oberwinkler. Root-fungus interactions observed on initial stages of mantle formation and Hartig net establishment in mycorrhizas of *Amanita muscaria* on *Picea abies* in pure culture. *Can. J. Bot.* 64: 2348-2354 (1986).
 31. I. Brunner and C. Scheidegger. Effects of high nitrogen concentrations on ectomycorrhizal structure and growth of seedlings of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytol.* 129: 83-95 (1995).
 32. G. A. Chilvers. Low power electron microscopy of the root cap region of eucalypt mycorrhizas. *New Phytol.* 67: 663-668 (1968).
 33. D. P. Horan, G. A. Chilvers and F. F. Lapeyrie. Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytol.* 109: 451-458 (1988).
 34. J. Dexheimer, J. Gerard and P. Genet. Study of transformations of the root system of *Eucalyptus globulus* associated with *Pisolithus tinctorius*. I. Aptitude to mycorrhization of different kinds of roots. *Phytomorphology* 44: 235-245 (1994).
 35. H. B. Massicotte, C. A. Ackerley and R. L. Peterson. Ontogeny of *Alnus rubra-Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Can. J. Bot.* 67: 201-210 (1989).
 36. A. Brun, M. Chalot, R. D. Finlay and B. Söderström. Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* (Roth.). I. Dynamics of mycorrhiza formation. *New Phytol.* 129: 487-493 (1995).
 37. R. Agerer. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. 7th edition. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Bmünd, Germany. 1993-1998.
 38. G. Gay, R. Marmeisse, P. Fouillet, M. Bouletreau and J. C. Debaud. Genotype/nutrition interactions in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. *New Phytol.* 123: 335-343 (1993).
 39. F. Martin and D. Tagu. Developmental biology of a plant-fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. *Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function* 2nd Edition (A. K. Varma and B. Hock, eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, 1999, pp. 51-73.
 40. B. R. Kropp, B. J. McAfee and J. A. Fortin. Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* 65: 500-504 (1987).
 41. J. C. Debaud, G. Gay, A. Prevost, J. Lei and J. Dexheimer. Ectomycorrhizal ability of genetically different homokaryotic and dikaryotic mycelia of *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytol.* 108: 323-328 (1988).
 42. M. S. Lamhamedi, A. J. Fortin, H. H. Kope and B. R. Kropp. Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *Pinus banksiana*. *New Phytol.* 115: 689-697 (1990).
 43. K. K. Wong, Y. Piché, D. Montpetit and B. R. Kropp. Differences in the colonization of *Pinus banksiana* roots by sib-monokaryotic and dikaryotic strains of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* 67: 1717-1726 (1989).
 44. C. Karabaghli-Degron, B. Sotta, M. Bonnet, G. Gay and F. Le Tacon. The

- auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytol.* 140: 723-733 (1998).
45. A. M. Hirsch and M. J. McFall-Ngai. Fundamental concepts in symbiotic interactions: light and dark, day and night, squid and legume. *J. Plant Growth Regul.* 19: 113-130 (2000).
 46. N. Fries, K. Serck-Hanssen, L. Häll Dimberg and O. Theander. Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Exp. Mycol.* 11: 360-363 (1987).
 47. T. Béguiristain and F. Lapeyrie. Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytol.* 136: 525-532 (1997).
 48. F. A. Ditengou and F. Lapeyrie. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact* 13: 151-158 (2000).
 49. H. Lagrange, C. Jay-Allemand and F. Lapeyrie. Rutin, the phenolglycoside from *eucalyptus* root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytol.* in press (2001).
 50. F. Martin, F. Lapeyrie and D. Tagu. Altered gene expression during ectomycorrhizal development. *The Mycota*, Vol. V, Part A, Plant Relationships, G Caroll, P Tudzynski (eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1997, pp. 223-242.
 51. S. J. Barker and D. Tagu. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J. Plant Growth Regul.* 19: 144-154 (2000).
 52. D. P. Horan and G.A. Chilvers. Chemotropism; the key to ectomycorrhizal formation? *New Phytol.* 116: 297-301 (1990).
 53. H. A. Hartwig and D. A. Phillips. Release and modification of nod-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiol.* 95: 804-807 (1991).
 54. G. Nagahashi and D. D. Douds. Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.* 104: 1453-1464 (2000).
 55. T. Béguiristain, R. Côté, P. Rubini, C. Jay-Allemand and F. Lapeyrie. Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. *Phytochem.* 40: 1089-1091 (1995).
 56. N. L. Paiva. An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication. *J. Plant Growth Regul.* 19: 131-143 (2000).
 57. L. Gea, L. Normand, B. Vian and G. Gay. Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. *New Phytol.* 128: 659-670 (1994).
 58. N. Gogala. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* 47: 331-340 (1991).
 59. H. Beyrle. The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. *Mycorrhiza: Structure, molecular biology and function*, Varma AK, Hock B (eds), Springer Berlin Heidelberg New York, 1995, pp. 365-390.
 60. V. Slankis. Effect of naphthaleneacetic acid on dichotomous branching of isolated roots of *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* 3, 40-43 (1950).
 61. J. M. Ulrich. Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* 13: 429-443 (1960).
 62. L. A. Rupp and K. W. Mudge. Ethephon and auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ cultures of Mugo pine. *Physiol. Plant.* 64: 316-322 (1985).
 63. L. A. Rupp, K. W. Mudge and F. B. Negm. Involvement of ethylene in ectomycorrhiza formation and dichotomous branching of roots of Mugo pine seedlings. *Can. J. Bot.* 67: 477-482 (1989).
 64. W. T. Frankenberger and M. Poth. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2908-2913 (1987).
 65. G. Gay, L. Normand, R. Marmesse, B. Sotta and J. C. Debaud. Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési have increased mycorrhizal activity. *New Phytol.* 128: 645-657 (1994).
 66. K. Palme and L. Gälweiler. PIN-pointing the molecular basis of auxin transport.

- Curr. Op. Plant Biol.* 2: 375-381 (1999).
67. H. Tranvan, Y. Habricot, E. Jeannette, G. Gay and B. Sotta. Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. *Tree Physiol.* 20: 123-129 (2000).
 68. U. Nehls, T. Béguiristain, F. Ditengou, F. Lapeyrie and F. Martin. The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta* 207: 296-302 (1998).
 69. C. Voiblet, S. Duplessis, N. Encelot and F. Martin. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant J.* In press (2001).
 70. F. A. Ditengou, T. Béguiristain and F. Lapeyrie. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by IAA. *Planta* 211: 722-728 (2000).
 71. J. Dexheimer and J. C. Pargney. Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. *Experientia* 47: 312-320 (1991).
 72. D. Tagu and F. Martin. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. *New Phytol.* 133: 73-85 (1996).
 73. R. Balestrini, M. G. Hahn and P. Bonfante. Location of cell-wall components in ectomycorrhizae of *Corylus avellana* and *Tuber magnatum*. *Protoplasma* 191: 55-69 (1996).
 74. P. Bonfante. At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. *Fungal associations, Mycota IX*, B Hock, (ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2001, pp. 000-000.
 75. W. L. Chaffin, J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo and J. P. Martinez. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 130-180 (1998).
 76. F. Lapeyrie, J. Lei, N. Malajczuk and J. Dexheimer. Ultrastructural and biochemical changes at the pre-infection stage of mycorrhizal formation by two isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Ann. Sci. For.* 46s: 754s-757s (1989).
 77. J. Lei, K. K. Y. Wong and Y. Piché. Extracellular concanavalin A-binding sites during early interactions between *Pinus banksiana* and two closely related genotypes of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Mycol. Res.* 95: 357-363 (1991).
 78. J. Lei, F. Lapeyrie, N. Malajczuk and J. Dexheimer. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in vitro. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. *New Phytol.* 116: 115-122 (1990).
 79. M. Giollant, J. Guillot, M. Damez, M. Dusser, P. Didier and E. Didier. Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiol.* 101: 513-522 (1993).
 80. F. Lapeyrie and K. Mendgen. Quantitative estimation of surface carbohydrates of ectomycorrhizal fungi in pure culture and during *Eucalyptus* root infection. *Mycol. Res.* 97: 603-609 (1993).
 81. F. Martin, P. Laurent, D. De Carvalho, C. Voiblet, R. Balestrini, P. Bonfante and D. Tagu. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: Identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genet. Biol.* 27: 161-174 (1999).
 82. J. G. H. Wessels. Tansley Review N°45. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol.* 123: 397-413 (1993).
 83. M. J. Kershaw and N. J. Talbot. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 23: 18-33 (1998).
 84. H. A. B. Wösten, M. Richter and J. M. Willey. Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. *Fungal Genet. Biol.* 27: 153-160 (1999).
 85. H. A. B. Wösten and J. M. Willey. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology* 146: 767-773 (2000).
 86. O. M. H. De Vries, M. P. Fekkes, H. A. B. Wösten and J. G. H. Wessels. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and

- other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* 159: 330-335 (1993).
87. D. Tagu, R. De Bellis, R. Balestrini, O. M. H. De Vries, G. Piccoli, V. Stocchi, P. Bonfante and F. Martin. Immunolocalization of the hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytol.* 149: 127-135 (2001).
 88. D. Tagu, I. Kottke and F. Martin. Hydrophobins in ectomycorrhizal symbiosis: hypothesis. *Symbiosis* 25: 5-18 (1998).
 89. D. Tagu, B. Nasse and F. Martin. Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* 168: 93-97 (1996).
 90. P. A. Vesik, A. E. Ashford, A.-L. Markovina and W. G. Allaway. Apoplastic barriers and their significance in the exodermis and sheath of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas. *New Phytol.* 145: 333-346 (2000).
 91. T. Burgess, P. Laurent, B. Dell, N. Malajczuk and F. Martin. Effect of the fungal isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhiza. *Planta* 195: 408-417 (1995).
 92. P. Laurent, C. Voiblet, D. Tagu, D. De Carvalho, U. Nehls, R. De Bellis, R. Balestrini, G. Bauw, P. Bonfante and F. Martin. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 862-871 (1999).
 93. M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-33 (1984).
 94. E. Ruoslahti. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 697-715 (1996).
 95. M. Guttenberger and R. Hampp. Ectomycorrhizins - Symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas? *Planta* 188: 129-136 (1992).
 96. P. Simoneau, J. D. Viemont, J. C. Moreau and D. G. Strullu. Symbiosis-related polypeptides associated with the early stages of ectomycorrhiza organogenesis in birch (*Betula pendula* Roth). *New Phytol.* 124: 495-504 (1993).
 97. M. Tarkka, S. S. Niini and M. Raudaskoski. Developmentally regulated proteins during differentiation of root system and ectomycorrhiza in Scots pine (*Pinus sylvestris*) with *Suillus bovinus*. *Physiol. Plant.* 104: 449-455 (1998).
 98. S. J. Kim, J. Zheng, S. T. Hiremath and G. K. Podila. Cloning and characterization of a symbiosis-related gene from an ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Gene* 222: 203-212 (1998).
 99. S. J. Kim, D. Bernreuther, M. Thumm and G. K. Podila. *LB-AUT7*, a novel symbiosis-regulated gene from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis. *J. Bacteriol.* 181: 1963-1967 (1999).
 100. U. Nehls, S. Mikolajewski, M. Ecke and R. Hampp. Identification and expression-analysis of two fungal cDNAs regulated by ectomycorrhiza and fruit body formation. *New Phytol.* 144: 195-202 (1999).
 101. U. Nehls, J. Wiese, M. Guttenberger and R. Hampp. Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 167-176 (1998).
 102. D. P. Wright, J. D. Scholes, D. J. Read and S. A. Rolfe. Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant Cell Environ.* 23: 39-49 (2000).
 103. U. Nehls, M. Ecke and R. Hampp. Sugar- and nitrogen-dependent regulation of an *Amanita muscaria* phenylalanine ammonium lyase gene. *J. Bacteriol.* 181: 1931-1933 (1999).
 104. U. Nehls, A. Bock, M. Ecke and R. Hampp. Differential expression of hexose-regulated fungal genes within *Amanita muscaria*/*Populus tremula* x *tremuloides* ectomycorrhizas. *New Phytol.*, in press (2001).
 105. D. Blaudez, M. Chalot, P. Dizengremel and B. Botton. Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* and *Betula pendula*. II. Metabolic changes during mycorrhiza formation. *New Phytol.* 138: 543-552 (1998).
 106. J. W. G. Cairney and R. M. Burke. Physiological heterogeneity within

- fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 134: 685-695 (1996).
107. R. Hampp, C. Schaeffer, T. Wallenda, C. Stülten, P. Johann and W. Einig. Changes in carbon partitioning or allocation due to ectomycorrhiza formation: biochemical evidence. *Can. J. Bot.* 73: s548-s556 (1995).
 108. D. Tagu and F. Martin. Expressed sequence tags of randomly selected cDNA clones from *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 781-783 (1995).
 109. C. Voiblet and F. Martin. Identifying symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza using suppression subtractive hybridization and cDNA arrays. *Molecular Plant-Microbe Interaction, 9th International Congress*, Amsterdam July 25-30, P. J. G. M. de Wit, T. Bisseling and W. J. Stiekema Eds, 1999, pp. 208-213.
 110. R. M. Ewing, A. Ben Kahla, O. Poirot, F. Lopez, S. Audic and J. M. Claverie. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res.* 9: 950-959 (1999).
 111. M. Hahn and K. Mendgen. Characterization of *in planta* induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 427-437 (1997).
 112. S. Kamoun, P. Hraber, B. Sobral, D. Nuss and F. Govers. Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genet. Biol.* 28: 94-106 (1999).
 113. D. Qutob, P. T. Hraber, B. W. S. Sobral and M. Gijzen. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol.* 123: 243-253 (2000).
 114. P. M. Schenk, K. Kazan, I. Wilson, J. P. Anderson, T. Richmond, S. C. Somerville and J. M. Manners. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11655-11660 (2000).
 115. L. Wodicka, H. L. Dong, M. Mittmann, M. H. Ho and D. J. Lockhart. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotech.* 15: 1359-1367 (1997).
 116. T. Desprez, J. Amselem, M. Caboche and H. Höfte. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.* 14: 643-652 (1998).
 117. T. Girke, J. Todd, S. Ruuska, J. White, C. Benning and J. Ohlrogge. Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 124: 1570-1581 (2000).
 118. J. Györgyey, D. Vaubert, J. I. Jiménez-Zurdo, C. Charon, L. Troussard, A. Kondorosi and E. Kondorosi. Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 62-71 (2000).
 119. E. Carnero Diaz, F. Martin, D. Tagu. Eucalypt α -tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. *Plant Mol. Biol.* 31: 905-910 (1996).
 120. V. Boiffin, M. Hodges, S. Galvez, R. Balestrini, P. Bonfante, P. Gadai, F. Martin. Eucalypt NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. cDNA cloning and expression in ectomycorrhizae. *Plant Physiology* 117: 939-948 (1998).
 121. L. Feugey, DG Strullu, P. Poupard, P. Simoneau. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. *New Phytol.* 144: 541-547 (1999).

Chapitre 2

Identification de gènes régulés par la symbiose
Eucalyptus globulus-*Pisolithus tinctorius* par hybridation
différentielle de filtres d'ADNc

Identification de gènes régulés par la symbiose ectomycorhizienne *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* par hybridation différentielle de filtres d'ADNc.

Comme nous venons de le décrire dans le chapitre introductif, la mise en place d'un organe mixte au niveau du système racinaire de l'hôte végétal, entraîne chez les deux symbiotes des modifications profondes dans leur morphologie : arrêt de la croissance des poils absorbants sous l'influence de l'hypaphorine fongique, allongement radial des cellules de l'épiderme racinaire chez la plante d'une part et, modification de la morphologie des hyphes mycéliens sous l'influence des exsudats de la plante et structure en palmette des hyphes fongiques au contact de la racine d'autre part. Cette gamme de modifications qui aboutit à la mise en place de l'organe mycorhizien est accompagnée de changements dans les profils de biosynthèse des protéines et de l'expression de plusieurs gènes chez chacun des partenaires. Ces modifications suggèrent l'existence d'un programme génétique propre à la mycorhize, présent dans les génomes des deux symbiotes et déclenché pendant cette morphogénèse.

Afin de déterminer quelle était l'importance d'un tel programme, nous nous sommes attachés à décrire le transcriptome de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius*. Le modèle *in vitro* retenu pour mener cette étude a été parfaitement décrit du point de vue morphologique et physiologique et une étude partielle de ses composants protéiques et de plusieurs gènes régulés par la symbiose (gènes-SR) en faisait un modèle de choix. Le système de synthèse de mycorhize à partir de radicules plagiotropes d'*Eucalyptus globulus* permet d'obtenir des mycorhizes matures en l'espace de 8 jours et il est possible de distinguer clairement les différentes étapes du processus ectomycorhizien. Pour débiter notre étude du transcriptome, nous nous sommes intéressés à un stade médian de 4 jours de développement. A ce stade, les hyphes fongiques recouvrent la racine et forment le manteau. Des hyphes partant de ce manteau commencent aussi à pénétrer au sein du cortex racinaire pour mettre en place le réseau de Hartig. Afin d'avoir une vision plus complète du processus développemental, nous nous sommes tournés vers un autre système de culture d'ectomycorhize d'*Eucalyptus-Pisolithus*, qui est vraisemblablement plus proche des conditions naturelles. En effet, les racines ont dans ce cas une croissance orthotrope et l'échange de signaux rhizosphériques, occulté dans le premier système, a lieu au cours des premiers jours de culture. Ce système de culture *in vitro* permet l'obtention d'organes mixtes après 21 jours de culture.

Ce projet de génomique fonctionnelle se proposait dans un premier temps de mettre en place un index des fonctions exprimées (séquençage d'ESTs) chez les deux symbiotes, l'*Eucalyptus* et le *Pisolithus*, par séquençage d'ADNc prélevés aléatoirement ou de manière ciblée (par SSH ou hybridation soustractive et suppressive) dans une banque d'une ectomycorhize de 4 jours. L'étude de l'expression des différentes fonctions codées par 486 ESTs sélectionnées a été abordée à travers une

analyse du transcriptome de l'ectomycorhize de 4 jours à partir de filtres de moyenne densité en ADNc (96 ADNc par filtres). Les résultats sont présentés dans l'article : *Identification of symbiosis-regulated genes in Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs* (Voiblet *et al.*, 2001).

Dans un second temps, nous avons suivi l'expression de plus de 700 gènes fongiques et racinaires dans l'organe ectomycorhizien, à travers une cinétique de développement, depuis les premiers contacts entre les partenaires jusqu'au fonctionnement de l'organe mixte. L'étude de cette chronoséquence a permis de suivre des vagues d'expression de gènes présentant des profils d'expression similaires (ou régulons) au cours du développement. La technique des filtres de moyenne densité en ADNc, utilisée lors de la précédente étude, aurait nécessité la confection de plusieurs centaines de filtres pour mener à bien cette étude. Nous nous sommes donc orientés vers une approche de dépôt d'ADNc par robotique sur filtre de nitrocellulose (cDNA arrays de 25 clones/cm²). La technique utilisant ces filtres portant près de 2000 ADNc a été développée et testée et nous avons pu en apprécier la reproductibilité . A partir d'une analyse statistique bioinformatique réalisée sur plus de 20 000 valeurs d'expression, nous avons obtenu les profils de régulation de plus de 700 ESTs au cours du développement de l'ectomycorhize. Ces résultats sont présentés dans l'article : *cDNA array analysis of ectomycorrhiza development* (Duplessis & Martin, 2001 ; article en préparation pour la revue *Plant Physiology*).

Identification of symbiosis-regulated genes in
Eucalyptus globulus - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza
by differential hybridization of arrayed cDNAs

Publication n° 2

Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs

Catherine Voiblet[†], Sébastien Duplessis[†], Nathalie Encelot and Francis Martin*

Equipe de Microbiologie Forestière, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches de Nancy, 54280 Champenoux, France

Received 18 September 2000; accepted 5 November 2000.

*For correspondence (fax +33 383 39 40 69; e-mail fmartin@nancy.inra.fr)

[†]These authors contributed equally to this work.

Summary

Ectomycorrhiza development alters gene expression in the fungal and plant symbionts. The identification of a large number of genes expressed exclusively or predominantly in the symbiosis will contribute greatly to the understanding of the development of the ectomycorrhizal symbiosis. We have constructed a cDNA library of 4-day-old *Eucalyptus globulus*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza and sequenced 850 cDNAs cloned randomly or obtained through suppression subtractive hybridization (SSH). Based on the absence of a database match, 43% of the ectomycorrhiza ESTs are coding for novel genes. At the developmental stage analysed (fungal sheath formation), the majority of the identified sequences represented 'housekeeping' proteins, i.e. proteins involved in gene/protein expression, cell-wall proteins, metabolic enzymes, and components of signalling systems. We screened arrayed cDNAs to identify symbiosis-regulated genes by using differential hybridization. Comparisons of signals from free-living partners and symbiotic tissues revealed significant differences in expression levels (differential expression ratio >2.5) for 17% of the genes analysed. No ectomycorrhiza-specific gene was detected. The results successfully demonstrate the use of the cDNA array and SSH systems as general approaches for dissecting symbiosis development, and provide the first global picture of the cellular functions operating in ectomycorrhiza.

Keywords: cDNA arrays, cell wall proteins, ectomycorrhiza, expressed sequence tags, suppression subtractive hybridization, symbiosis-regulated genes.

Introduction

Mycorrhizal associations are almost ubiquitous, and the effects of this symbiosis on plant fitness and health, and on the ability of plants to grow productively in suboptimal environments, are profound. Ectomycorrhizal fungi are found on most absorbing short roots of tree species in boreal and temperate forests where they affect growth and water/nutrient absorption, and provide protection from root diseases (Smith and Read, 1997). The ectomycorrhiza is characterized by the presence of three structural components: a sheath or mantle of fungal tissue which encloses the root; a labyrinthine inward growth of hyphae between the epidermal and cortical cells; and an outwardly growing system of hyphal elements which form essential connections with both the soil and the fruit bodies of the

fungi forming the ectomycorrhizas (Peterson and Bonfante, 1994). The extramatrical hyphae, the ectomycorrhizal mantle and the intraradicular hyphal network are active metabolic entities that provide essential nutrient resources (e.g. phosphate, amino acids) to the host plant. These nutrient contributions are reciprocated by the provision of a stable carbohydrate-rich niche in the roots for the fungal partner, making the relationship a mutualistic symbiosis.

In addition to metabolic changes, ectomycorrhiza development involves striking alterations in root and hyphae morphology (Hardham and Mitchell, 1998; Martin and Tagu, 1999; Peterson and Bonfante, 1994). Because ectomycorrhizal fungi, belonging to phylogenetically dif-

ferent taxa, can induce similar structures in several tree species, they probably interact with some fundamental key steps of the plant cell cycle, and a hypothetical set of symbiotic factors has been proposed (Martin and Hilbert, 1991) and supported by various genetic and molecular studies (Martin *et al.*, 1997). Although conventional molecular approaches have identified several symbiosis-regulated (*SR*) genes (Carnero Díaz *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999; Nehls *et al.*, 1998, 1999; Tagu *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2000), they are not convenient for tracking multiple genes during the successive developmental stages leading to functioning symbiotic organs. In addition, the overall extent of these changes is unknown, and the functional connections as well as the degree of co-ordination among the individual genetic components are poorly understood. Expressed sequence tag (ESTs) and cDNA array analyses have led to rapid identification of genes in a number of organisms, and accelerated research by providing the ground for large-scale functional analysis of thousands of genes (Desprez *et al.*, 1998; Eisen *et al.*, 1998; Hervé *et al.*, 1996; Höfte *et al.*, 1993; Newman *et al.*, 1994; Reymond *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 1998; Schena *et al.*, 1995; Schena *et al.*, 1996; Wodicka *et al.*, 1997). Because of the wide spectrum of genes and signals involved, these approaches are well suited for analysing the development and functioning of complex organs such as symbioses (Györgyey *et al.*, 2000).

This paper presents an analysis of 940 ectomycorrhizal ESTs and a differential expression analysis of 486 selected genes from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* and its host plant *Eucalyptus globulus* in ectomycorrhiza. This survey not only provides insight into the cellular function operating in free-living partners and symbiotic tissues, but also allows us to identify *SR* genes on a large scale.

Results

Overall distribution of sequence categories

We postulated that genes preferentially expressed in the differentiating ectomycorrhiza 4 days after contact may include genes involved in processes related to the early stages of symbiosis, together with genes of the novel symbiotic metabolism. About 650 cDNA were randomly selected from a cDNA library of 4-day-old ectomycorrhizas, and another set of 200 mycorrhiza preferentially expressed sequences was generated by the suppression subtractive hybridization (SSH) technique (Diatchenko *et al.*, 1996). Upon assembling the 940 readable sequences obtained from the 5' or 3' ends of 850 cDNAs, we were left with 634 non-redundant ESTs (singletons) corresponding to different genes. These sequences have been deposited in the NCBI database (accession numbers AW600807–AW600908

and AW731605–AW731617). Among them, 324 species (51%) were identical or similar to known plant or fungal characterized genes, including genes of known function, putative open reading frames, and ESTs. These homologues have been listed in functional categories (see the EctomycorrhizaDB at <http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>). Finally, the remaining species showed no significant similarity to any in the NCBI database, suggesting that these genes might be expressed only in *E. globulus* or *P. tinctorius*, or that they were very rare transcripts that have not been found in previous EST projects.

The largest category (30%) of identified sequences corresponded to genes coding for the gene/protein expression machinery, which includes transcripts such as those coding for ribosomal proteins, translational regulatory proteins, elongation factors, and the ubiquitin/proteasome pathway components. For example, 41 ESTs coded for various plant and fungal ribosomal proteins. Cell-wall proteins such as hydrophobins (Tagu *et al.*, 1996) and symbiosis-regulated acidic polypeptides (SRAP32), that are found at the surface of interacting fungal cells (Laurent *et al.*, 1999), were also abundantly detected (10%). As expected in a symbiotic organ where bilateral transfers are intense and assimilative activity very high, a significant proportion of genes (13%) expressed in ectomycorrhiza code for enzymes of primary and secondary metabolism (e.g. ATP synthase; glyceraldehyde-3-P dehydrogenase; alanine aminotransferase). Transcripts involved in cell signalling and cell communication (e.g. ADP-ribosylation factors; calmodulin, heterotrimeric GTPases; ras) were also abundant (13%) in mycorrhizal tissues.

Nucleotide sequences were clustered by similarity to deduce ectomycorrhiza-specific redundancy. Table 1 shows the most abundantly represented transcripts obtained either by random cloning or SSH. The most abundant transcript (contig EgPtdB57) corresponds to a novel gene which codes a small protein of 17 kDa (pI 4.6), so-called SRAP17. The other abundant transcripts are matching structural proteins (hydrophobins; types I and II of SRAP32; transmembrane FUN34 protein; extensin), a metallothionein, components of the translation machinery and novel genes. The δ -(24)-sterol C-methyltransferase (*ERG6*) involved in ergosterol synthesis was cloned three times by SSH. A majority of the redundant clones have been obtained by SSH and correspond to *SR* genes, indicating that the subtraction helped to enrich for mycorrhiza-induced genes.

Profiles of highly expressed genes in roots, free-living mycelium and symbiotic tissues

To investigate changes in gene-expression profiles during the symbiosis development, cDNA mini-arrays were

Table 1. Most prevalent mRNAs in *Eucalyptus globulus*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza as measured by EST redundancy

Contig ID ^a	Organism	Best database match ^b	P value	Redundancy ^c
EgPtdB57	Fungus	No match (referred to as SRAP17)	–	29 (23)
5A8	Fungus	HydPt-2 (<i>P. tinctorius</i>)	8.6×10^{-50}	19 (12)
EgPtdA12	Fungus	SRAP32-1, Type I (<i>P. tinctorius</i>)	4.4×10^{-94}	18 (17)
st54	Fungus	Transmembrane FUN34 protein (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	3.8×10^{-40}	9 (7)
5C6	Fungus	No match	–	9 (1)
7A7	Fungus	Elongation factor 1- γ (<i>Artemia</i> sp.)	2.5×10^{-20}	7 (3)
7A6	Fungus	No match	–	6 (4)
11A2	Fungus	Metallothionein (<i>Agaricus bisporus</i>)	3.5×10^{-5}	7 (3)
5B6	Fungus	No match	–	5 (4)
7A3	Fungus	No match	–	6 (2)
EgPtdA9	Fungus	SRAP32-1, Type II (<i>P. tinctorius</i>)	1.7×10^{-08}	6 (6)
1A6	Fungus	No match	–	5 (0)
6C8	Fungus	WD-repeat CPC2 protein (<i>Neurospora crassa</i>)	2.8×10^{-127}	5 (2)
EgPtdB35	Fungus	No match	–	4 (4)
EgPtdC80	Fungus	δ -(24)-sterol c-methyltransferase (<i>ERG6</i>) (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	3.7×10^{-49}	3 (3)
5A1	Plant	Ribosomal protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	6.5×10^{-32}	3 (0)
13A4	Plant	Extensin-like protein (<i>Populus nigra</i>)	7×10^{-42}	3 (0)
8A9	Fungus	60S ribosomal protein L10 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	7.5×10^{-83}	3 (0)
5C4	Fungus	HydPt-3 (<i>P. tinctorius</i>)	2.1×10^{-53}	3 (0)

^aRepresentative EST ID from assembly contig.^bBest database match and corresponding species obtained with a WU-BLASTX search (Worley *et al.*, 1998).^cNumber of ESTs obtained by random cloning and SSH (in parentheses) that assembled into a contiguous sequence.

assembled with 486 selected ESTs from the ectomycorrhiza library. The arrayed cDNAs included several housekeeping genes (e.g. ribosomal proteins) for signal normalization, and some previously identified ectomycorrhiza-regulated control genes (hydrophobins, SRAPs) with predictable patterns (see Experimental procedures). Three sets of six filters were prepared: one was hybridized with non-mycorrhizal roots, the second with free-living mycelium, and the third with mycorrhiza-derived ³²P-labelled cDNAs synthesized from total RNA of the respective tissues. Genomic origin of selected cDNAs (e.g. *SR* genes; communication genes; ubiquitin/proteasome pathway) was ascertained by Southern blotting. In all cases the genomic origin of the ESTs was confirmed, based on database similarities (data not shown). A list of the most highly expressed genes in ectomycorrhizas, non-inoculated roots and free-living mycelium can be found in the EctomycorrhizaDB (<http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAbases/EctomycorrhizaDB.html>). A large part of these genes in ectomycorrhizas (e.g. *5C6*, *7E9*, *1E9*) and free-living mycelium (e.g. *5C6*, *7B9*, *10A4*, *10A1*) did not match database entries, whereas all the top 22 plant genes matched a known gene. As expected, most of the highly expressed known genes belonged to potential housekeeping or structural genes, that is, genes encoding proteins involved in cell-wall formation (hydrophobins; hyp-rich glycoprotein), carbon metabolism (glyceraldehyde-3-P dehydrogenase; ATP synthase) and maintenance (riboso-

mal functions; water channelling; translation). Several plant genes, designated as stress-inducible protein genes (e.g. abscisic-induced, ripening-induced and water-stress induced proteins), were found among these highly expressed genes.

Differential expression in ectomycorrhiza

Four days after contact between *P. tinctorius* and eucalypt seedlings, a marked change was seen in the global pattern of expression of the genes studied (Figure 1). By inspecting the phosphorimager data and the traditional Northern blot exposures of known *SR* genes (hydrophobins, SRAP32), we estimated that a two- to 2.5-fold difference in signal intensity between mycorrhiza and free-living partner hybridizations revealed significant differences in transcript concentrations. Genes were thus regarded as 'mycorrhiza-regulated' only if the ratio of mycorrhiza/free-living partners was ≥ 2.5 . Based on this criterion, mRNA levels for 45 genes were upregulated by a factor ± 2.5 , whereas mRNA levels for 21 genes diminished by a factor of at least 2.5 (Table 2). This may be a conservative estimate of percentage of symbiont genes that change in expression level during morphogenesis, because of the stringent criteria used for their selection. No ectomycorrhiza-specific gene was detected. Prevalent regulated mRNAs as measured by EST redundancy of SSH clones, so-called EgPtdx (Table 1), also displayed a high differen-

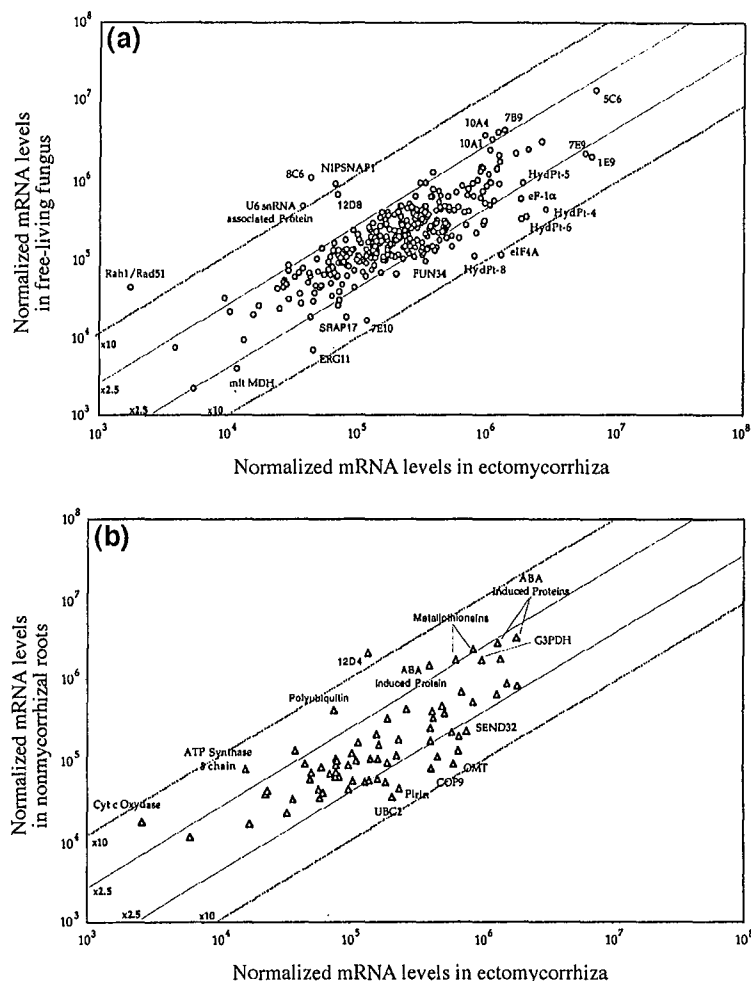


Figure 1. Expression profiling of 400 genes between free-living *Pisolithus tinctorius*, non-mycorrhizal roots of *Eucalyptus globulus* and 4-day-old *E. globulus*-*P. tinctorius* ectomycorrhiza.

For each gene, transcript levels (in arbitrary units) were calculated for the free-living mycelium (a); non-mycorrhizal roots (b); and ectomycorrhiza (x-axis in a and b) RNA, and displayed on a scatter plot. If the genes were not affected by mycorrhiza development, their transcript level will fall on the 45° line. Solid lines indicate 2.5-fold expression differences between free-living partners and symbiotic tissues; dotted lines, 10-fold expression differences. Clones coding for the same gene are displayed once.

tial expression ratio on cDNA arrays (Table 2), confirming that SSH is an efficient procedure for cloning differentially expressed genes (Diatchenko *et al.*, 1996). However, the most highly regulated genes, such as the fungal eIF4A (clone 9C9) and the plant *O*-methyltransferase (OMT; clone 8E9), were not found in the 200 SSH clones sequenced.

The highest differential expression (12-fold increase) detected was for a translation initiation factor eIF4A gene ('dead' box family helicases; Fischli *et al.*, 1996) from *P. tinctorius* (clone 9C9). The translation elongation factor, tef1 (clone 6E10), also showed an increased expression (3.4-fold) in the symbiotic mycelium. The known ectomycorrhiza-regulated genes, hydrophobins (Tagu *et al.*, 1996) and SRAP32 (Laurent *et al.*, 1999), displayed the expected, mycorrhiza-enhanced expression pattern (between 2.5- and 7.8-fold relative increases) (Figure 2). A striking increase (6.8-fold) was also observed for the transcripts

coding for the 14 α -methyl sterol demethylase (ERG11; clone 7B2). Interestingly, the δ -(24)-sterol c-methyltransferase (ERG6; contig EgPtdC80) was cloned three times by SSH, suggesting that ergosterol synthesis is increased during mycorrhiza formation. A strong increase (fourfold) was observed for the transcripts coding for a *Pisolithus* WD-containing beta transducin (*ud283*), indicating that signalling pathway components might be transcriptionally activated in the ectomycorrhiza.

In agreement with a previous study (Weiss *et al.*, 1997) showing that ectomycorrhiza formation activates the phenylpropanoid pathway in short roots of larch, an elicitor-inducible isoflavone 7-*O*-methyltransferase (He *et al.*, 1998) (clone 8E9) exhibited strong activation (6.8-fold) in mycorrhizal eucalypt roots. The upregulation of transcripts coding for components of the ubiquitin/proteasome pathway (clones 6E3 and 6C7) and stress proteins

Table 2. Differential gene expression in ectomycorrhiza versus free-living partners. Sixty-six genes with the highest (upregulation) and lowest (downregulation) ectomycorrhiza/free-living partners expression ratios are listed

GenBank accession no.	EST clone ID	Organism	Ratio ^a Myc./Root	Best database match (species) ^b
AW600894	9C9	Fungus	12.3	Initiation factor eIF4A (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)
AW600900	7C2	Fungus	7.8	Hydrophobin HYDPT-8 (<i>P. tinctorius</i>)
BE704433	7E10	Fungus	7.5	No match
AW600870	5E4	Fungus	7.1	Hydrophobin HYDPT-4 (<i>P. tinctorius</i>)
AW731605	8E9	Plant	6.8	O-methyltransferase (<i>Prunus dulcis</i>)
BE704434	7B2	Fungus	6.8	Sterol-14- α -demethylase (ERG11) (<i>Candida glabrata</i>)
AW600871	5B9	Fungus	6.3	Hydrophobin HYDPT-6 (<i>P. tinctorius</i>)
AW600873	5C10	Fungus	6.3	Hypothetical protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
AW600843	6E3	Plant	6.0	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 18 kDa (<i>A. thaliana</i>)
BE704448	6D3	Plant	5.3	Pirin (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
AW600809	3E3	Plant	5.2	COP9 subunit complex 7a (<i>A. thaliana</i>)
BE704440	10C3	Plant	5.2	Hypothetical protein (<i>A. thaliana</i>)
BE704438	6C7	Plant	5.0	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 19 kDa (<i>A. thaliana</i>)
AW731607	EgPtdB57	Fungus	4.7	SRAP17 (<i>P. tinctorius</i>)
AW600896	ud194	Fungus	4.1	SRAP32-1 (<i>P. tinctorius</i>)
AW600907	ud283	Fungus	4.0	PWP2 GTP protein (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
AW600908	8D5	Fungus	3.8	Transmembrane FUN 34 protein (<i>S. pombe</i>)
L41721	ud20	Fungus	3.6	SRAP32-1 (<i>P. tinctorius</i>)
AW731613	11D6	Fungus	3.5	No match
AW600819	7E9	Fungus	3.5	Kexin (<i>Pneumocystis carinii</i>)
AW600820	7D4	Plant	3.4	Salt-stress induced LTI6B protein (<i>A. thaliana</i>)
BE704447	9B9	Plant	3.4	Calmodulin (<i>Daucus carota</i>)
BE704441	6D10	Plant	3.4	Senescence down-regulated protein (SEND32) (<i>L. esculentum</i>)
AW600874	6E10	Fungus	3.4	Translation-elongation factor 1 α (<i>Schizophyllum commune</i>)
AW731606	EgPtdB3	Fungus	3.3	No match
AW731614	3D9	Fungus	3.3	No match
AW600817	st45	Fungus	3.1	Elastinolytic metalloprotease (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
BE704435	8B10	Fungus	3.0	Mitochondrial malate dehydrogenase (<i>S. pombe</i>)
AW600818	11E9	Fungus	2.9	Actin-binding protein Sop2/Arp2/3 (<i>S. pombe</i>)
AW731612	EgPtdB56	Fungus	2.9	No match
AW731609	st54	Fungus	2.9	Transmembrane FUN 34 protein (<i>S. pombe</i>)
AW600869	1E9	Fungus	2.9	No match
AW600810	EgPtdB14	Fungus	2.8	SRAP32-3 (<i>P. tinctorius</i>)
AW600811	EgPtdB26	Fungus	2.8	Hydrophobin HYDPT-5 (<i>P. tinctorius</i>)
AW600827	8D6	Fungus	2.8	No match
AW731610	EgPtdB29	Fungus	2.8	No match
AW600826	3D7	Fungus	2.8	No match
AW600852	8A7	Plant	2.7	ADP-ribosylation factor (<i>Oryza sativa</i>)
AW600822	3C3	Plant	2.7	Hypothetical protein T6K21.210 (<i>A. thaliana</i>)
AW600807	EgPtdB23	Fungus	2.6	No match
AW600836	8D10	Fungus	2.5	Shp1 protein phosphatase (<i>S. pombe</i>)
AW600812	EgPtdB33	Fungus	2.5	No match
AW600823	8C7	Fungus	2.5	Thioredoxin reductase (<i>S. pombe</i>)
AW600846	EgPtdB12	Fungus	2.5	SRAP32-3 (<i>P. tinctorius</i>)
AW731615	3C7	Plant	2.5	No match
BE704436	7D8	Fungus	-2.5	No match
AW600903	3B5	Fungus	-2.6	No match
AW600862	EgPtdB13	Plant	-2.7	Metallothionein (<i>Casuarina glauca</i>)
AW600863	8A5	Plant	-2.8	Metallothionein 1-like protein (<i>Pimpinella brachycarpa</i>)
AW600845	EgPtdB16	Fungus	-2.8	Hypothetical 30.9 kDa protein (<i>S. pombe</i>)
BE704437	8A6	Fungus	-2.9	No match
AW600877	7B9	Fungus	-3.0	No match
AW600880	10A4	Fungus	-3.2	No match
BE704426	7C5	Fungus	-3.2	mRNA maturase b12 (<i>S. cerevisiae</i>)
AW600857	st144	Plant	-3.6	Methylcrotonyl-CoA carboxylase
AW600891	10A1	Fungus	-3.6	No match
AW600864	st160	Plant	-3.8	Abscisic-induced protein (<i>Prunus armeniaca</i>)
AW600858	7E5	Plant	-4.8	ATP synthase δ chain (<i>Ipomoea batatas</i>)

Table 2. (continued)

GenBank accession no.	EST clone ID	Organism	Ratio ^a Myc./Root	Best database match (species) ^b
AW600860	12C3	Plant	-5.6	Polyubiquitin (<i>A. thaliana</i>)
BE704442	3D2	Plant	-6.7	Cytochrome c oxidase subunit 6b-1 (<i>O. sativa</i>)
BE704427	12D8	Fungus	-9.0	Ring-box protein 1 (<i>Homo sapiens</i>)
AW731617	7A4	Fungus	-12.1	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8 (<i>S. pombe</i>)
BE704428	9A3	Fungus	-12.8	NIPSNAP1 (<i>Mus musculus</i>)
BE704439	12D4	Plant	-16.3	Zn-binding protein (<i>A. thaliana</i>)
BE704429	5C9	Fungus	-24.1	Rah1/Rad51 (<i>Coprinus cinereus</i>)

^aRatio for normalized hybridization values of transcripts expressed in the symbiotic tissues and in the free-living partners.

^bBest database match (and corresponding species) obtained with a WU-BLASTX search at the Baylor College of Medicine Web server (Worley *et al.*, 1998).

Only clones that produced a readable sequence are given.

(SEND32, LTI6B) is in agreement with the previously observed degradation of plant proteins induced by mycorrhiza development (Burgess *et al.*, 1995; Hilbert *et al.*, 1991).

Within the known genes with a down-regulated expression, such as a Zn-binding protein (clone 12D4), polyubiquitin (clone 12C3), ATP synthase (δ chain) (clone 7E5) and metallothioneins (clones 8A5 and *EgPtdB13*), were several plant genes. Remarkably, about one-third of the differentially expressed genes have no apparent homology to any gene whose function is known.

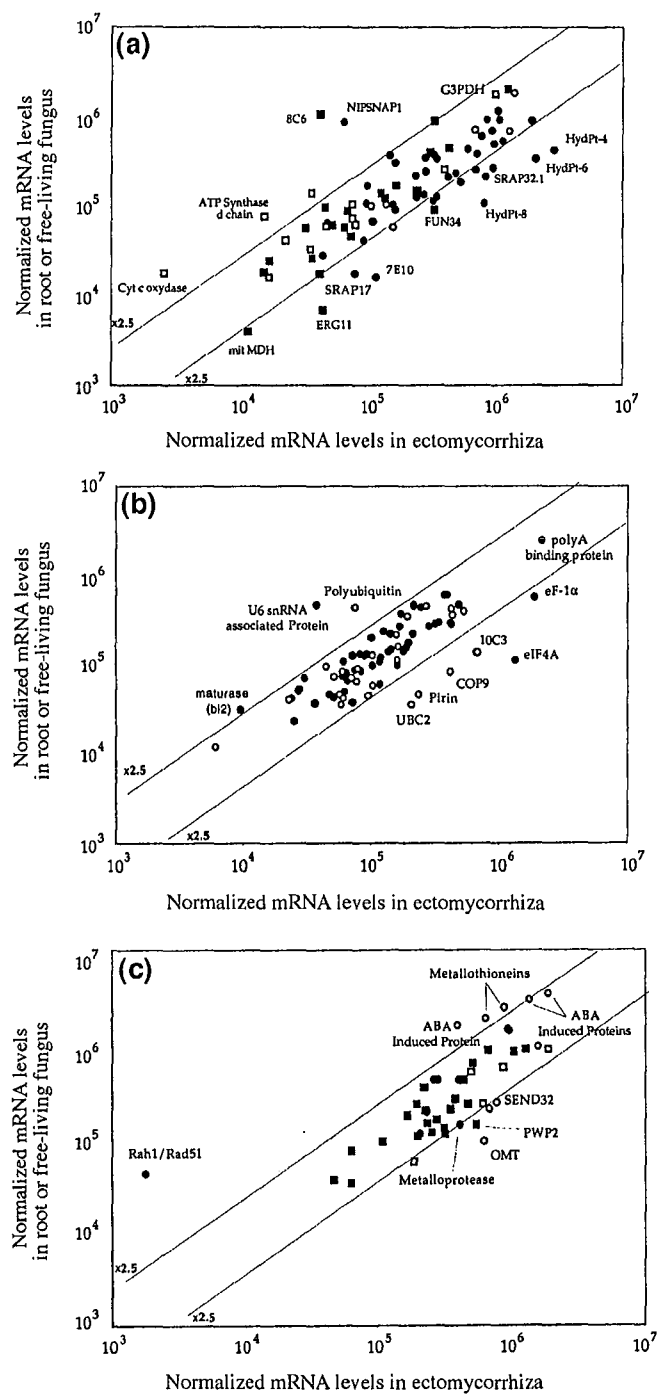
Discussion

It is increasingly clear that developmental pathways leading to the ectomycorrhizal symbiosis can be considered as modular, and that developmental transitions are accompanied by global changes in the expression of specific complements of genes (Martin and Tagu, 1999; Smith and Read, 1997). Hybridization to arrayed cDNA libraries permits simultaneous analysis of the level of thousands of transcripts (Desprez *et al.*, 1998; Eisen *et al.*, 1998). In the present study, systematic sequencing of cDNA clones, SSH and cDNA mini-arrays were used to study the relative abundance of transcripts corresponding to sets of clones in the free-living *P. tinctorius* and *E. globulus*, and in the ectomycorrhizal symbiosis 4 days after contact. This investigation provided insights into the global gene activities involved in ectomycorrhiza development and function. About 17% of the genes represented by the arrayed ESTs displayed ≥ 2.5 -fold differential expression during symbiosis morphogenesis. This may be a conservative estimate of the percentage of *E. globulus* and *P. tinctorius* genes that change in expression level during early symbiosis development, because of the stringent criteria used for their selection. A striking result of the current data is the fact that all genes investigated are common to the non-symbiotic and symbiotic stages. At the developmental

stage studied, symbiosis development does not induce the expression of ectomycorrhiza-specific genes, but a marked change in gene expression in the partners. The highest increased expression detected was for the translation-initiation factor *elF4A* gene from the mycobiont. *elF4A* is both a subunit of a high molecular-weight protein complex involved in *m*³G cap recognition, and is required as a single polypeptide chain for mRNA binding to ribosome (Fischli *et al.*, 1996). It is an ATP-dependent single-stranded RNA-binding protein with a sequence-independent unwinding activity (helicase), with similarity to other 'dead' box family helicases. In yeast, *elF4A* is essential for translation and cell growth (Dominguez *et al.*, 1999). Upregulation of *elF4A* and *tef1* suggests that gene expression is significantly regulated at the level of protein synthesis in the symbiosis through translation initiation. This is in agreement with the observed high density of transcripts (Carnero Diaz *et al.*, 1997) and ribosomes (Massicotte *et al.*, 1987), and changes observed in protein synthesis (Burgess *et al.*, 1995; Hilbert *et al.*, 1991) in *Eucalyptus-Pisolithus* ectomycorrhiza.

Within *SR* genes, a large set of sequences code for several members of the multi-gene SRAP32 (Laurent *et al.*, 1999) and hydrophobin (Tagu *et al.*, 1996) families. It appears that the expression of these proteins is strikingly upregulated (up to 4.7-fold) during mycorrhiza formation (Tables 1 and 2), confirming and extending our previous data. The array data reflect the relative abundance of the transcripts, which is influenced by both transcriptional activity and mRNA stability. It does not detect any regulation at the translational and post-translational levels. Comparing the upregulation of SRAP32 transcript levels and the increased concentration of SRAP32 polypeptides in ectomycorrhiza (Burgess *et al.*, 1995; Hilbert *et al.*, 1991; Laurent *et al.*, 1999) showed that there was a good correlation between changes in protein synthesis and transcript levels. The cell wall-related clones included two different members of the SRAP family (types I having 80–

Figure 2. Expression profiling of free-living *Pisolithus tinctorius*, non-mycorrhizal roots of *Eucalyptus globulus* and 4-day-old ectomycorrhizas displayed in major functional categories. (a) Metabolism (■, fungus; □, plant) and cell structure (●, fungus; ○, plant); (b) gene/protein expression (●, fungus; ○, plant); and (c) cell signalling (■, fungus; □, plant) and defence/stress (●, fungus; ○, plant). Solid lines indicate 2.5-fold expression differences between free-living partners and symbiotic tissues.



100% homology with SRAP32-1 and type II genes having 50% homology with the generic SRAP32-1; Laurent *et al.*, 1999). Another fungal-specific protein family identified by

SSH and cDNA array analyses is the cysteine-rich hydrophobins (Kershaw and Talbot, 1998). A previous study (Tagu *et al.*, 1996) has identified two different hydrophobin

transcripts in ectomycorrhiza, *HydPt-1* and *HydPt-2*. Here we have identified additional hydrophobin genes, *HydPt-3* to *HydPt-8*, which show 47–52% homology with other *P. tinctorius* hydrophobins (unpublished results). The expression of *5B9*, *5E4* and *7C2*, which are coding for various paralogues of *HydPt-2*, is increased six- to eightfold in the symbiotic tissues (Table 2; Figure 2). Eucalypt ectomycorrhizas are often found in air pockets in soil in the wild. Such mycorrhizas formed in air are invariably non-wettable and water-repellent (Vesk *et al.*, 2000). The most likely explanation for this lies in the observed deposition of hydrophobins. Thus it appears that *P. tinctorius* hyphae preferentially express some sets of structural proteins in the wall during the formation of the symbiosis, confirming that for fungi interacting with plants the cell wall and its surface are major players in the host–symbiont interface (Hardham and Mitchell, 1998; Martin *et al.*, 1999). The concerted induction of these structural proteins implies tight control of expression among genes with potentially related functions, and opens the door for comparative studies using the conserved elements in the regulatory regions of these genes. Within the structural proteins coded by *SR* genes are proteins involved in membrane synthesis and function: the transmembrane FUN34 protein, ERG6 and ERG11. This supports an earlier report (Kotke and Oberwinkler, 1990) suggesting that symbiosis development leads to an increased membrane formation.

Several genes with a putative function in signal transduction are highly expressed and upregulated in symbiotic tissues; they represent ≈13% of the cloned genes. These include genes with homology to calmodulin, *ras*, heterotrimeric GTPases, and protein kinases (MAPKKK, MAPK). The expression of the *P. tinctorius* homologue (ud283) of the PWP2 family of WD-repeat proteins involved in yeast cell separation (Shafaatian *et al.*, 1996) is upregulated during mycorrhiza formation (Table 2).

The increased accumulation of an elicitor-inducible isoflavone 7-*O*-methyltransferase (He *et al.*, 1998) and stress-inducible proteins (LT16B, SEND32) confirmed that a transient increase in plant defence/stress responses is mounted in eucalypt roots to control fungal ingress (Feugey *et al.*, 1999). Several of the plant-regulated genes showed a decreased expression in ectomycorrhizal tissues (e.g. metallothionein; ATP synthase; cytochrome *c* oxidase; Zn-binding protein), confirming previous results that the symbiosis formation induces downregulation of protein synthesis in colonized roots (Burgess *et al.*, 1995; Hilbert *et al.*, 1991). Degradation of these proteins probably involved the ubiquitin/proteasome pathway, explaining the increased expression of plant ubiquitin-conjugating enzymes (clones 6E3 and 6C7).

Taken together, our results demonstrate the utility of ESTs, SSH and cDNA arrays in determining the major

changes taking place during symbiosis development. This glimpse into the complex ectomycorrhiza gene expression will provide the basis for a more precise molecular dissection of the complex genetic networks that control symbiosis development and function. The identified *SR* genes might be especially interesting targets for ongoing gene disruption technology. Further studies are now needed to delineate the functions of both known and novel genes that are differentially expressed during ectomycorrhiza development.

Experimental procedures

Biological materials and synthesis of ectomycorrhizas

Seeds of *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* Kirkp. were sterilized with 20% calcium hypochlorite (v/v) for 20 min, rinsed with four changes of sterile water and plated onto low-sugar (5 mM) Pachlewski medium in 2.0% agar (Nehls *et al.*, 1998). After 7 days, aseptically germinated seedlings were laid onto the edge of 21-day-old fungal mats of the ectomycorrhizal gasteromycete *Pisolithus tinctorius* Coker & Couch (synonym *Pisolithus arhizus* (Scop. per Pers.) Rauschert), isolate 441, grown on low-sugar Pachlewski medium in 2.0% agar, and left for 4 days in a controlled environment growth chamber with 16 h light (25°C, 150 µmol m⁻² s⁻¹) and 8 h dark (Hilbert *et al.*, 1991; Nehls *et al.*, 1998) for ectomycorrhiza formation. Non-inoculated and 4-day-old ectomycorrhizal seedlings, together with the edge of 25-day-old fungal mats, were then sampled, fixed in liquid N₂ and stored at –80°C.

Construction of a cDNA library of ectomycorrhiza

Total RNA was isolated from 4-day-old ectomycorrhizas according to Boiffin *et al.* (1998). The RNA source material for the library contained the primary root and lateral root tips, including the meristem and root-cap cells. Most roots were ensheathed by the ectomycorrhizal mantle with differentiated inner and outer layers (Figure 1 of Martin *et al.*, 1999). Formation of the Hartig net with hyphae growing antichinally between rhizodermal cells was initiated. Thus all the major plant and fungal cell types and processes related to the early stages of symbiosis were represented. At this stage, fungal transcripts represented ≈65% of total ectomycorrhiza RNA (Carnero Diaz *et al.*, 1997).

The cDNA library was constructed using the CapFinder cDNA library construction kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. This PCR-based method produces high-quality cDNA libraries containing a high proportion of full-length cDNA clones (Sasaki *et al.*, 1998). cDNAs were cloned into *EcoRI*-digested pBluescript and λgt11 to generate 1.6 × 10⁴ and 2.5 × 10⁵ recombinants, respectively. Sequence analysis revealed that 85% of the clones contained the initiation codon.

Suppression subtractive hybridization (SSH)

Doubled-stranded cDNAs corresponding to mRNAs expressed in *E. globulus*–*P. tinctorius* ectomycorrhizas after 4 days' contact (tester probe), and cDNAs from *E. globulus* roots and *P. tinctorius* free-living mycelium, were separately obtained by using the

SMART-PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech). The cDNAs from non-inoculated roots and free-living mycelium were pooled (driver probe) by taking into account the respective concentration of plant and fungal RNAs in 4-day-old mycorrhiza (35/65) (Carnero Diaz *et al.*, 1997). The tester cDNA pool was subtracted twice by the mixed-driver probe (SSH) following the manufacturer's instructions (PCR-Select cDNA Subtraction Kit, Clontech) (Diatchenko *et al.*, 1996). These subtracted cDNAs were labelled with digoxigenine by random priming and used for four screenings of the ectomycorrhiza cDNA library prepared in the λ gt11 according to manufacturer's instructions (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). Positive clones, referred to as EgPtdA, B, C or D, were purified by successive screenings, and inserts were amplified and subcloned in pCR4-TOPO (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). Bacterial clones were stored at -80°C in 35% glycerol.

Sequencing

Plasmid DNA from random or SSH clones was purified (Invitrogen SNAP Miniprep Kit) and sequenced. Sequencing was performed with the BigDye Terminator Cycle sequencing kit (PE Biosystems, Foster City, CA, USA). On the 940 sequencing reactions carried out, most were primed using the Clontech Capswitch primer used to construct the library, and thus read from the m3G cap into the 5' end of each cDNA. The sequencing reaction products were analysed using either a ABI 373S DNA sequencer at the sequencing facilities of Laval University (Quebec City, Canada), or an ABI Genotyper 310 at INRA-Nancy, France. Raw sequence data were edited using the SEQUENCE ANALYSIS (version 3.3) (PE Biosystems) or SEQUENCHER (version 3.1.1) (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) programs for Macintosh. All sequence outputs obtained from the automated sequencers were scanned visually to confirm overall quality of peak shape and correspondence with base calls. Leading and trailing vector and polylinker sequences, and sequences with more than 3% ambiguous base calls were removed by SEQUENCHER filters. Sequences shorter than 100 bp were not further analysed. Group of sequences were assembled into clusters using the contig routine of SEQUENCHER.

Homology comparisons and database construction

Nucleotide and protein searches were performed by batch processing using BLASTN AND WU-BLASTX against the non-redundant nucleic acid sequence GenBank database at the Baylor College of Medicine Web server, using the MACPERL script Macsearch-launcher (version 2.6) (Worley *et al.*, 1998). Sequences with a P value $\geq 10^{-5}$ were considered to identify known genes or have partial homology to known genes. Although the BLAST scores and P values were considered, the assessment of whether a given homology was significant was determined by investigator judgement, not by absolute numerical cut-offs.

The entire collection of edited ESTs and homology comparisons have been organized into an online database that is accessible via the Web at <http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>. Homologues are listed in functional categories according to the classification scheme utilized by the Expressed Gene Anatomy Database available at http://www.tigr.org/docs/tigr-scripts/egad_scripts/role_report.spl. In addition, all of the EST sequences have been deposited in dbEST at the National Center for Biotechnology Information (NCBI accession numbers AW600807-AW600908, AW731605-AW731617, BE704426-BE704449).

Southern blot hybridization

Genomic DNA from *P. tinctorius* and *E. globulus* was extracted as described by Guidet *et al.* (1990). Southern blotting of genes coding for proteins of the transduction pathways, the ubiquitin/proteasome pathway, and all *SR* genes was carried out on Hybond-N⁺ membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's instructions.

Production of cDNA arrays and hybridization conditions

Inserts of sequenced cDNA clones were amplified by PCR (95°C for 5 min, then 95°C for 1 min, 60°C for 30 sec, 72°C for 3 min for 30 cycles, and a final cycle at 72°C for 15 min) in 50 μl reaction volumes, using 10 μM of primers that were complementary to vector sequences flanking both sides of the cDNA inserts. PCR products (150–300 ng) were diluted in 200 μl 10 $\times$ SSC, denatured with NaOH (0.2 M final concentration) for 10 min, and spotted onto nylon membrane filters (8 $\times$ 12 cm) (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) using a Millipore 96-well dot-blot apparatus. The three sets of six arrayed filters, carrying a total of 560 cDNAs, were baked at 80°C for 1 h. Control clones were spotted at specific positions on the filter: pBluescript plasmid and amplified pBluescript polylinker to assess unspecific hybridization to the cloning vector; a cDNA for human desmin (kindly provided by T. Desprez, INRA-Versailles, France) as internal quantification standard; a number of ectomycorrhiza-regulated control genes having predictable expression patterns (*PtSRAP32-1*, *HydPt-1*, *HydPt-2*); and non-regulated *E. globulus* and *P. tinctorius* housekeeping genes (ribosomal proteins). Hybridization of the arrays with a ^{32}P -labelled probe corresponding to the vector polylinker region showed a relatively uniform signal intensities across individual membranes.

Total RNA was isolated from 4-day-old ectomycorrhizas, free-living *P. tinctorius* 441 and non-inoculated roots of *E. globulus* as described by Boiffin *et al.* (1998). Complex probes were then prepared by reverse transcription using SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and the SMART-PCR cDNA Synthesis Kit. Labelling of the cDNA probes was done in the presence of 30 μCi [^{32}P]dCTP and 30 μCi [^{32}P]dATP, and random hexamers using the Prime-a-Gene Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

The three sets of six arrayed filters were pre-incubated in a hybridization solution (0.6 M NaCl, 2 mM PIPES, 5 mM Na₂ EDTA, 10 $\times$ Denhardt's solution, 0.5% SDS, 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ shared salmon sperm DNA) for 4–8 h at 65°C . Then the filters were incubated in the same solution containing 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pBluescript, 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ polyA and the ^{32}P -labelled probe at 65°C for 24 h. The hybridized filters were washed successively for 3 $\times$ 5 min in 2 $\times$ SSC at room temperature, 1 $\times$ 40 min in 2 $\times$ SSC containing 0.1% SDS (65°C), 1 $\times$ 40 min in 1 $\times$ SSC containing 0.1% SDS (65°C), 1 $\times$ 40 min in 0.5 $\times$ SSC containing 0.1% SDS (65°C), and 1 $\times$ 40 min in 0.1 $\times$ SSC containing 0.1% SDS (65°C). Dry filters were then wrapped in plastic bags and exposed to a phosphor screen (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) for varying periods (1 h to 3 days), after which the imaging plate was scanned by Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at a maximum resolution of 50 μm per pixel.

Data analysis

The raw image data obtained with the phosphorimager imaging system were imported into an Apple Macintosh G3. Detection and

quantification of the signals representing hybridized DNA were performed using the volume quantification method of the QUANTITY ONE software (Bio-Rad). Each spot was defined by manual positioning of a grid of squares over the array image. For each image, the average pixel intensity within each square was determined. Local background value for each membrane was calculated on the basis of five positions with no DNA-spotted area. Net signal was determined by subtraction of this mean background from the intensity for each spot. Spots deemed unsuitable for accurate quantification because of array artefact were manually flagged and excluded from further analysis. The data table generated by QUANTITY ONE, containing the intensity of each of the spots, was then exported to the EXCEL 98 worksheet programme (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) for further manipulation. The probe-to-probe variance was filtered out using signal intensities of the human desmin spotted at six locations on the filters (interfilter normalization). In addition, to take account of experimental variations in specific activity of the cDNA probe preparations or exposure time that might alter the signal intensity, the data obtained from different hybridizations were normalized by dividing the intensity for each (fungal or plant) dot by the average of the intensities of all the (fungal or plant) dots present on the filter, to obtain a centred, normalized value (Eisen *et al.*, 1998). To determine the relative levels of plant and fungal transcripts in the intermingling mycorrhiza cDNA probe, the total intensity was determined for all the dots corresponding to either fungal or plant cDNAs hybridized with the mycorrhiza cDNA probe. Based on these values, the proportion of fungal transcripts in 4-day-old ectomycorrhiza was 65% of the total symbiosis transcripts, in agreement with our previous measurements carried out using the rDNA internal transcribed spacers (Carnero Diaz *et al.*, 1997). All the expression data are available at the EctomycorrhizaDB web site (<http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAbases/EctomycorrhizaDB.html>).

To determine the reproducibility of hybridizations in which RNAs are present at a wide range of concentrations, we hybridized three copies of a filter arrayed using cDNAs coding for various components of the transduction pathways, *SR* genes (hydrophobins, SRAP32), and housekeeping genes (ribosomal proteins, elongation factors) with two labelled complex probes prepared from the same RNA fungal extract. The filter-to-filter variation was relatively small ($\pm 10\%$) (data not shown). To assess the variation due to sources other than the hybridization and reading steps, we hybridized samples independently prepared from two different fungal cultures grown in the same conditions. The sample-to-sample variation was slightly larger ($\pm 15\%$) than observed in the simple hybridization reproducibility experiments.

Acknowledgements

Catherine Voiblet and Sébastien Duplessis were supported by Doctoral Scholarships from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. We would like to thank Denis Tagu (INRA-Nancy) and Yves Brygoo (INRA-Versailles) for valuable discussions during the course of this study. We are grateful to Uwe Nehls and Murielle Mourer (INRA-Nancy) for obtaining some of the ESTs in the preliminary stage of this project. The assistance of Murielle Mourer in the preparation of plants and isolation of RNA for the construction of the library is acknowledged. Finally, many thanks to Luc Simon (University of Laval, Québec) and Christine Delaruelle (INRA-Nancy) for their dedicated assistance in sequencing, and Béatrice Palin (INRA-Nancy) for assistance in hybridizations. The present investigation was supported by grants from the Groupement de Recherches et

d'Étude des Génomes and the INRA (Action Transversale Microbiologie Fondamentale). The research utilized in part the DNA Sequencing Facilities at INRA-Nancy financed by the INRA and Région de Lorraine.

References

- Boiffin, V., Hodges, M., Galvez, S., Balestrini, R., Bonfante, P., Gadal, P. and Martin, F. (1998) Eucalypt NADP-dependent isocitrate dehydrogenase: cDNA cloning and expression in ectomycorrhiza. *Plant Physiol.* **117**, 939–948.
- Burgess, T., Laurent, P., Dell, B., Malajczuk, N. and Martin, F. (1995) Effect of the fungal isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhiza. *Planta*, **195**, 408–417.
- Carnero Diaz, M.E., Martin, F. and Tagu, D. (1996) Eucalypt α -tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. *Plant Mol. Biol.* **31**, 905–910.
- Carnero Diaz, M.E., Tagu, D. and Martin, F. (1997) Ribosomal DNA internal transcribed spacers to estimate the proportion of *Pisolithus tinctorius* and *Eucalyptus globulus* RNAs in ectomycorrhiza. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 840–843.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F.C., Campbell, A.P. *et al.* (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 6025–6030.
- Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M. and Höfte, H. (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.* **14**, 643–652.
- Dominguez, D., Altmann, M., Benz, J., Baumann, U. and Trachsel, H. (1999) Interaction of translation initiation factor eIF4G with eIF4A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**, 26720–26726.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 14863–14868.
- Feugey, L., Strullu, D.G., Poupard, P. and Simoneau, P. (1999) Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. *New Phytol.* **144**, 541–547.
- Fischli, A., Schmid, S.R., Coppolecchia, R. and Linder, P. (1996) The translation initiation factor eIF4A from *Schizosaccharomyces pombe* is closely related to its mammalian counterpart. *Yeast*, **12**, 977–981.
- Guidet, F., Rogowsky, P. and Langridge, P. (1990) A rapid method of preparing megabase plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **18**, 4955–4957.
- Györgyey, J., Vaubert, D., Jiménez-Zurdo, J.I., Charon, C., Troussard, L., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. (2000) Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **13**, 62–71.
- Hardham, A.R. and Mitchell, H.J. (1998) Use of molecular cytology to study the structure and biology of phytopathogenic and mycorrhizal fungi. *Fungal Genet. Biol.* **24**, 252–284.
- He, X.Z., Reddy, J.T. and Dixon, R.A. (1998) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* **36**, 43–54.
- Hervé, C., Perret, E., Trémouyague, D. and Lescure, B. (1996) Differential screening using high density filters reveals a dramatic change in gene expression at different growth phase in *Arabidopsis* cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 425–430.
- Hilbert, J.L., Costa, G. and Martín, F. (1991) Ectomycorrhizal

- synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiol.* **97**, 977–984.
- Höfte, H., Desprez, T., Amselem, J. *et al.* (1993) An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **4**, 1051–1061.
- Kershaw, M.J. and Talbot, N.J. (1998) Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **23**, 18–33.
- Kim, S.J., Bernreuther, D., Thumm, M. and Podila, G.K. (1999) *LB-AUT7*, a novel symbiosis-regulated gene from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis. *J. Bac.* **181**, 1963–1967.
- Kottke, I. and Oberwinkler, F. (1990) Amplification of root–fungus interface in ectomycorrhizae by Hartig net architecture. *Ann. Sci. For.* **46**, 737s–740s.
- Laurent, P., Voiblet, C., Tagu, D. *et al.* (1999) A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **12**, 862–871.
- Martin, F. and Hilbert, J.L. (1991) Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. *Experientia*, **47**, 321–331.
- Martin, F. and Tagu, D. (1999) Developmental biology of a plant–fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. In *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology* (Varma, A.K. and Hock, B., eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 51–73.
- Martin, F., Lapeyrie, F. and Tagu, D. (1997) *Altered Gene Expression during Ectomycorrhiza Development In the Mycota*, Vol. VI. Plant Relationships (Lemke, P. and Carroll, G., eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 223–242.
- Martin, F., Laurent, P., De Carvalho, D., Voiblet, C., Balestrini, R., Bonfante, P. and Tagu, D. (1999) Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: Identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genet. Biol.* **27**, 161–174.
- Massicotte, H.B., Peterson, R.L., Ackerley, C.A. and Ashford, A.E. (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Can. J. Bot.* **65**, 1940–1947.
- Nehls, U., Béguiristain, T., Ditengou, F., Lapeyrie, F. and Martin, F. (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta*, **207**, 296–302.
- Nehls, U., Mikolajewski, S., Ecker, M. and Hampp, R. (1999) Identification and expression-analysis of two fungal cDNAs regulated by ectomycorrhiza and fruit body formation. *New Phytol.* **144**, 195–202.
- Newman, T., De Bruijn, F.J., Green, P. *et al.* (1994) Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**, 1241–1255.
- Peterson, R.L. and Bonfante, P. (1994) Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant Soil*, **159**, 79–88.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. and Farmer, E.E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding. *Plant Cell*, **12**, 707–719.
- Sasaki, N., Nagaoka, S., Itoh, M. *et al.* (1998) Characterization of gene expression in mouse blastocyst using single-pass sequencing of 3995 clones. *Genomics*, **49**, 167–179.
- Shafaatian, R., Payton, M.A. and Reid, J.D. (1996) PWP2, a member of the WD-repeat family of proteins, is an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cell separation. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 101–114.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467–470.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O. and Davis, R.W. (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 10614–10619.
- Smith, S.E. and Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. London: Academic Press.
- Tagu, D., Nasse, B. and Martin, F. (1996) Cloning and characterization of hydrophobins encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene*, **168**, 93–97.
- Vesk, P.A., Ashford, A.E., Markovina, A.-L. and Allaway, W.G. (2000) Apoplastic barriers and their significance in the exodermis and sheath of *Eucalyptus pilularis*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas. *New Phytol.* **145**, 333–346.
- Weiss, M., Mikolajewski, S., Peipp, H., Schmitt, U., Schmidt, J., Wray, V. and Strack, D. (1997) Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. *Plant Physiol.* **114**, 15–27.
- Wodicka, L., Dong, H.L., Mittmann, M., Ho, M.H. and Lockhart, D.J. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotech.* **15**, 1359–1367.
- Worley, K.C., Culpepper, P.A., Wiase, B.A. and Smith, R.F. (1998) BEAUTY-X: enhanced BLAST searches for DNA queries. *Bioinformatics*, **14**, 890–891.
- Wright, D.P., Scholes, J.D., Read, D.J. and Rolfe, S.A. (2000) Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant Cell Env.* **23**, 39–49.

GenBank accession numbers AW600807–AW600908, AW731605–AW731617 and BE704426–BE704449.

Supplementary Material

A table entitled: 'Highly abundant transcripts in *Eucalyptus globulus*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza, free-living mycelium and non-mycorrhizal roots', the EST sequences and the WU-BLASTX files are available at <http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAdatabases/EctomycorrhizaDB.html/>.

cDNA array analysis of ectomycorrhiza development

Manuscrit en préparation

cDNA Array Analysis of Ectomycorrhiza Development

Sébastien DUPLESSIS & Francis MARTIN¹

Unité Mixte de Recherche INRA/UHP 1136 "Interactions Arbres/Microorganismes", Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches de Nancy, 54280 Champenoux, France

Received 00 July 2000

Running title: Gene Expression during Ectomycorrhiza Development

Accession numbers:

* For correspondence (Fax +33 383 39 40 69; e-mail: fmartin@nancy.inra.fr).

Summary

Development of ectomycorrhiza induces transcriptional reprogramming in the fungal and plant symbionts. We monitored changes in gene expression in *Eucalyptus globulus*/*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza during the different stages of the symbiosis development using cDNAs macroarrays. Comparisons of signals from free-living partners and symbiotic tissues revealed significant differences in the expression levels (differential expression ratio > 2.5) for 17% to 24% of the genes analyzed depending on the development stages. We derived groups of coordinately expressed genes (i.e. regulons) using hierarchical clustering and Self organizing Maps. At least a dozen of distinct temporal patterns of induction/repression were observed. The main fungal regulons contained genes coding for cell-wall and membrane proteins, communication genes, and metallothionein-related proteins. In the host root, a major down-regulated regulon comprised genes involved in water transport and stress suggesting that mycorrhiza development improves water uptake. Genes coding for mitochondrial respiration and protein translation were up-regulated. The temporal expression pattern provided clues to potential functions of several of previously uncharacterized genes (e.g. SRAP17).

Key words: cDNA arrays; cell wall proteins; ectomycorrhiza; expressed sequence tags; suppression subtractive hybridization; symbiosis-regulated genes

INTRODUCTION

Ectomycorrhizas are characterized structurally by (i) the presence of an extensive extramatrical mycelial web prospecting the soil and gathering nutrients, (ii) a mantle of fungal hyphæ ensheating the root and mainly acting as a storage compartment, and (iii) a network of hyphæ growing in the apoplastic space of the rhizodermis (in angiosperms) and cortex (in conifers) root cells so-called Hartig net. The fungus gains access to sugars from the plant while plant nutrient uptake is mediated via the fungus. In addition, the establishment of the symbiosis is requested for the completion of the fungal life cycle (i.e., formation of fruiting bodies). The formation of the symbiosis requires several days and induces major morphological changes including a novel spatial tissue organization, changes in cell shape, and the generation of different cell types (Köttke & Oberwinkler, 1987; Massicote et al., 1987). Differences in organogenetic programmes are reflected in variations in ectomycorrhizal root morphology, but overall there are pronounced developmental similarities suggesting that key developmental programmes are triggered in both symbionts. Symbiosis providing an additional layer of complexity to the challenge of designing experimental systems and framing questions, it was relatively difficult to study these primary genetic determinants. For many years, most physiological analyses were focused on limited sections of the complex metabolic networks taking place in the symbionts (Martin and Botton, 1993; Hampp *et al.*, 1995; Gianinazzi-Pearson, 1996; Harrison, 1998), which limited the degree to which symbiosis behavior can be understood. The comprehensive methods of analysis of functional genomics are now employed on a handful mycorrhizal associations at several levels: those of the genome, transcriptome, proteome, and metabolome. A surge of investigations based on these novel approaches have allowed to assess the development and functioning of endomycorrhizal and ectomycorrhizal symbioses on a larger scale (Harrison, 1999; Lapopin *et al.*, 1999; Voiblet *et al.*, 2001).

We have screened arrayed cDNAs to identify symbiosis-regulated genes in the *Eucalyptus globulus/Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza during the mantle formation (Voiblet et al., 2001). At this developmental stage, comparisons of gene expression in free-living partners and symbiotic tissues revealed significant differences in the expression levels for 17% of the genes analyzed. This analysis has identified roughly 65 symbiosis-regulated (SR) genes. No ectomycorrhiza-specific gene was detected. Ectomycorrhiza formation is characterized by at least five main developmental stages: the rhizospheric pre-infection, the root surface colonization and penetration, the fungal sheath aggregation, the intraradicular Hartig net formation and the metabolically active symbiosis. In this paper, we report on temporal patterns of gene regulation during the various stages of the *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* mycorrhiza organogenesis and demonstrate that groups of coordinately expressed genes (i.e. regulons) are expressed at the different stages.

RESULTS & DISCUSSION

Time sequence of the ectomycorrhizal development

The *in vitro* system used in this experiment for producing *Eucalyptus-Pisolithus* mycorrhizas (Fig. 1A) (Burgess et al, 1995; Burgess et al, 1996) was slightly different from the petri-dish techniques (Malajczuk et al, 1990) previously used to study protein synthesis (Hilbert et al, 1991) and gene expression (Voiblet et al, 2001). In particular, the seeds germinated and grew in the presence of the fungal mycelium and exudates. The *in vitro* system was designed to mimic events that occur in the rhizosphere. Seedlings germinated in the presence of fungal exudates and the two partners grew simultaneously with lateral tips being initiated in contact with mycelium. This system also avoided any related mechanical stresses. Seeds germinated 3-4 days after sterilization. By day 7 the tap roots were about 2 cm long and were in contact with the fungal mycelium. Both seedlings and fungus were actively growing, so that within 18-20 days the whole root system was in contact with the mycelium. After 4 days first emerging root tips (first order lateral) were observed. These root tips continued to emerge until 21 days after contact between symbionts. Over the time sequence this results in samples containing tips at different stages of development. By doing this we are in fact diminishing the chance of observing symbiosis-related changes in gene expression. We distinguished four stages in *E. globulus-P. tinctorius* mycorrhizal ontogenesis: preinfection (0 to 4 days), mantle formation (4 to 7 days), hartig net formation (7 to 15 days) and the mature mycorrhiza (15 to 28 days).

We sampled non-inoculated roots and ectomycorrhizal roots at 4, 7, 12, 15, 21 and 28 days after contact between roots and mycelium (Fig. 1). Free-living mycelium was collected from the edges of 15-day-old colonies. The content of ergosterol in inoculated roots was determined to assess the colonization of roots by the mycelium (Martin et al, 1990). Fungal content in colonized roots reached a maximum of 25% of the inoculated root fresh weight 4 days after contact (Fig. 1B).

Changes in gene expression during development

To examine gene-activity changes associated with the development of the *E. globulus/P. tinctorius* symbiosis, we performed large-scale expression profiling using cDNA arrays. We used total RNA isolated from six different symbiotic developmental stages in hybridizations with mRNA from noninoculated control plants on a DNA microarray with 715 ectomycorrhiza expressed sequence tags (ESTs). mRNA were derived from colonized roots collected 4, 7, 12, 15, 21 and 28 days after contact between the growing root tips and the edges of the fungal colonies (Fig. 1). Thus, these time points for RNA collection correspond to the various stages of ectomycorrhiza development: early hyphae-root contacts, root surface colonisation, mantle formation, root penetration and subsequent Hartig net

formation, and mature symbiotic organ. We required that ESTs included for analysis show differential expression equal to or greater than 2.0-fold in the two replicates. We found 79 (11%) to 164 (23%) ESTs to meet these criteria depending on the developmental stage examined. A comparison of the expression changes across these ESTs for each developmental step, based on the calculation of distance matrices, is shown in Fig. 2.

Cluster analysis defines groups of coregulated genes. We applied two commonly used algorithms to analyse gene expression profiles among the 715 ectomycorrhiza ESTs. A hierarchical clustergram of genes was grouped by both related regulation patterns and expression amplitudes (Eisen et al., 1998) (Fig. 2). 'Self-organizing maps' (SOMs) generate expression profiles organized by shape, essentially independent of amplitude (Tamayo et al., 1999). Enhanced clustergrams and enhanced SOMs listing all ESTs are available (Figs 2A and 2B, see <http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>). We found that genes assigned to key SOM clusters (Fig. 2 and Fig. 3) are also found in close proximity in the hierarchical clustergram, demonstrating that both algorithms generate consistent overall patterns. This is noted for SOMs c1 and c3, where SOM c1 corresponds in large part to the hierarchical cluster node highlighted in red in Fig. 2A. Similarly, ESTs in SOM c3 group closely together in the clustergram (green in Fig. 2A).

Cluster of Eucalyptus genes

As the upregulation of the genes coding for α -tubulin (*EgTubA1*) and EgHYPAR (hypaphorine- and auxin-regulated glutathione-S-transferase) are known SR-genes (Carnero-Diaz *et al.*, 1996; Nehls *et al.*, 1998), we analysed the cluster clade including these genes in detail (Figs 2A, top, SOM c1). It contains genes expressed strongly during most of the mycorrhiza formation, except the last stage analyzed (28 days). It contains the EST coding the O-methyltransferase (clone 8E9) identified in our previous cDNA array analysis of 4-day-old *E. globulus*-*P. tinctorius* mycorrhiza. Cellular functions upregulated by mycorrhiza formation includes: the mitochondrial respiration (ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c reductase, F(1)-F(0)ATPase), protein degradation and the ubiquitin/proteasome pathway (ubc2, SEND32, CROC1, serine carboxypeptidase), and protein translation (phenylalanine-tRNA synthetase, rpS16, 60SrpX, tef1, rpL15, rpS29, rpS4, rpL39, rpS5, rpS15a).

Other nodes in the *Eucalyptus* clustergram define regulons with different properties. For example, the node containing SOMc3 is composed of ESTs strongly repressed during the early and median stages of mycorrhiza formation. Among the 21 ESTs of SOM c3, aquaporins (TIP and MIP) and water stress-associated genes, abscisic-stress ripening proteins and water-stress induced gene, are abundantly represented (6 ESTs). A metallothionein (EgPtdC82) was also in this clade. The downregulation of these genes suggests that mycorrhiza formation facilitates, as expected, water transfer to the plant and thus relieves stresses experienced by the growing roots. Whether the water stress experienced by control seedlings is related to their growth on agar plates remains to be determined.

Because activation of the hydrophobin gene (*hydPt-2*) is a robust molecular marker for early symbiosis development (Tagu et al., 1996, Duplessis et al., 2001), we analysed the cluster including this gene in detail (Figs 2B, top). The *hydPt2* regulon in this SOM contains 48 ESTs (from a maximum of 16 different genes). These are candidate markers for symbiosis-related changes in membrane and cell wall and the encoded proteins likely function during symbiosis development. Several genes that clustered with *hydPt-2* (SRAP32 (32 kDa-symbiosis-regulated acidic polypeptides), SRAP17, transmembrane FUN34 protein) were represented on the arrays by multiple spots. Their nearly invariant clustering in the *hydPt-2* regulon demonstrates the internal consistency of our analysis. *HydPt-2* regulon members show a unique overall expression profile. They are strongly activated in the early stages of mycorrhiza development (4 and 7 days after contact) when the mantle formation was taking place. Moreover, these genes are moderately activated in the median stages of development (stages 12 and 15 days), and they are slightly downregulated in the mature mycorrhiza (stages 21 and 28 days). These regulon contains yet unknown genes coding for SR-cell wall proteins, such as proline-rich proteins (clones 10A10, 9C7, and 11A8), proteophosphoglycan (7A1 and 8E10, glycosyltransferase (8C5). Interestingly, it also contains other structural proteins: actin, tubulin and an homolog of the yeast transmembrane FUN34 protein.

Other nodes in the clustergram (Fig 3B) define regulons with different properties. For example, the node containing genes of the signalling pathways. Most of the genes presented a stable level of transcript during mycorrhiza development (*cpc2*, *Arf*, *Gpa*). In contrast, genes encoding different serine/threonine kinases (11C5, 9E6, 8A1) and a calcium-binding protein presented a stimulation during Hartig net formation and further, indicating that specific pathway could be switch-on at this stage.

The other cluster presented in Figure 3 concerns essentially genes encoding metal-binding cystein rich proteins (Fig. 3C). Alignments of the various sequences of 19 ESTs allowed us to distinguish 3 different groups (data not shown). One was closely related to a metallothionein gene described in *Agaricus bisporus*, and the two others were related to cystein-rich protein with metal-binding domain. It was quite interesting to notice that these 3 groups sharing a common biochemical function had different regulation patterns. This suggests that they probably have distinct cellular roles or are expressed in different fungal symbiotic tissues.

CONCLUSION

In conclusion, this investigation confirms and extends earlier results which found that changes in morphology associated with mycorrhizal development were accompanied by changes in transcript patterns (Voiblet et al., 2001) and that these changes commenced at the time of contact between the two partners long before the formation of functional ectomycorrhiza. Quantitative changes in

transcript profiles have been observed regardless of the system used for production of ectomycorrhiza (Voiblet et al., 2001; present study). The present experiment has elucidated the importance of coordination between development of mycorrhiza and the differential gene expression. Understanding the synchronization of these events is essential for understanding the determinants of compatibility and mycorrhiza ontogenesis. The temporal and spatial expression of SR-genes may be precisely attuned to the stage of mycorrhizal development. Major fungal SR-genes first appeared at contact and increased during mycorrhizal formation, suggesting a role in mycorrhizal development. Our data set has also uncovered regulons enriched in novel genes for future reverse-genetic experiments.

MATERIALS AND METHODS

cDNA clones and sequence analysis

A total of 715 expressed sequence tags (ESTs) were selected for spotting on cDNA array from a library of 4-day-old *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas (Voiblet et al., 2001). Nucleotide and protein searches were performed by batch processing using BLASTN and WU-BLASTX against the non-redundant nucleic acid sequence GenBank database at the Baylor College of Medicine Web server, using the MACPERL script Mac-search-launcher (version 2.6) (Worley et al., 1998). Thus, 107 ESTs were related to plant tissues and 608 ESTs to fungal mycelium based on sequence homology, hybridization net signal and southern blotting made for numerous genes in previous studies (Voiblet et al., 2001). A set of 248 ESTs remained to be sequenced (EST sequences ≤ 100 nt) and are annotated as "no seq" in some figures of this article. A set of 163 ESTs corresponded to unknown or hypothetical proteins (using a P -value cut-off of 10^{-5}). The other ESTs ($P \geq 10^{-5}$) were considered to identify known genes or have partial homology to known genes. Although the BLAST scores and P values were considered, the assessment of whether a given homology was significant was determined by investigator judgement, not by absolute numerical cut-offs. The entire collection of edited ESTs and homology comparisons have been organized into an online database that is accessible via the Web at <http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>.

Amplification of cDNA inserts and cDNA array preparation

The vectors used for library construction were λ gt11, pBluescript (Boehringer-Mannheim) and PCR4-TOPO (Invitrogen). Inserts of cDNA clones were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 10 μ M of primers that were complementary to vector sequences flanking both sides of the cDNA inserts (T3 & T7 primers). Plasmid templates (2 to 7 ng) were added to 50 μ l of a PCR reaction volume (Quantum Appligene). PCR was performed as follows: 95°C for 5 min, then 95°C for 1 min, 60°C for 30 sec, 72°C for 3 min for 30 cycles, and a final cycle at 72°C for 15 min. Quality and quantity of finished reaction were appreciated on a 0.7% agarose gel. PCR products (about 20-30 ng/ μ l) were arrayed from 384-well microtiter plates onto nitrocellulose filters (Eurogentec, Liège, Belgium) using the MicroGrid Robot (Biorobotics, Cambridge, UK). The 0.4 μ m tips deposited 500 nl of each PCR products two times with spacing of 500 μ m on 7x10 cm filters saturated with NaOH 0.1 M at a density

of 25 clones per cm². The nitrocellulose filters were washed and blocked according to the Eurogentec protocol.

Biological materials and ectomycorrhizas synthesis

We used an *in vitro* system previously described by Burgess *et al.* (1996) for another *Eucalyptus-Pisolithus* ectomycorrhiza. Large round Petri dishes (140 mm diameter, 20 mm deep) were partially filled with 50 ml of low-sugar (5 mM) Pachlewski medium in 2.0% agar. The agar was overlaid with washed, autoclaved cellophane discs. Hyphal plugs of 14-day-old mycelium of the gasteromycete *Pisolithus tinctorius* Cocker & Couch (synonym *Pisolithus arhizus* (Scop. Per Pers.) Rauschert), isolate 441, were placed 2.5 cm apart in 3 rows onto the cellophane. Fungal growth took place at 25°C in the dark for 10 days. Seeds of *Eucalyptus globulus* spp. *Bicostata* Kirp. were sterilized with 20% calcium hypochlorite (v/v) for 20 min, rinsed with four changes in sterile water and placed in a row 2 cm above the fungal hyphae. The Petri dishes were then slanted at 70° for 3 days in the dark at 25°C before being transferred to a controlled environment in growth chamber with 16 h light (25°C, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and 8h dark. Petri dishes of non-associated control mycelium and seedlings were manipulated identically. The ectomycorrhiza time-course development began when the contact between the germinating root of seedlings and the hyphae occurred (4 days in growth chamber). At 4, 7, 12, 15, 21 and 28-days-post-contact, root systems with colonizing hyphae (mantle at early stages, ectomycorrhizas at later stages) were sampled, fixed in liquid N₂ and stored at -80°C. About 50 colonized root systems (5 different Petri dishes) were sampled at each stages, and 15-day-old non-inoculated roots and fungal mats were sampled as control. Estimation of *P. tinctorius* mycelium content in ectomycorrhiza during time-course development was estimated according to Martin *et al.*, 1990.

RNA isolation, probe synthesis and cDNA array hybridization

Total RNA was isolated from ectomycorrhizas at the different stages, free-living *P. tinctorius* 441 and non-inoculated roots of *E. globulus* as described by Logemann *et al.* (1987). Complex probes were then prepared by reverse transcription using SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies) and the SMART-PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo alto, CA, USA). Labelling of the cDNA probes was done in the presence of 30 mCi [³³P]dCTP and 30 mCi [³³P]dATP, and random hexamers using the Prime-a-Gene Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The nitrocellulose filters were pre-incubated in 30 ml of a hybridization solution (5 X SSC solution, 10 X Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ shared salmon sperm DNA) for 4 h at 65°C. Then the filters were incubated in 10 ml of fresh hybridization solution containing 20 $\mu\text{g/ml}$ pBluescript, 2 $\mu\text{g/ml}$ polyA oligonucleotide and the ³³P-labelled probe at 65°C for 22 h. The hybridized filters were washed successively for 3 x 5 min in 2 X SSC at room temperature, 2 x 20 min in 2 X SSC containing 0.5% SDS (65°C), 2 x 20 min in 1 X SSC containing 0.1% SDS (65°C) and 2 x 20 min in 0.1 X SSC containing 0.1% SDS (65°C). Filters were then wrapped in plastic bags and exposed to a phosphor screen (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) for varying periods (24 h to 5 days), after which the imaging

plate was scanned by Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at a maximum resolution of 50 μm per pixel.

Data analysis

The raw image data obtained with the phosphorimager imaging system were imported into an apple Macintosh G3. Detection and quantification of the signals representing hybridized DNA were performed using the volume quantification method of the QUANTITY ONE software (Bio-Rad). Each spot was defined by 384-spots-grid positioning over the array image. For each image, the average pixel intensity within each spot was determined. Spots deemed unsuitable for accurate quantification because of array artefact were manually flagged and excluded from further analysis. The data table generated by QUANTITY ONE, containing the intensity of each spot, was then exported to the EXCEL 98 worksheet programme (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) for further manipulation. Local background value for each membrane was calculated on the basis of 260 positions with no DNA-spotted area. Net signal was determined by subtraction of this mean background from the intensity for each spot. Spots that had an intensity of less than twofold that of the background had their intensity raised to the arbitrary value of 0.1. The probe-to-probe variance was filtered out using signal intensities of the human desmin (kindly provided by T. Desprez, INRA Versailles, France) spotted at eight locations on the filters and added to the complex probes prior to labelling procedure (300 pg per probe as determined in previous manipulation) as internal standard. In addition, to take account of experimental variations in specific activity of the cDNA probe preparations or exposure time that might alter the signal intensity, the data obtained from different hybridizations were normalized by dividing the intensity for each (fungal or plant) spot by the average of the intensities of all the (fungal or plant) spots present on the filter, to obtain a centered, normalized value (Eisen et al., 1998). All the expression data are available at the EctomycorrhizaDB web site (<http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAdatabases/EctomycorrhizaDB.html>). Multiple experiments were analyzed using Cluster and Treeview softwares (<http://rana.lbl.gov>). The Clusters and SOMs generated with these softwares are available at the EctomycorrhizaDB web site.

Quality control of the array

A number of quality control of the array and hybridization procedure were performed. We selected 16 *P. tinctorius* genes and 7 *E. globulus* genes known to be Symbiosis-Regulated or to be stable at early stages of ectomycorrhiza formation (Voiblet *et al.*, 2001) and placed them 2 to 4 times at different locations on the filters. We also placed hybridization control as pBluescript, polylinker of this plasmid, polyA and polyT oligonucleotides (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) and DNA-free PCR volume reaction at different locations. According to the multiple net signals measured, we estimated that the variations due to the arrayer on filters were about 6 % and that the average standard errors due to aspecific hybridization for SR- and house keeping-genes on each filter were from 10 to 20 % in the different treatments ($16,8 \pm 3.7\%$).

ACKNOWLEDGMENTS

Sébastien Duplessis was supported by a Doctoral Scholarship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. We would like to thank Denis Tagu (INRA-Nancy) for valuable discussions during the course of this study. We are grateful to Catherine Voiblet for her technical advices at the beginning of this project. The assistance of Marine Wasniewski and Natacha Steinwich in cDNA amplification and Jean-Luc Jany in ergosterol assays is acknowledged. We also greatly appreciated the technical support of Sofia Kotowski. Finally, many thanks to Christine Delaruelle (INRA-Nancy) for her dedicated assistance in sequencing and to Christian Herbé (INRA-Nancy) for Visual Basic Macros programming. The present investigation was supported by grants from the Groupement de Recherches et d'Etude des Génomes and the INRA (Action Transversale Microbiologie Fondamentale). The research utilized in part the DNA Sequencing Facilities at INRA-Nancy financed by the INRA and Région de Lorraine.

Figure 1: Photographs of the experimental system. (A) *Pisolithus tinctorius* free-living mycelium (top) ; *Eucalyptus globulus* non-inoculated roots (bottom) and two intermediate stages in ectomycorrhiza time-course development: mantle formation (7 days) and functioning symbiotic organ (28 days). (B) Estimation of *Pisolithus tinctorius* mycelium content in ectomycorrhizas during time-course development using ergosterol assay.

Figure 2: Hierarchical clustergrams of expression ratio corresponding to *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus tinctorius* genes during ectomycorrhiza development. Ratio of transcripts from 107 root genes (A) and 608 fungal genes (B) were clustered with the Cluster and Treeview softwares. The cluster results are shown here along with the name of each ESTs and the protein showing the best match. Time-course stages are given at the top of clustergrams. These clusters can be consulted on the web site <http://mycor.nancy.inra.fr>. ESTs anotated as 'no seq' were less than 100 bp. Ratio levels are indicated (bottom left).

Figure 3: Selected fungal clusters of genes involved in 3 different cellular function. *P. tinctorius* genes encoding structural proteins (A), signalling pathways components (B) and stress-response elements (C). In (C), the yellow, red and blue bars indicate ESTs sharing identical sequences. The Cluster results are shown here along with the name of each ESTs and the protein showing the best match. Time-course stages are given at the top of clustergrams. Ratio levels are indicated (bottom left).

LITERATURE CITED

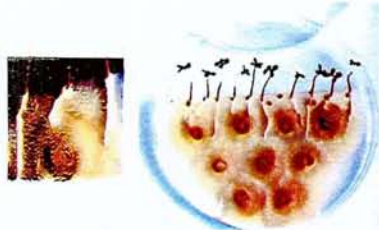
- Burgess T, Laurent P, Dell B, Malajczuk N, Martin F (1995) Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. *Planta* 195: 408-417.
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N (1996) In vitro synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhiza: synchronisation of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza* 6: 189-196.
- Carnero-Diaz E, Martin F, Tagu D (1996) Eucalypt α -tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. *Plant Mol. Biol.* 31, 905-910.
- Duplessis S, Tagu D, Martin F (2001) Living together underground: a molecular glimpse of the ectomycorrhizal symbiosis. In *Molecular biology of fungal development* (Osiewacz, ed.). Mycology Series, Dekker & Dekker, New York. In Press.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14863-14868.
- Gianinazzi-Pearson V (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8, 1871-1883.
- Hampp R, Schaeffer C (1995) Mycorrhiza—Carbohydrate and energy metabolism. In *Mycorrhiza, Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology* (Varma A K and Hock B, eds). Berlin: Springer-Verlag, pp 267-296.
- Harrison MJ (1998) Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 360-365.
- Harrison MJ (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 361-389
- Hilbert J-L, Costa G, Martin F (1991) Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiol.* 97, 977-984.
- Köttke I, Oberwinkler F (1987) The cellular structure of the Hartig net: coenocytic and transfer cell-like organization. *Nord. J. Bot.* 7, 85-95.
- Lapopin L, Gianinazzi-Pearson V, Franken P (1999) Comparative differential RNA display analysis of arbuscular mycorrhiza in *Pisum sativum* wild type and a mutant defective in late stage development. *Plant Mol. Biol.* 41:669-77.

- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 16-20.
- Malajczuk N, Lapeyrie F, Garbaye J (1990) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *New Phytol.* **114**, 627-631.
- Martin F, Delaruelle C, Hilbert J-L (1990) An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycol. Res.* **94**: 1059-1064.
- Martin F, Botton B (1993) Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. *Adv. Plant Pathol.* **9**, 83-102.
- Massicote H B, Peterson R L, Ackerley C A, Ashford A E (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Can. J. Bot.* **65**, 1940-1947.
- Nehls U, Béguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F, Martin F (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophane betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta* **207**, 296-302.
- Tagu D, Nasse B, Martin F (1996) Cloning and characterization of hydropobin-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* **168**, 93-97.
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR (1999) Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **16**:2907-12.
- Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant J.* **25**(3): 1-12.
- Worley KC, Culpepper PA, Wiese BA, Smith RF (1998) BEAUTY-X: enhanced BLAST searches for DNA queries. *Bioinformatics* **14**: 890-891.

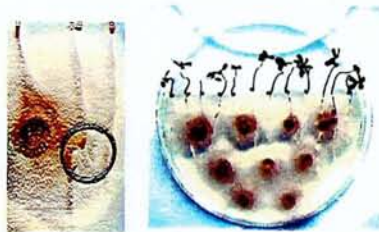
(A)



Pisolithus tinctorius



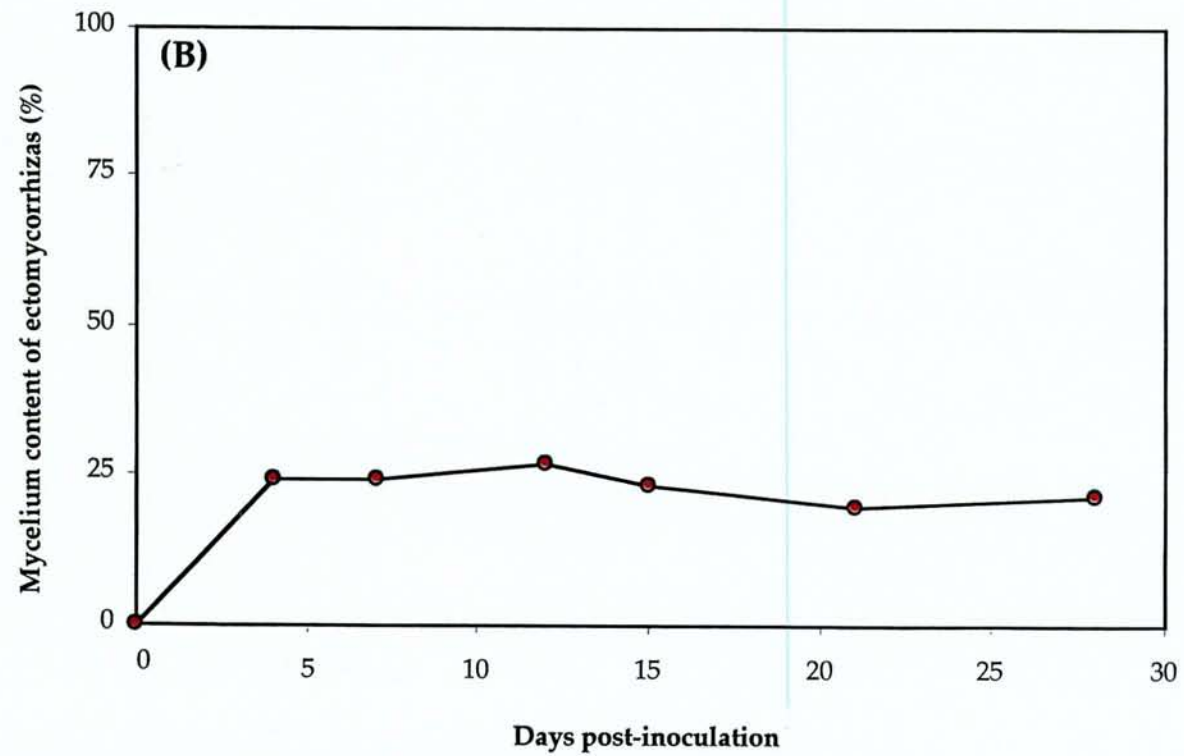
7-day-old
ectomycorrhizas



28-day-old
ectomycorrhizas



Eucalyptus globulus



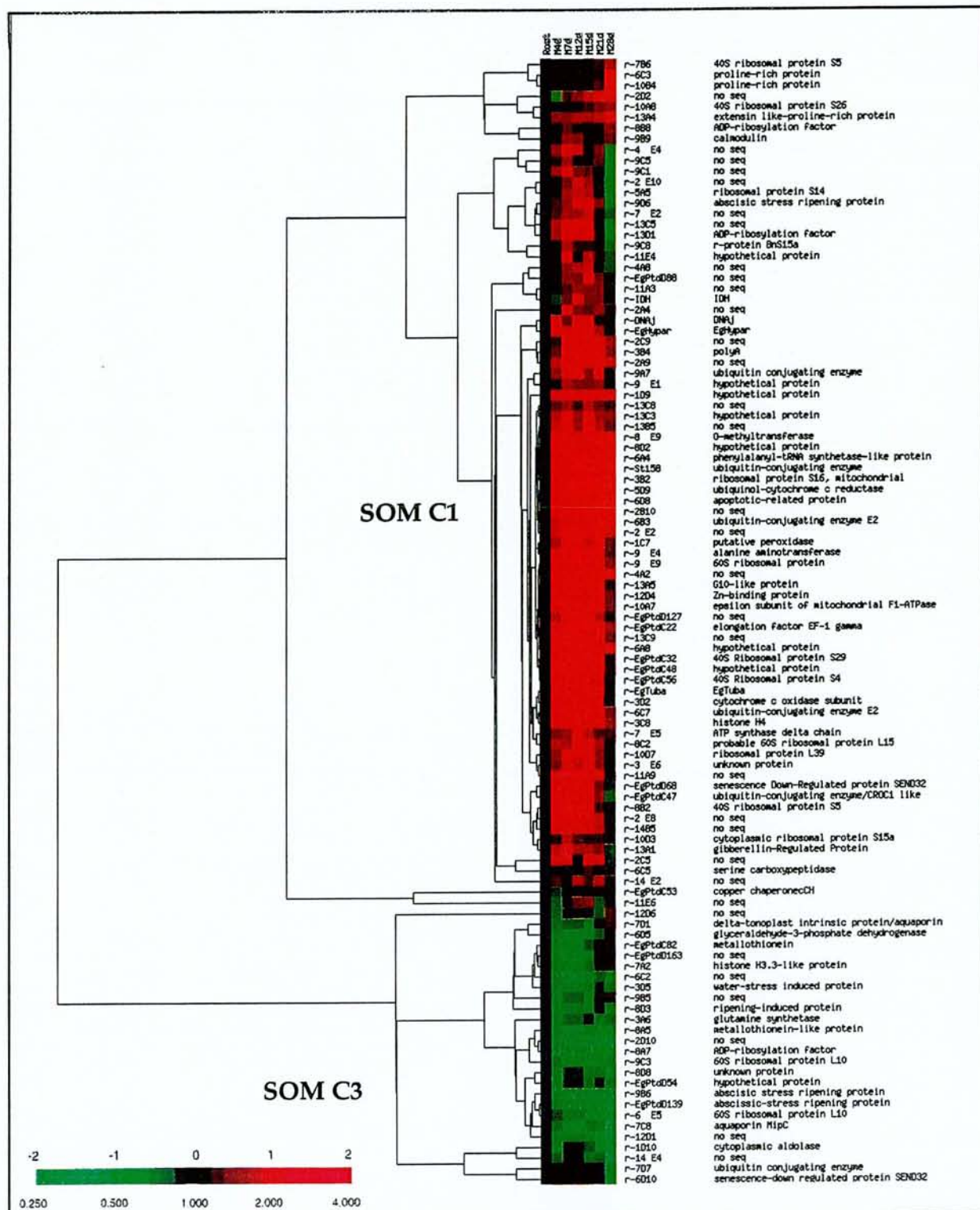
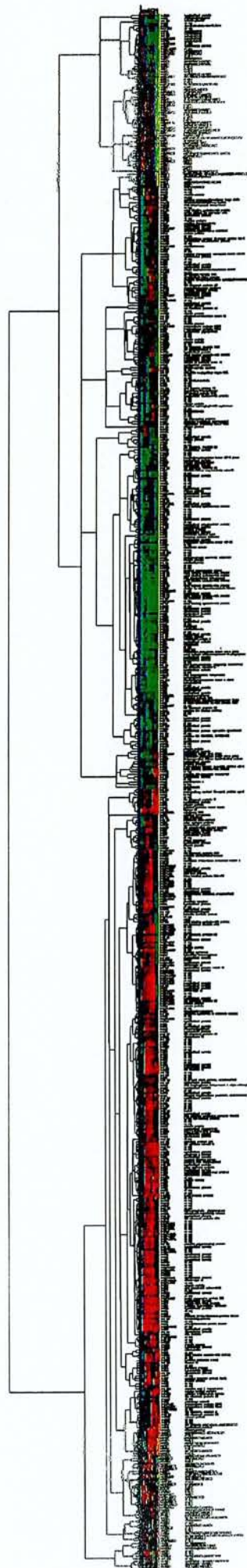


Figure 2A. Duplessis & Martin, 2001



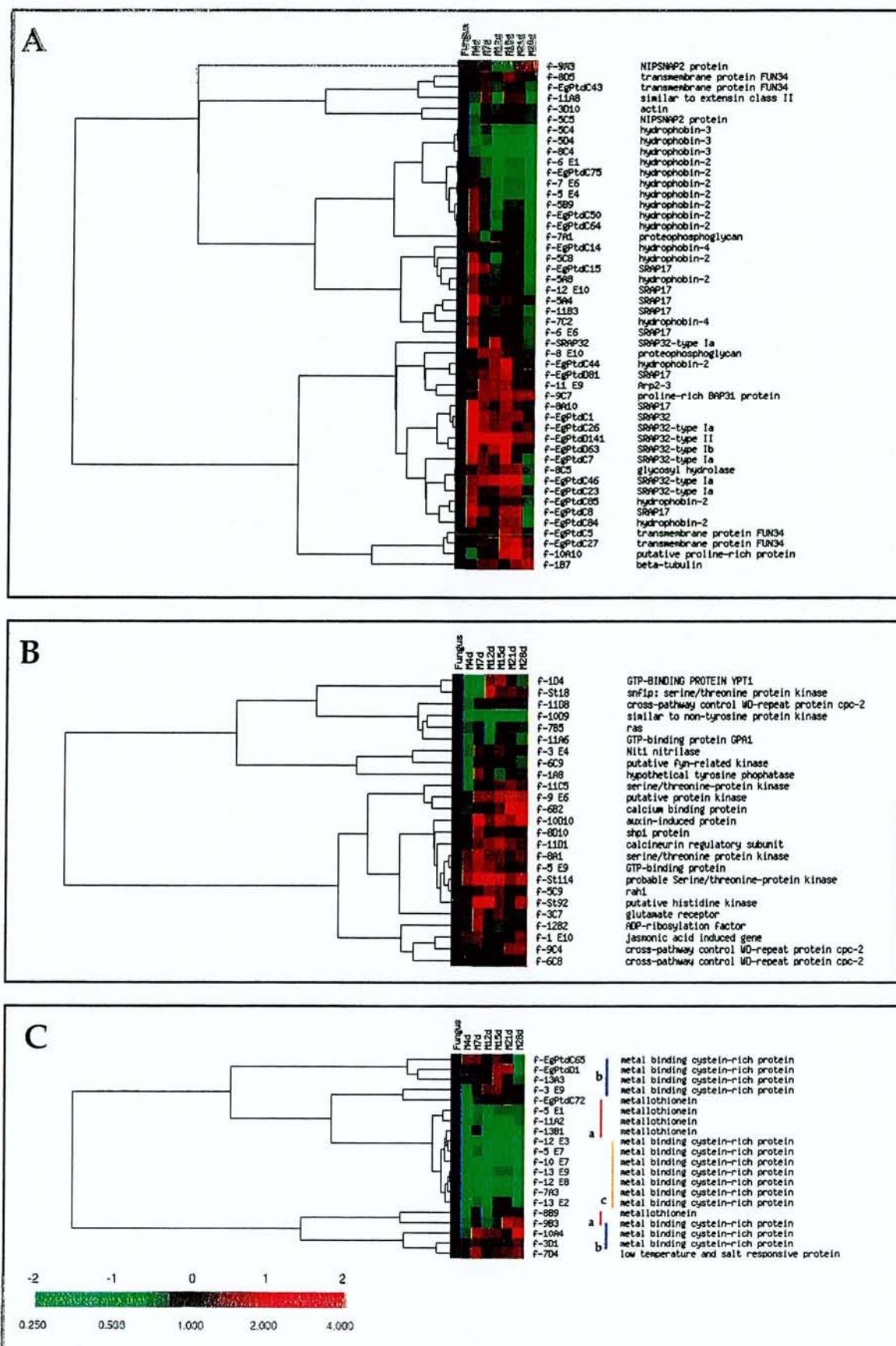


Figure 3. Duplessis & Martin, 2001

Chapitre 3

Clonage et analyse de l'expression de l'ADNc HydPt-3 codant
une nouvelle hydrophobine de *Pisolithus tinctorius*.

Clonage et analyse de l'expression de l'ADNc *HydPt-3* codant une nouvelle hydrophobine de *Pisolithus tinctorius*.

L'approche de génomique fonctionnelle nous a permis d'identifier des fonctions cellulaires particulièrement affectées par le processus symbiotique. L'une de ces fonctions correspond à la synthèse et la structuration des parois fongiques. En effet, le passage d'hyphes libres dans le milieu, à des hyphes différenciées formant le manteau et le réseau de Hartig, induit des modifications morphologiques et biochimiques importantes des parois (Tagu & Martin, 1996 ; Martin *et al.*, 1999).

Les hydrophobines - protéines fondamentales dans la biologie et la morphogénèse des hyphes des champignons filamenteux - sont très abondantes et particulièrement régulées lors de la formation de la symbiose ectomycorhizienne (Tagu *et al.*, 1996). Nous présentons dans ce chapitre, la caractérisation et l'étude de l'expression de l'ADNc *HydPt-3* : *Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete Pisolithus* (Duplessis *et al.*, 2001b ; article sous presse, revue Current Genetics).

Cloning and expression analysis of a new hydrophobin
cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete
Pisolithus

Publication n° 3

Sébastien Duplessis · Céline Sorin · Catherine Voiblet · Béatrice Palin ·

Francis Martin · Denis Tagu

Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*

S. Duplessis · C. Sorin · C. Voiblet · B. Palin · F. Martin · D. Tagu (✉)

I.N.R.A.

UMR INRA/UHP 1136, Interactions Arbres/Micro-Organismes (IaM)

Centre de Nancy

54280 Champenoux, France

email: tagu@nancy.inra.fr

Tel.: +33-383-394013

Fax: +33-383-394069

The GenBank accession number of the *hydPt-3* sequence is AF097516

Current Genetics

(Submitted 1st February 2001 ; Accepted 3rd May 2001 ; in press)

ABSTRACT

Hydrophobins are fungal cell wall proteins which play a crucial role in cell adhesion and aggregative processes. We have identified a new hydrophobin cDNA (*hydPt-3*) in the symbiotic mycelium of *Pisolithus tinctorius* (putative *P. albus*) during the formation of ectomycorrhizas with eucalypt roots. This sequence was highly divergent from two other previously identified *Pisolithus* symbiosis-regulated hydrophobins, *hydPt-1* and *hydPt-2*. Expression analyses demonstrated that *hydPt-3* was also up-regulated during ectomycorrhiza formation. In contrast to phytopathogenic fungi, changes in glucose or ammonium concentrations in the growth medium did not influence the accumulation of any *Pisolithus* hydrophobin mRNAs. This suggests that other factors act as regulators of hydrophobin gene expression in ectomycorrhiza.

Keywords: Cell wall · Nutrients · Root · Symbiosis · Tree.

Introduction

Hydrophobins are morphogenetic cell wall or excreted proteins involved in several aspects of fungal biological processes like aerial growth of the mycelium, aggregation of hyphae, host surface adhesion or desiccation tolerance (Wösten et al. 1999). Soluble hydrophobin monomers have the capacity to self-assemble at hydrophilic/hydrophobic interfaces (Wessels and de Vocht 2000). When self-assembly occurs at the surface of spores or hyphae, they become covered with an hydrophobic layer capable of physical interactions with adjacent hydrophobic substrates (for reviews see Wessels 1997, Kershaw and Talbot 1998). In several pathogenic interactions, fungal hydrophobins have been shown to be up-regulated and in some cases, even essential for plant surface colonization (Talbot et al. 1993). The regulation of hydrophobin gene expression is complex and vary from one species to another (Kershaw and Talbot 1998). In several pathogenic fungi, hydrophobin gene expression is however regulated *in vitro* by nutrient source availability (Talbot et al. 1993, St Leger et al. 1992, Segers et al. 1999) and sensing the level of nutrients in the substrate could be an important signal for the presence of a putative host, and could thus trigger expression of proteins involved in host surface recognition (van den Ackerveken et al. 1994).

Ectomycorrhiza is a mutualistic symbiosis between filamentous soil-born fungi and tree roots. In the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus* isolate 441 (putative *P. albus*), two hydrophobin cDNAs (*hydPt-1* and *hydPt-2*) were previously characterized (Tagu et al. 1996). They correspond to transcripts which are up-regulated during the early stages of differentiation of eucalypt symbiotic tissues. Their mRNAs are abundant (Voiblet et al. 2001) and the HYDPT-1 polypeptide is accumulated on the cell walls of the hyphae (Tagu et al. 2001). The function of hydrophobins in ectomycorrhiza is still unknown and these polypeptides may have several roles in mycorrhiza formation, such as binding the hyphae to the root surface, aggregation of hyphae or root cell penetration by fungal hyphae (Tagu et al. 1998). Whether any of these functions is fulfilled by one or several types of hydrophobins is unknown (Martin et al. 1999). Here we report the cloning of a new hydrophobin cDNA from *Pisolithus* (*hydPt-3*). We show that its expression was up-regulated during ectomycorrhiza formation. Changes in glucose or ammonium concentrations did not affect the steady state level of any of the three different hydrophobin transcripts in the mycelium. This indicates that drastic changes in trophic conditions experienced by the colonizing hyphae are not the main factors triggering the up-regulation of hydrophobin genes during the process of root colonization.

Materials and methods

Fungal strain and growth medium. The mycelium of *Pisolithus* isolate 441 (putative *P. albus*) (Bougher and Syme 1998) was maintained at 25 °C on modified Pachlewski's medium (containing 5.6 mM glucose and 5 mM NH₄⁺, 2% w/v agar) (Hilbert et al. 1991). This accession - 441 - was previously attributed to *P. tinctorius*, but recent phylogenetic analyses indicated that this isolate corresponds to the Australian species *P. albus* (Bougher and Syme 1998). Mycorrhizas were synthesized as described in Nehls et al. (1998a). Briefly, seedlings of *Eucalyptus globulus* were deposited at the surface of *Pisolithus* mycelium on modified Pachlewski's medium. Mycorrhiza were harvested after 1 or 6 days of contact, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C. In order to test the effect of glucose or ammonium concentrations, *Pisolithus* was grown on a cellophane membrane laid down agar plates on the modified Pachlewski's medium (5.6 mM glucose; 5 mM NH₄⁺) at 25 °C for 2 weeks. The

cellophane membrane carrying the mycelium was then transferred to a fresh modified Pachlewski's medium for 2 additional days. Then, the cellophane membranes were transferred again on the different media depleted or enriched in glucose and ammonium for 6 days at 25 °C, before harvesting. It is known from several independent studies performed on different ectomycorrhizal species that several days on depleted media are necessary to starve the mycelium (Littke et al. 1984; Kershaw and Stewart 1992; Nehls et al. 1998b). Four different combinations were tested: 5.6 mM glucose and 5 mM NH₄⁺ (control), 110 mM glucose and 5 mM NH₄⁺ (enriched in carbon), 0 mM glucose and 5 mM NH₄⁺ (depleted in carbon), 5.6 mM glucose and 0 mM NH₄⁺ (depleted in nitrogen).

DNA manipulation. New hydrophobin sequences were identified in our expressed sequence tags (ESTs) collection from *P. tinctorius* – *E. globulus* ectomycorrhiza (<http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>) (Voiblet et al. 2001). Hydrophobin EST sequences were analysed with the Blast 2.1 (blastx) programme (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) (Altschul et al. 1997). Double-strand DNA sequencing was performed on the new ESTs matching with known hydrophobins. Percentages of identity were determined with Basic Blast (blastp) using the HYDPt-3 predicted amino acid sequence as a reference. Sequence alignment and shading were performed with the freeware programme SeqApp (D.G. Gilbert, version 1.9a169 for MacIntosh computers, 1992).

Total DNA was extracted from the mycelium of *Pisolithus* 441 as described in Carnero Diaz et al. (1997) by following the protocol of Guidet et al. (1991). About 10 µg of total DNA was digested by different restriction enzymes overnight. Transfer to Nylon filters (Hybond N⁺, Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, UK) and hybridization were performed as described by the manufacturer. Briefly, hybridization was done overnight at 65 °C in 5x SSC, 5x Denhardt and 0.5% (w/v) SDS. Washes were performed at 65 °C for 1h in 2x SSC, 0.1% (w/v) SDS and for 1h in 1x SSC, 0.5% (w/v) SDS. The *hydPt-1*, *hydPt-2* and *hydPt-3* cDNAs were labelled with [α-³²P] dCTP by random priming, and were used at 10⁶ cpm per milliliter of hybridization solution. Filters were then exposed to a Phosphor-Imager screen (Kodak) and numerized in the Personal Molecular Imager fx by following manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

RNA manipulation. Total RNA from control mycelium, mycelia grown on different ammonium and glucose concentrations, non-colonized roots, and roots in contact with the mycelium for 1 or 6 days were extracted using the guanidinium method described in Logemann et al. (1987). About 5 to 10 μ g of RNA was separated on an agarose gel (1.5% w/v) by electrophoresis in a denaturing buffer containing formamide. The RNA was transferred to Hybond N⁺ filters and the membranes were hybridized with the probes labelled as described above. A PCR fragment containing the 5.8S rRNA from *Pisolithus* 441 was also used as a probe (Carnero Diaz et al. 1997). Hybridizations were performed at 42 °C overnight in 50% (v/v) formamide (Ruiz-Avila et al. 1991). The first wash was performed at room temperature for 20 min (2x SSPE, 0.1% (w/v) SDS) followed by two washes at 65 °C for 30 min (2x SSPE, 0.1% (w/v) SDS) and one wash at 65 °C for 30 min (1x SSPE, 0.1% (w/v) SDS). Hybridization signals were detected as described above and quantified by using the Quantity One programme (Bio-Rad). The signals obtained with the hydrophobin probes were standardized to the signals of the 5.8 S rRNA probe (Carnero Diaz et al. 1997). Three independent repetitions were done and the raw data submitted to one-factor analysis of variance (ANOVA): means were then compared by Bonferroni test. All the statistical analysis were done at the probability threshold of 0.05 with Statview program 4.02 (Abascus Concepts).

Results and Discussion

About 850 cDNAs were cloned and partially sequenced (ESTs) from *Pisolithus* — *Eucalyptus globulus* ectomycorrhiza (Tagu and Martin 1995; Voiblet et al. 2001). Three of these clones (5C4, 5D4 and 8C4) were identical in sequence and showed a significant degree of similarity with *Pisolithus* hydrophobin cDNAs. This new hydrophobin shared 52% and 54% identity at the amino acid level with *hydPt-1* and *hydPt-2*, respectively (Figure 1) and was referred as *hydPt-3*. It presented the same distribution of hydrophobic domains as the other *Pisolithus* hydrophobins (Martin et al. 1999). This sequence probably belongs to Class I hydrophobins (Wessels 1997). It encodes a 108 amino acid polypeptide containing eight cysteine residues (in bold in Fig. 1) at the conserved positions and a 17 amino acid N-terminal signal peptide (von Heijne 1983).

The copy numbers of the different hydrophobin genes were estimated by Southern blot of genomic DNA of *Pisolithus* 441. Under stringent conditions, the number of bands visualized on Fig. 2 indicated that each of the three hydrophobins were encoded by a single copy gene with perhaps related sequences in the genome. The mycelium of *Pisolithus* 441 being heterokaryotic, two alleles of each gene were probably detected. Effectively, several *hydPt* - 2 cDNAs differing by 1 to 2 changes in their amino acids sequences have been cloned from the *P. tinctorius* - *E. globulus* ectomycorrhiza cDNA library (Voiblet et al. 2001, Tagu unpublished).

The expression level of *hydPt-3* was determined during the formation of *E. globulus* ectomycorrhizas (Figure 3). The filter was co-hybridized with the *hydPt-3* cDNA and the 5.8S rRNA from *Pisolithus* in order to estimate the level of fungal RNAs in the symbiotic tissues (Carnero Diaz et al. 1997). Quantification of the hybridization signals indicated that *hydPt-3* mRNA accumulation was higher in the early stage of ectomycorrhiza formation (when hyphae colonize the root surface) than in later stages (when hyphae penetrate the root) or in vegetative hyphae. These data are similar to those obtained for *hydPt-1* and *hydPt-2* (Tagu et al. 1996), suggesting that these three genes are coregulated during ectomycorrhiza formation. The effectors and mechanisms leading to the up-regulation of these genes during root colonization are not known.

Several reports showed that up- or down-regulation of hydrophobin genes was controlled by the level of C or N sources (St. Leger et al., 1992; Talbot et al., 1993; Muñoz et al., 1997; Nakari-Setälä et al., 1997; Segers et al. 1999). When the ectomycorrhizal fungus reaches the root system and colonizes the root surface, it probably enters a zone depleted in nitrogen and enriched in carbon (Bakker et al. 1999; Lugtenberg et al. 1999). There is also probably a gradient of hexose concentrations from the external mantle (low content) to the apoplast of the Hartig net (5mM; Nehls et al. 2001). Thus, changes in nutrient levels could play a role in the triggering of hydrophobin expression in ectomycorrhiza. In order to test the effect of glucose and ammonium availability on the regulation of *Pisolithus* 441 hydrophobin gene expression, northern blot experiments were performed to estimate *hydPt-1*, *hydPt-2*, and *hydPt-3* mRNA accumulation on enriched or starved mycelia (Figure 4). Hybridization

signals of the hydrophobin transcripts were normalized with the 5.8S rRNA signals. No significant changes in *hydPt-1*, -2 and -3 transcripts were detected after ammonium or glucose starvation, or after a 20-fold increase of glucose concentration.

The absence of changes in hydrophobin mRNA accumulation under our experimental conditions indicates that ammonium and glucose concentrations are not essential regulators of hydrophobin gene expression. Thus, ectomycorrhizal fungi colonizing root tissues might have developed other strategies to sense the presence of a putative host surface. Other trophic or developmental effectors (in combination or not with ammonium and glucose) may thus be responsible for hydrophobin gene regulation in developing ectomycorrhizas.

Acknowledgements The authors would like to acknowledge Dr. Pascale Frey-Klett (INRA Nancy, UMR IaM) for her help in the statistical analyses of the data. This work was supported by «Groupement de Recherches et d'Etude des Génomes» and «Action Transversale INRA Microbiologie Fondamentale». SD and CV were supported by scholarships from the French «Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche et des Technologies». We greatly appreciated the technical support of Christine Delaruelle and Sofia Kotowski. Dr. Phil Murphy (Wye College, University of London) is kindly acknowledged for his expertise in Southern blot analysis.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl Acid Res 25:3398-3402
- Bakker MR, Dieffenbach A, Ranger J (1999) Soil solution chemistry in the rhizosphere of roots of sessile oak (*Quercus petraea*) as influenced by lime. Plant and Soil 209:209-216
- Bougher NL, Syme K (1998) Fungi of Southeastern Australia. Perth, Australia: University of Western Australia Press.
- Carnero Diaz E, Tagu D, Martin F (1997) Ribosomal DNA internal transcribed spacers to estimate the proportion of *Pisolithus tinctorius* and *Eucalyptus globulus* RNAs in ectomycorrhiza. Appl Environ Microbiol 63:840-843
- Guidet F, Rogowsky P, Taylor C, Weining S, Langridge P (1991) Cloning and characterisation of a new rye-specific repeat sequence. Genome 34: 81-87
- Hilbert JL, Costa G, Martin F (1991) Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. Plant Physiol 97:977-984
- Kershaw JL, Stewart GR (1992) Metabolism of ¹⁵N-labelled ammonium by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. Mycorrhiza 1:71-77
- Kershaw KJ, Talbot NJ (1998) Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. Fungal Genet Biol 23:18-33
- Littke WR, Bledsoe CS, Edmonds RL (1984) Nitrogen uptake and growth *in vitro* by *Hebeloma crustuliniforme* and other Pacific Northwest mycorrhizal fungi. Can J Bot 62:647-652
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal Biochem 163:16-20
- Lugtenberg BJJ, Kravchenko LV, Simons M (1999) Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. Environ Microbiol 1:439-446
- Martin F, Laurent P, de Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, Bonfante P, Tagu D (1999) Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. Fungal Genet Biol 27:161-174

- Muñoz G, Nakari-Setälä T, Agosin E, Penttilä M (1997) Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* 32:225-230
- Nakari-Setälä T, Aro N, Ilmén M, Muñoz G, Kalkkinen N, Penttilä M (1997) Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Eur J Biochem* 248:415-323
- Nehls U, Béguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F, Martin F (1998a) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta* 207:296-302
- Nehls U, Mikolajewski S, Magel E, Hampp R (2001) The role of carbohydrates in ectomycorrhizal functioning: gene expression and metabolic control. *New Phytol* in press
- Nehls U, Wiese J, Guttenberger M, Hampp R (1998b) Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:167-176
- Ruiz-Avila L, Ludevid MD, Puigdomènech P (1991) Differential expression of a hydroxyproline-rich cell-wall protein gene in embryonic tissues of *Zea mays* L. *Planta* 184:130-136
- Segers GC, Hamada W, Oliver RP, Spanu PD (1999) Isolation and characterization of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Gen Genet* 261:644-652
- St. Leger R, Staples R, Roberts DW (1992) Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 120:119-124
- Tagu D, De Bellis R, Balestrini R, de Vries OMH, Piccoli G, Stocchi V, Bonfante P, Martin F (2001) Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytol* 149:127-135
- Tagu D, Kottke I, Martin F (1998) Hydrophobins in ectomycorrhizal symbiosis: hypothesis. *Symbiosis* 25:5-18

- Tagu D, Martin F (1995) Expressed sequence tags of randomly selected cDNA clones from *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza. *Mol Plant-Microbe Interact* 8:781-783
- Tagu D, Nasse B, Martin F (1996) Cloning and characterization of hydrophobin-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* 168:93-97
- Talbot NJ, Ebbole DJ, Hamer JE (1993) Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5:1575-1590
- van den Ackerveken GFJM, Dunn RM, Cozijnsen AJ, Vossen JPJ, van den Broek HWJ, de Witt PJGM (1994) Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Gen Genet* 243:277-285
- von Heijne G (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 133:17-21
- Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus - Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant J* 25:181-192
- Wessels JGH (1997) Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microbial Physiol* 38:1-45
- Wessels JGH, de Vocht ML (2000) Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta* 1469:79-86
- Wösten HAB, Richter M, Willey JM (1999) Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. *Fungal Genet Biol* 27:153-160

Figure 1: Comparison of polypeptide sequences encoded by *Pisolithus* 441 hydrophobin cDNAs. Amino acid sequences were deduced from the cDNA sequences *hydPt-1*, *hydPt-2* (U29605, U29606) and the new *hydPt-3* (AF097516). The *hydPt-3* sequence corresponds to the EST 8C4 (Voiblet et al. 2001). Multiple sequence alignment was performed by the SeqApp freeware programme. Dots indicate amino acids shared with HYDPT-3 sequence. Shading shows identical amino acids in the three sequences, and hyphenations indicate gaps. Conserved cysteines are in bold.

Figure 2: Southern blot analysis of hydrophobin genes in *Pisolithus* 441. Total DNA (about 10 µg) extracted from the mycelium of *Pisolithus* 441 was digested by *EcoRI* (E), *PstI* (P), *XhoI* (X), *HindIII* (H), or *BamHI* (B), separated by gel electrophoresis, transferred to a Nylon filter and probed with *hydPt-1*, *hydPt-2* or *hydPt-3* ³²P-radiolabelled cDNAs. After washes under stringent conditions, hybridization signals were detected by the Personal Molecular Imager fx (Bio-Rad).

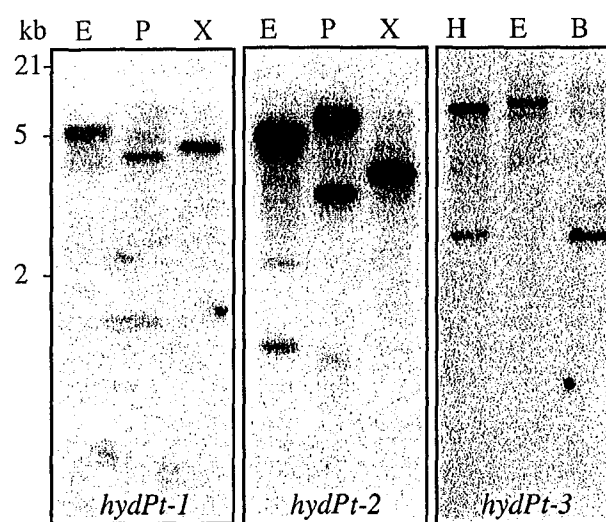
Figure 3: Steady state level of *hydPt-3* transcripts in ectomycorrhizas. Total RNAs (10 µg) extracted from non-colonized eucalypt roots (R), free-living mycelium of *Pisolithus* 441 (F) and roots in contact with the mycelium were probed with the *hydPt-3* cDNA and the ITS rDNA from *Pisolithus* 441. E: early stage of colonization. L: late stage of colonization. **A:** the gel was blotted onto a Nylon filter which was then hybridized with the *hydPt-3* cDNA and the ITS rDNA from *Pisolithus* 441. After several washes in stringent conditions, autoradiogrammes were obtained. **B:** for each sample the ratio of the signals obtained for the two probes was calculated and plotted (Carnero Diaz et al. 1997).

Figure 4: Effect of changes in ammonium and glucose concentrations in the medium on the accumulation of hydrophobin mRNAs in *Pisolithus* 441. Total RNA from free living hyphae of *Pisolithus* 441 grown on agar plates were extracted after 6 days of contact with different media enriched or depleted in glucose or ammonium. Northern blots were hybridized with the *hydPt-1*, *hydPt-2* or *hydPt-3* radiolabelled cDNAs and the rDNA ITS from *Pisolithus* 441. For each sample the ratio of the signals obtained for the *hydPt* and the ITS probes was

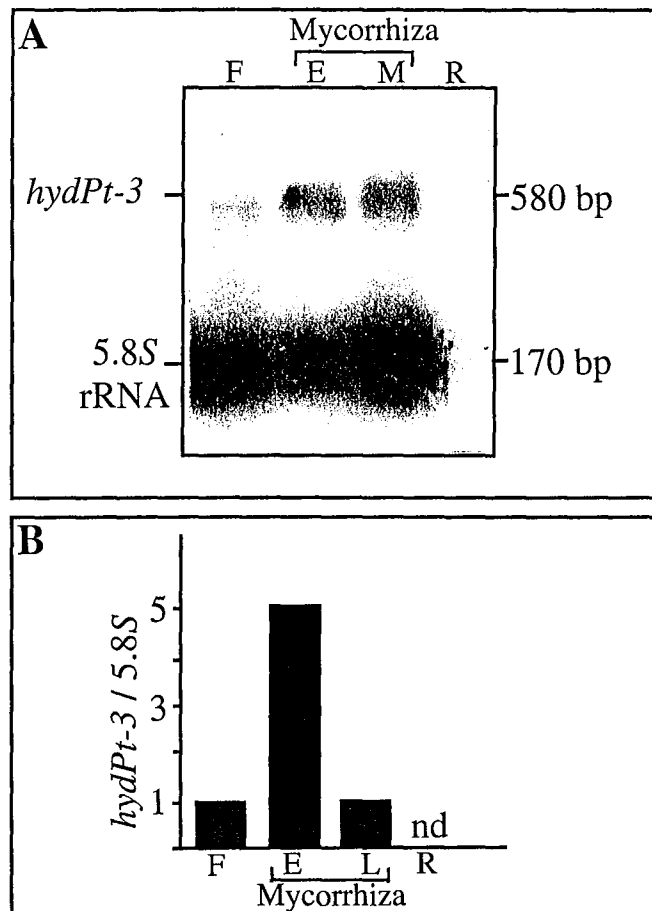
calculated and plotted (Carnero Diaz et al. 1997). The multiplicative factors (compared to the control condition) were calculated and are plotted.

	<u>5</u>	<u>15</u>	<u>25</u>	<u>35</u>	<u>45</u>
HYDPt-3	MFSRV - - - - F	AVASLAALAL	AGPLSVR - - -	- - - - -	- - D - - - - -
HYDPt-2	EIVSLSLSL	. . VP. VV. VI	 N. . G - -	- - - - - GT	PSQ - - - - -
HYDPt-1	. KFAAVVV. A	. A. AA. SAET	NAQRMA. . LP	PKAPIRRH. .	. A. TEKRSH
	<u>55</u>	<u>65</u>	<u>75</u>	<u>85</u>	<u>95</u>
HYDPt-3	- - - - - QCNT	GTIQCCQVQ	QASYQSAFQ	EIGLGELLAG	VTGQIGTQCS
HYDPt-2	- - - - -	. . P.	. T. DL. QFRS	SF. . VDA. . .	ASALV. AN. N
HYDPt-1	SSTGGG. . . .	. P. . . . NT. A	TSGSQSGVDE	LLT. LG. SVP	. GT. . . . S. .
	<u>105</u>	<u>115</u>	<u>125</u>	<u>135</u>	
HYDPt-3	PISVVGASNG	AQCNAQTVCC	TNTQFNGLIN	IGCMPINVNA	
HYDPt-2	. V. . L. TG. .	 T. P. . .	. SN. ML. AV.	M. . . . L. . . .	
HYDPt-1	. . . A. . . . S.	. . . SG. . . .	EQ. EW. . . .	 L. . .	

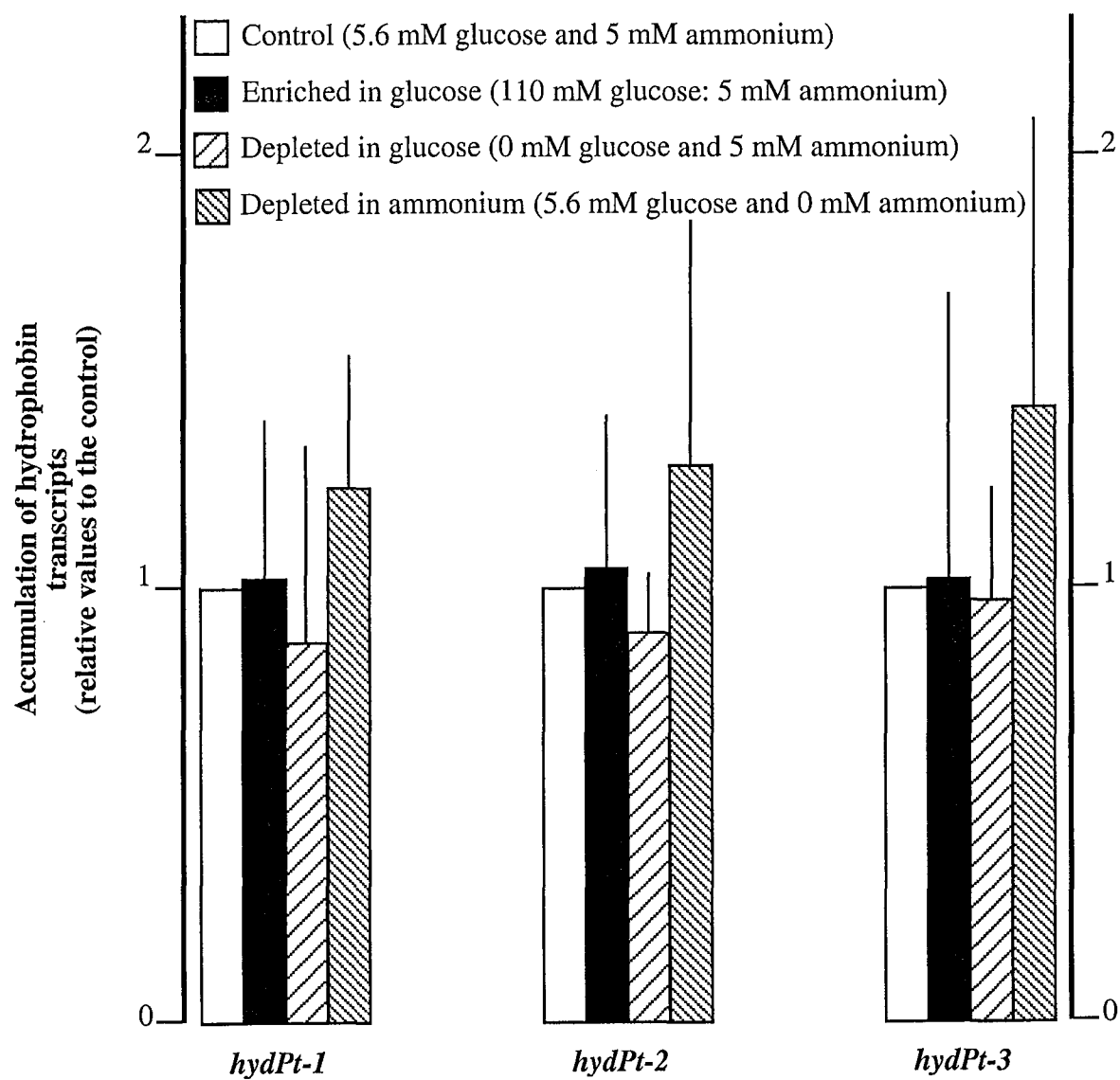
Duplessis et al. : Figure 1



Duplessis et al.: Figure 2



Duplessis et al. : Figure 3



Duplessis et al. Figure 4

Chapitre 4

Caractérisation et analyse de l'expression de gènes
codant des protéines de voies de transduction chez
Pisolithus tinctorius

Caractérisation et étude de l'expression de gènes des voies de transduction du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*

Ce chapitre présente ma contribution à l'étude moléculaire de gènes des voies de transduction du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. Ce chapitre regroupe des résultats obtenus au cours de mon travail de thèse et partiellement au cours de mon stage de DEA de Biologie Forestière (Duplessis, 1998). Ce travail n'a pas encore donné lieu à des publications d'articles de recherche, mais certains résultats apparaissent dans des chapitres de livre et des articles de synthèse (Duplessis *et al.*, 2001a ; Martin *et al.*, 2001).

Introduction

Contrairement à d'autres associations établies entre des plantes et des micro-organismes, telle que la symbiose Légumineuses-*Rhizobium* (Hirsch & McFall-Ngai, 2000), la nature des médiateurs chimiques symbiotiques, ainsi que leur mode d'action au sein des mycorhizes, sont encore mal définis. Toutefois, des travaux ont montré que l'auxine induit des modifications morphologiques au sein de la racine (Rupp & Mudge, 1985). Notamment, l'auxine qui est synthétisée et sécrétée par les champignons ectomycorhiziens (Gea *et al.*, 1994). Plus récemment, il a été montré que cette auxine fongique régule l'expression du gène *iaa88* de l'hôte végétal de l'association *Pinus pinaster*-*Hebeloma cylindrosporum* (Charvet-Candela, 2000) et ce dès les stades précoces de mycorhization. Ce gène appartient à une famille de facteurs de transcription (*Aux/IAA*) et pourrait donc induire des réponses secondaires, notamment lors des premières divisions cellulaires observées dans la racine. Il a aussi été montré que des flavonoïdes (rutine) et des cytokinines (zéatine) des exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* ont un effet positif sur la croissance des hyphes de *P. tinctorius* ou altèrent la morphologie des hyphes mycéliens (Lagrange *et al.*, 2001 ; Martin *et al.*, 2001). De plus, l'hypaphorine, le composé indolique majeur du *Pisolithus* qui s'accumule sous l'influence de l'hôte dans les tissus mycéliens, agit comme un signal en régulant la croissance des poils absorbants de la racine (Béguiristain & Lapeyrie, 1997 ; Ditengou *et al.*, 2000) et en stimulant l'expression du gène *EgHypar* dans les racines d'*E. globulus* (Nehls *et al.*, 1998). Des travaux récents ont permis de montrer que ce composé était un antagoniste de l'auxine, perturbant la balance hormonale de la racine de l'*Eucalyptus* (Ditengou & Lapeyrie, 2000). Il a aussi

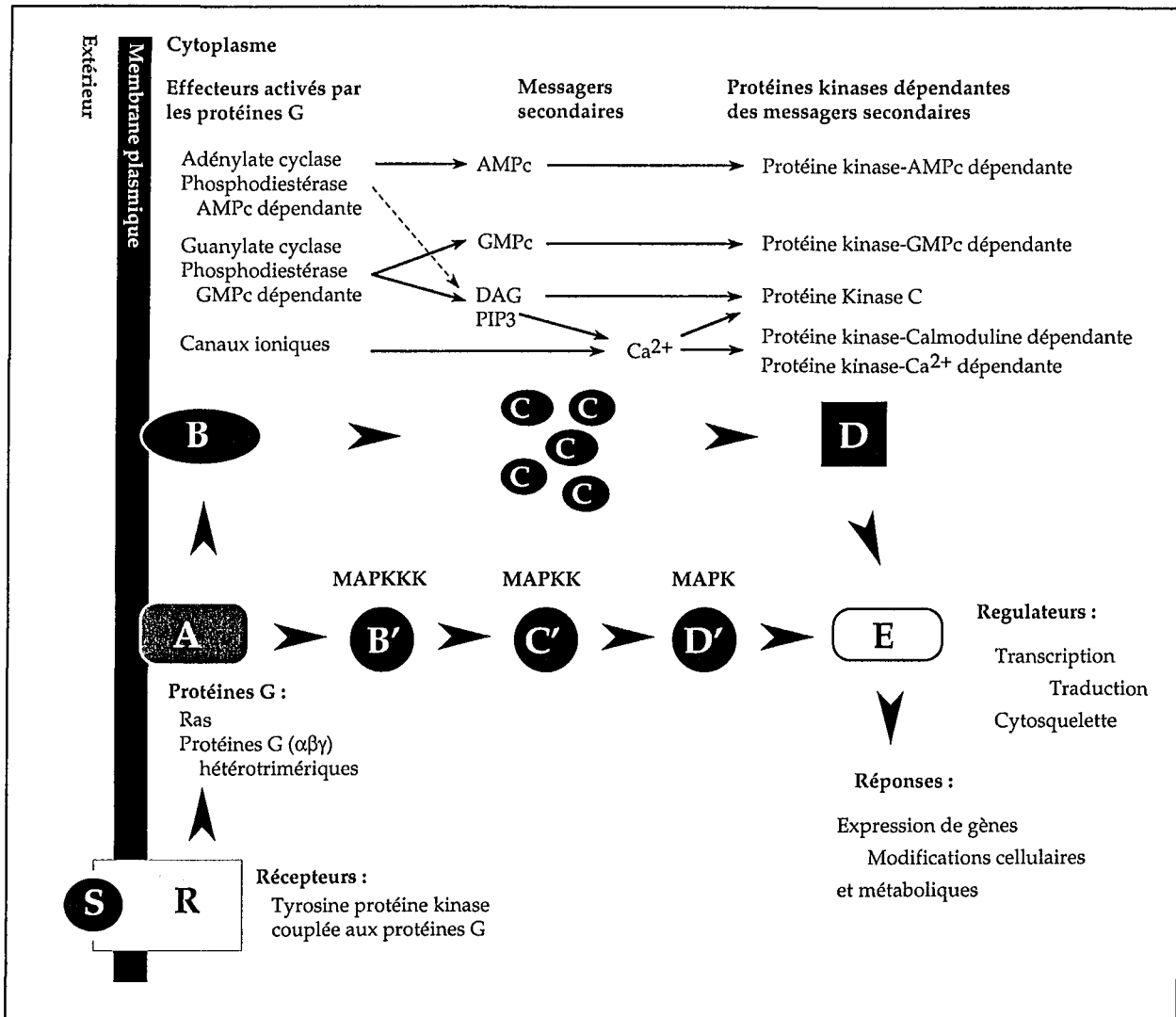


Figure 1 : Représentation schématique du patron général des voies de transduction de signaux décrit dans la plupart des systèmes animaux et fongiques. Un signal extracellulaire (S) se lie à un récepteur transmembranaire (R), qui va activé en réponse, une protéine G (A). Les protéines G -fixant le GTP- peuvent réguler des cascades de protéines kinases (B'—D') ou des effecteurs placés en aval de ces protéines (B) qui vont à leur tour faire varier la concentration de signaux intracellulaires, appelés "messagers secondaires" (C). Ces messagers secondaires sont nécessaires à l'activité de protéines kinases spécifiques (D). Ces protéines kinases sont responsable de la modulation de régulateurs distincts (E) qui contrôlent : la transcription ou la traduction de protéines spécifiques ; certaines structures du cytosquelette et certaines activités métaboliques (D'après Yang, 1996).

été rapporté que des fragments pariétaux polysaccharidiques, libérés par le champignon *Hebeloma crustuliniforme*, déclenchent de nombreuses réponses cellulaires faisant intervenir la phosphorylation/déphosphorylation de protéines dans les cellules racinaires de *Picea abies* (Salzer *et al.*, 1997).

Le contrôle morphogénétique s'exerce par des modifications dans l'expression génique au sein du noyau de chacun des partenaires de la symbiose ectomycorhizienne. Nous savons qu'il existe au moins un signal rhizosphérique de *Pisolithus tinctorius*, l'hypaphorine, perçu par la racine d'*Eucalyptus globulus* et y induisant des modifications dans l'expression génique (gène *EgHypar*). On peut supposer que l'échange d'information entre la perception de l'hypaphorine et les autres médiateurs chimiques (auxines, éliciteurs pariétaux) et la régulation transcriptionnelle de *EgHypar* passe par les voies de transduction. Il en est vraisemblablement de même chez le champignon bien qu'aucune évidence directe de stimulation de gènes par des signaux symbiotiques racinaires n'ait été rapportée.

Les voies de transduction de signaux sont connues à travers le règne vivant pour leur rôle clef dans les processus de prolifération cellulaire, de différenciation, ou encore de réponse rapide d'acclimatation des cellules face à un facteur de leur environnement (Gadd, 1994 ; Yang, 1996). Cette transduction intracellulaire consiste en plusieurs voies complexes, parallèles ou croisées, faisant intervenir de nombreux médiateurs protéiques se régulant en cascade par phosphorylation/déphosphorylation ou interactions protéine-protéine (Hirt, 1999). Les gènes qui codent les composantes de ces voies possèdent des domaines très conservés d'un organisme à un autre (Luan, 1998 ; Dickman & Yarden, 1999 ; Hunter, 2000).

D'une manière générale, un récepteur transmembranaire qui perçoit un signal extracellulaire sollicite des GTPases ou protéines G intracellulaires (Figure 1). Cette sollicitation peut être directe ou peut faire intervenir des protéines intermédiaires dont le rôle sera de rapprocher les protéines G du récepteur (Bourne *et al.*, 1990 ; Scheffzek *et al.*, 1998 ; Lorenz *et al.*, 2000). Les récepteurs membranaires sont susceptibles d'interagir de manière sélective avec plusieurs signaux à l'extérieur de la cellule, mais aussi avec plusieurs modules de la machinerie intracellulaire. Cette combinatoire complexifie considérablement les régulations obtenues *in fine*. Ce premier ensemble de protéines associées à la membrane plasmalemmique, constitue le premier module des voies de transduction. C'est un point clef de contrôle de la transduction et donc des processus morphogénétiques qui peuvent être déclenchés en aval, puisqu'il détermine l'orientation de la suite des événements. Un second module implique des protéines kinases et des protéines phosphatases. Il transmet l'information extracellulaire captée par le biais d'une cascade de phosphorylation/déphosphorylation (Cohen, 1992) ou par l'activation d'effecteurs qui modulent le taux de certains messagers secondaires cytosoliques tels que le calcium ou l'AMP cyclique (Chardin, 1994). Les protéines qui se trouvent en fin de cette cascade constituent un dernier module. Elles

Tableau 1 : Liste des EST utilisées lors de cette étude, correspondant à des protéines des voies de transduction de signaux chez *Pisolithus tinctorius*. Le pourcentage de similarité a été déterminé à l'aide des séquences en acides aminés déduites des différents ADNc. nt : nucléotides.

ADNc	Protéine homologue	Espèce	% similarité	Taille (nt)
6C8	Gβ protein/Protein kinase C receptor (Cross Pathway Control-CPC2)	<i>Neurospora crassa</i>	85%	1154 nt
7B5	Ras-like protein	<i>Suillus bovinus</i>	92%	792 nt
9C4	Gβ protein/Protein kinase C receptor (Cross Pathway Control-CPC2)	<i>Neurospora crassa</i>	85%	1076 nt
11A6	GTP-binding protein α subunit (GPA1)	<i>Coprinus congregatus</i>	95%	1481 nt
11D1	Calcineurine (PLC) regulatory subunit	<i>Filobasidiella neoformans</i>	88%	903 nt
11C5	Serine/threonine protein kinase (raf related protein)	<i>Homo sapiens</i>	48%	1449 nt

modifient l'état de phosphorylation de facteurs protéiques qui agissent sur la transcription de gènes cibles, après leur transport dans le noyau (Karin & Smeal, 1992 ; Hunter, 2000).

Au cours des dernières années, plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle clef des voies de transduction dans la différenciation des structures pathogènes et la prolifération cellulaire de plusieurs champignons filamenteux (Dean, 1997). Ainsi, chez *Magnaporthe grisea*, l'agent de la pyriculariose du Riz, l'inactivation expérimentale des gènes codant des protéines des voies de transduction empêche le développement des appressoria au contact de feuilles de riz (Mitchell & Dean, 1995 ; Liu & Dean, 1997). L'inactivation de gènes codant les sous-unités α et β de protéines G, l'adénylate cyclase ou la sous-unité régulatrice de la calcineurine supprime la virulence de plusieurs agents pathogènes : *Ustilago maydis*, un pathogène du maïs (Regenfelder *et al.*, 1997), *Cryphonectria parasitica*, l'encre du châtaignier (Kasahara & Nuss, 1997) *Colletotrichum trifolii*, responsable de l'anthracnose de la luzerne (Truesdell *et al.*, 2000) ou encore *Cryptococcus neoformans*, l'agent de la méningite chez l'homme (Li *et al.*, 1997 ; Alspaugh *et al.*, 1998).

La ressemblance des processus de préinfection chez ces champignons et lors des étapes précoces de formation de la mycorhize suggère que les protéines des voies de transduction sont susceptibles de jouer un rôle clef dans le déterminisme du développement de la symbiose. Afin de vérifier le rôle de telles protéines, j'ai donc cloné et caractérisé plusieurs gènes des voies de transduction, potentiellement impliqués dans la morphogénèse symbiotique, chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* en vue d'une inactivation ultérieure par transgénése.

Résultats

Afin d'établir le rôle éventuel des voies de transduction au cours du développement de l'ectomycorhize *Eucalyptus globulus-Pisolithus*, j'ai envisagé de cloner et de caractériser plusieurs gènes codant des protéines des voies de transduction du mycobionte. Trois stratégies sont envisageables pour cloner ces gènes : i) l'utilisation de sondes hétérologues d'ADNc pour cribler une banque d'ADNc d'ectomycorhize, ii) le clonage par PCR dirigée en utilisant des amorces complémentaires des sites conservés présents dans la séquence nucléotidique et iii) la recherche des clones d'intérêt au sein d'une collection d'ESTs (Expressed Sequence Tags ou étiquettes exprimées). C'est cette dernière approche que j'ai développé. En effet, le séquençage systématique d'ADNc d'ectomycorhizes d'*E.globulus-Pisolithus* a permis de générer près de 1000 ESTs de l'organe symbiotique (Tagu & Martin, 1995 ; Martin & Voiblet, 1998 ; Voiblet, 1999 ; Encelot, 2000 ; Voiblet *et al.*, 2001). Parmi ces ESTs, 13 % correspondent à des gènes qui codent des protéines des voies de transduction (Voiblet *et al.*, 2001). Cette proportion élevée renforce l'idée de leur rôle probable dans les processus de mise en place de l'organe symbiotique. Il est possible de déterminer l'origine génomique des gènes des ESTs en se basant sur les similarités de séquence. Le Tableau 1 présente

5' cgacacaacgaacg (14 nt)

```

1      ATG GCT GAA TCA CTG CGT TTT CTG GGC TCC CTG GCC GGC CAC AAA GGA TGG GTC ACT GCC ATT GCA ACG TCT TCG GAA AAC CAG GAC ATG 104
      M A E S L R F L G S L A G H K G W V T A I A T S S E N Q D M
31     ATT TTG ACT GCT TCC CGT GAT AAA ACA ATC ATC GTC TGG CAG CTG ACC CGC GAT GAG GAT TCG TTC GGA TAC CCA AAG CGC ATC CTA CAT 194
      I L T A S R D K T I V W Q L T R D E D S F G Y P K R I L H
61     GGC CAC AAC CAC TTC GTC TCC GAC ATT GTC TCG GAT GGA CAA TTC GCG CTG TCT TCA TCT TGG GAC CAC ACC CTT CGT CTC TGG 284
      G H N H F V S D I V I S G D G Q F A L S S W D H T L R L W
91     GAT TTG AAC ACT GGC GAG ACG ACT CGC CGA TTC GTC GGC CAC ACT TCC GAC GTC TCC AGT TTC AGT GCT GAT AAC AGG CAG ATT 374
      D L N N T G E T T R R F V G H T S D V L S V S F S A D N R Q I
121    GTG TCA GGC TCG AGG GAC AAG ACT AAG CTT TGG AAT ACC CTT GGA GAG TGC AAG TAT GAC ATC AAG GAT GAC GGA CAC TCC GAA TGG 464
      V S G S R D K T I K L W N T L G E C K Y D I K D D G H S E W
151    V S C V R F S P N V N N P V I V S C G W D K I V K V W E L S
      AAG TTC AAG TTG AAG ACC AAC CAC TAC GGC CAC ACT GGC TAC ATC AAT ACC TCC TCC GTT TCC CCT GAC GGC TCC TTG GCA GCA TCA GGT 644
      K F K L K T N H Y G H T G Y I N T V S V S P D G S L A A S G
181    GGC AAG GAC GGT ATC ACC ATG CTC TGG GAT CTT AAC GAG GGC AAG CAT CTC TCC CTC GAG GCT GGT AAC GTT GTC AAC GCC CTC GTC 734
      G K D G I T M L W D L N E G K H L Y S L E A G N V V N A L V
211    TTC TCG CGG AGC CGC TAC TGG TTG TGC GCT GCG ACT GCA AGC TGC ATC AAA ATC TTC GAC CTT GAG AGC AAA TCG ATC GTC GAA CTC 824
      F S P S R Y W L C A A T A S C I K I F D L E S K S I V D E L
241    AAG CCT GAA TTT ATC GAT GGT GGA CCC AAT TCA CGA GAA CCC GAA TGT GTG I G I F D L E S K S I V D E L
      K F E F I D V G P N S R E P E C V A L A W S A D G Q T L F G
271    GGT TTC ACG GAC AAT CTT ATC CGT GTT TGG GCT GTC ACT TCT TGA
      G F T D N L I R V W A V T S
301    attttctcgtatggcagcagctgagatgattacctaacttcccgtagctggcatataaaaagcattgcatcgcctgctgcataaacatcgatggttctgcgaatggat
      gagtactcgtattatatattgttgagaacgctctgcctctgccattatgctgtggcgctcatagccatccaccgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

```

2a : Séquences nucléotidique et polypeptidique de l'ADNc 6C8 (*cpc2* - protéine G β). Sites conservés: régions répétées - WD-1→7.

5' gggcgccgctgcagacggctgagagaagacgacagaaggggaacgaacg (49 nt)

```

1      ATG GCT GAA TCA CTG CGT TTT CTG GGC TCC CTG GCC GGC CAC AAA GGA TGG GTC ACT GCC ATT GCA ACG TCT TCG GAA AAC CAG GAC ATG 139
      M A E S L R F L G S L A G H K G W V T A I A T S S E N Q D M
31     ATT TTG ACT GCT TCC CGT GAT AAA ACA ATC ATC GTC TGG CAG CTG ACC CGC GAT GAG GAT TCG TTC GGA TAC CCA AAG CGC ATC CTA CAT 229
      I L T A S R D K T I I V W Q L T R D E D S F G Y P K R I L H
61     GGC CAC AAC CAC TTC GTC TCC GAC ATT GTC ATC TCG TCG GAT GGA CAA TTC GCG CTG TCT TCA TCT TGG GAC CAC ACC CTT CGT CTC TGG 319
      G H N H F V S D I V I S G D G Q F A L S S S W D H T L R L W
91     GAT TTG AAC ACT GGC GAG ACG ACT CGC CGA TTC GGC CAC ACT TCC GAC GTC TTG TCC GTC AGT TTC AGT GCT GAT AAC AGG CAG ATT 409
      D L N N T G E T T R R F V G H T S D V L S V S F S A D N R Q I
121    GTG TCA GGC TCG AGG GAC AAG ACC ATC AAG CTT TGG AAT ACC CTT GGA GAG TGC AAG TAT GAC ATC AAG GAT GAC GGA CAC TCC GAA TGG 499
      V S G S R D K T I K L W N T L G E C K Y D I K D D G H S E W
151    GTT TCG TGT GTC CGA TTT AGT CCC AAC CAC AAT GTC AAT CTT GTC TGT TGT GGC CGG GAC AAA ATC GTT AAG GTC TGG GAA CTC TCG 589
      V S C V R F S P N V N N P V I V S C G R D K I V K V W E L S
181    AAG TTC AAG TTG AAG ACC AAC CAC TAC GGC CAC ACT GGC TAC ATC AAT ACC GTC TCC GTT TCC CCT GAC GGC TCC TTG GCA GCA TCA GGT 679
      K F K L K T N H Y G H T G Y I N T V S V S P D G S L A A S G
211    GGC AAG GAC GGT ATC GCC ATC CTC TGG GAT CTT AAC GAG GGC AAG CAT CTC TCC CTC GAG GCT GGT AAC GTT GTC AAC GCC CTC GTC 769
      G K D G I A M L W D L N E G K H L Y S L E A G N V V N A L V
241    TTC TCG CGG AGC CGC TAC TGG TTG TGC GCT GCG ACT GCA AGC TGC ATC AAA ATC TTC GAC CTT GAG AGC AAA TCG ATC GTT GAC GAA CTC 859
      F S P N R Y W L C A A T A S C I K I F D L E S K S I V D E L
271    AAG CCT GAA TTT ATC GAT GGT GGA CCC AAT TCA CGG GAA CCC GAA TGT GTG GCC CTT GCA TCG TCA GCG GAC GGC CAA ACG TTA TTC GGA 949
      K F E F I D V G P N S R E P E C V A L A W S A D G Q T L F G
301    GGT TTC ACG GAC AAT CTT ATC CGT GTT TGG GCT GTC ACT TCT TGA
      G F T D N L I R V W A V T S
      attttctcgtatggcagcagcagctgagatgattacctaacttcccgtagctggcatataaaaagcattgcatcccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

```

2b : Séquences nucléotidique et polypeptidique de l'ADNc 9C4 (*cpc2* - protéine G β). Sites conservés: régions répétées - WD-1→7.

5' gggcgccgctgcagacggctgagagaagacgacagaaggggagaaaccacacc (54 nt)

```

1      ATG TCG AGG GCT CAA TTC CTG AGA GAG TAC AAG CTC GTC GTC GTT GGC GGA GGT GGT GTC GGG AAA TCC GCT CTT ACC ATC CAA TTC ATT 144
      M S R A Q F L R E Y K L V V V G G G G V G K S A L T I Q F I
31     CAG AGC CAC TTT GTG GAT GAA TAT GAC CCG ACC ATT GAG GAT TCG TAC CGC AAA CAA TGT GTT ATT GAT GAC GAG GTC GCA CTT CTC GAC 234
      Q S H F V D E Y D P T I E D S Y R K Q C V I D D E V A L L D
61     GTC CTG GAC ACC GCC GGA CAG GAA TAC GGG GCA ATG CGC GAA CAG TAC ATG CGA ACG GGC GAG GGC TTC CTT CTT GTA TAT TCC ATC 324
      V L D T A G O E E Y G A M R E Q Y M R T G E G F L L V Y S I
91     ACC TCT CGC AAT TCC TTC GAG GAA ATT AGC ACC TTC CAT CAA CAA ATT CTC CGT GTC AAG GAT CAG GAT TCG TTC CCT GTC ATC GTC GTC 414
      T S R N S F E E I S T F H Q Q I L R V K D Q D S F P V I V V
121    GCC AAC AAG TGC GAT CTT GAA TAC GAG CGC CAA GTT GGT ATG AAT GAG GGA CGC GAT CTT GCA AAA CAC TTT GGT TGC AAA TTC ATT GAA 504
      A N K C D L E Y E R Q V G M N E G R D L A K H F G C K F I E
151    ACG TCG GCC AAG CAA CGC ATC AAG GTC GAG GAG GCT TTT ACA AAC CTC GTC CGC GAG ATC AGA AAG TAC AAC AAG GAA CAG CAA CCG GGC 594
      T S A K Q R I N V D E A F T N L V R E I R K Y N K E Q Q T G
181    AGA CCC GTT ATG GCC AAC CCA GGC AAC GTA CCT GGA GTA TAC AGT GGT TCC AAG GAC GAC GGT GAC CAT GGA GGT TGT TGC TCT GGT TGC 684
      R P V M A N P G N V P G V Y S G S K D D G D H G G C C S G C
211    CTT GTT GTT TGA
      L V
      tctctctcgttggatgaggggcttattcatgttggttaaacactaaactctgtctagcttccggaccgtgcgcggaattagcagtgtaggataggttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
      aaaa 3'

```

2c : Séquences nucléotidique et polypeptidique de l'ADNc 7B5 (*ras*). Sites conservés: sites de fixation de GTP ; région effectrice ; site de myristoylation ; motif de palmytoylation.

Figure 2 : Alignements des séquences nucléotidiques des ADNc 6C8 (2a), 9C4 (2b), 7B5 (2c), 11A6 (2d), 11D1 (2e) et 11C5 (2f) avec les séquences polypeptidiques déduites.

les ADNc/ESTs supposées provenir de *Pisolithus tinctorius* et correspondant aux gènes codant des protéines des voies de transduction que nous avons sélectionné.

Caractérisation des ADNc et typologie des séquences polypeptidiques

Une EST correspondant à une séquence partielle d'un ADNc, les deux brins des ADNc 6C8, 7B5, 9C4, 11A6, 11D1 et 11C5 ont été séquencés entièrement. Le séquençage initial est réalisé à partir des amorces M13 Universel et M13 Reverse qui correspondent aux régions bordant le site d'insertion des ADNc dans le plasmide pBlueScript. Des amorces internes de séquençage ont été définies dans la région 3' des ESTs avec le logiciel Amplify 1.2. Elles permettent de compléter le séquençage obtenu en premier lieu sur les ESTs. Pour chaque ADNc, les séquences multiples ont été assemblées en contigs avec le logiciel Sequencher. La traduction simultanée dans les six cadres de lecture d'une séquence permet de déterminer la position du codon d'initiation de la traduction, la position du codon stop, et ainsi, de définir la séquence codante. Enfin, la séquence est comparée à la base de données non redondante d'ADN du NCBI (National Center for Biotechnology Information) via le logiciel Blastx 2.0.4 (Altschul *et al.*, 1997) et le cadre de lecture exact est alors déterminé par comparaison avec les séquences similaires. Le Tableau 1 résume les résultats de recherche de similarité obtenus à partir des séquences complètes des ADNc. Les séquences polypeptidiques des différents ADNc étudiés ont été comparées par alignements multiples aux séquences de protéines déjà décrites chez d'autres organismes à l'aide du programme MultAlin (Corpet, 1988) sur le serveur ProDom de l'INRA de Toulouse (<http://www.toulouse.inra.fr>). Les domaines protéiques conservés et caractéristiques des différentes fonctions biochimiques ont été recherchés et anotés sur la Figure 2.

● ADNc 6C8 (*cpc2-1*)

Cet ADNc consiste en un fragment de 1154 paires de bases (pb). Le codon d'initiation ATG correspondant à la méthionine se situe en position +15 et le codon stop TGA en position +957 (Figure 2a). L'ADNc possède une portion non codante de 14 nucléotides dans sa partie 5' et de 195 nucléotides dans sa partie 3'. Le site de polyadénylation est placé quant à lui en position +1154. La séquence codante de 314 acides aminés présente 90% de similarité avec la séquence de la protéine CPC2 (Cross-pathway-control) de *Neurospora crassa* qui est impliquée dans le contrôle général de la biosynthèse des acides aminés (Hoffmann *et al.*, 1999). Cette protéine G β riche en motifs WD a aussi été rapportée chez de nombreux autres organismes (*Hydra vulgaris*, 84% ; *Homo sapiens*, 83%) où elle a une fonction de récepteur intracellulaire pour une protéine kinase C activée (RACK).

● ADNc 9C4 (*cpc2-2*)

Cet ADNc consiste en un fragment de 1076 pb. Le codon d'initiation ATG se situe en position +50 et le codon stop TGA en position +992 (Figure 2b). L'ADNc possède une portion non codante de 49

[illegible][illegible]

ggatgatctgaactagtttgtctgttttggctggtcagtattacattcttgggtatccttcagcattgtgttatcgacagtgctggtacctgagcataaatacgtatgtcactattgtac
atgttggcatgccagaacgatggtccaatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

Figure 2 : Alignements des séquences nucléotidiques des ADNc 6C8 (2a), 9C4 (2b), 7B5 (2c), 11A6 (2d), 11D1 (2e) et 11C5 (2f) avec les séquences polypeptidiques déduites.

nucléotides dans sa partie 5' et de 85 nucléotides dans sa partie 3'. Le site de polyadénylation est placé en position +1076. La séquence codante du clone ADNc 9C4 comprend 314 acides aminés et est similaire, comme l'ADNc 6C8, à la protéine CPC2 de *Neurospora crassa* (85%). Les séquences de ces deux ADNc sont très proches et ne possèdent que 3 nucléotides différents dans le cadre de lecture. Cela pourrait signifier que les deux ADNc correspondent à deux allèles d'un même gène présent dans les deux noyaux de la souche dicaryotique de *Pisolithus*. Toutefois, la séquence de l'ADNc 6C8 présente une séquence de 110 nucléotides dans la partie 3' qui n'a pas été détectée dans la séquence du clone 9C4. Ce point renforce plutôt l'idée de la présence de deux gènes codant cette protéine G β chez le *Pisolithus*.

Les séquences polypeptidiques déduites des ADNc 6C8 et de 9C4 (*cpc2-1* & *cpc2-2*) ont été confrontées à celles rapportées pour *N. crassa* et pour des protéines G β d'autres organismes (Sondek *et al.*, 1996) permettant ainsi de replacer les sept motifs conservés WD (Trp-Asp) caractéristiques de ces protéines (Figure 3).

- ADNc 7B5 (*ras*)

Cet ADNc a une taille de 792 pb. Le codon d'initiation ATG se situe en position +55 et le codon stop TGA en position +694 (Figure 2c). L'ADNc possède une portion non codante de 54 nucléotides dans sa partie 5' et de 99 nucléotides dans sa partie 3'. Le site de polyadénylation est placé en position +792. La séquence code 213 acides aminés et présente 92% de similarité avec la séquence d'une protéine de la famille RAS de *Suillus bovinus*. La séquence codante présente aussi de forts taux de similarité avec les séquences de protéines RAS d'autres champignons (*Coprinus cinereus*, 91% ; *Lentinula edodes*, 87%). L'alignement multiple de la séquence polypeptidique déduite a permis de déterminer la région effectrice impliquée dans les interactions protéine-protéine et le motif CAAX (C : cystéine, A : acide aminé aliphatique, X : acide aminé indéterminé) dans la partie C-terminale qui correspond à un signal de palmitoylation pour l'ancrage à la membrane plasmique (Figure 2c). Les sites très conservés de liaison au GTP nécessaires au passage d'un état inactif (liaison au GDP) à un état actif (liaison au GTP) sont clairement identifiables. Ils sont nécessaires au déclenchement de la voie des MAP kinases par RAS (Janoueix-Lerosay, 1993).

- ADNc 11A6 (*Gp α*)

Cet ADNc consiste en un fragment de 1481 pb (Figure 2d). Le codon d'initiation ATG se situe en position +44 et le codon stop TAA en position +1106. L'ADNc possède une portion non codante de 43 nucléotides dans sa partie 5' et de 376 nucléotides dans sa partie 3'. Le site de polyadénylation est placé en position +1481. La séquence code 354 acides aminés et présente 95% de similarité avec la séquence d'une sous-unité α de protéine G hétérotrimérique de *Coprinus congregatus*. La séquence codante présente aussi de forts taux de similarité avec des sous-unités α de protéine G de champignons filamenteux

WD1/6C8	1	MAESLRFLGSLA	GH	KGWVTAIAT	SSENQ	DM	IL	TASR	D	KTII V WQ	L	45
WD1/9C4	1	MAESLRFLGSLA	GH	KGWVTAIAT	SSENQ	DM	IL	TASR	D	KTII V WQ	L	45
WD2/6C8	46	TRDEDSFGYPKRILH	GH	NHFVSDIVI	SS	DG	QFAL	SSSW	D	HTLR L WD	L	92
WD2/9C4	46	TRDEDSFGYPKRILH	GH	NHFVSDIVI	SS	DG	QFAL	SSSW	D	HTLR L WD	L	92
WD3/6C8	93	NTGETTRRFV	GH	TSDVLSVSF	SA	DN	RQIV	SGSR	D	KTIK L WNT	L	135
WD3/9C4	93	NTGETTRRFV	GH	TSDVLSVSF	SA	DN	RQIV	SGSR	D	KTIK L WNT	L	135
WD4/6C8	136	GECKYDIKDD	GH	SEWVSCVRF	SPNV	NN	PVIV	SCGW	D	KIVK V WE	L	179
WD4/9C4	136	GECKYDIKDD	GH	SEWVSCVRF	SPNV	NN	PVIV	SCGR	D	KIVK V WE	L	179
WD5/6C8	180	SKFKLKTNHY	GH	TGYINTVSV	SP	DG	SLAA	SGGK	D	GITM L WD	L	221
WD5/9C4	180	SKFKLKTNHY	GH	TGYINTVSV	SP	DG	SLAA	SGGK	D	GIAM L WD	L	221
WD6/6C8	222	NEGKHLYSLEA	GN	VVNALVFSP	SRYWLC	AA	TASC	IKIF	D	LESKSI VDE	L	270
WD6/9C4	222	NEGKHLYSLEA	GN	VVNALVFSP	NRYWLC	AA	TASC	IKIF	D	LESKSI VDE	L	270
WD7/6C8	271	KPEFIDV	GP	NSREPECVALAWSA		DG	QTLF	GGFT	D	NLIR V WA	VTs	314
WD7/9C4	271	KPEFIDV	GP	NSREPECVALAWSA		DG	QTLF	GGFT	D	NLIR V WA	VTs	314
Consensus Protéine Gβ*			GH	S		DG	..aa	.GS.	D	a WD		
Consensus Protéine Gβ**			GH			D	...L	SGS	D	..IK.L WD	L	
					N		...I	AAG		..VR.V .N	T	
								.T.		..L..I		

Figure 3 : Détermination des motifs répétés WD, caractéristiques des protéines Gβ, au sein des séquences protéiques de cpc2 (6C8 et 9C4).

*: séquence consensus de protéines Gβ (d'après von Weizsäcker *et al.*, 1992)

**: séquence consensus de protéines Gβ, déterminée par Müller *et al.*, 1995.

pathogènes (*Colletotrichum trifolii*, 84% ; *Ustilago maydis*, 84% ; *Cryphonectria parasitica*, 84% et *Magnaporthe grisea*, 83%). La séquence polypeptidique déduite de 11A6 est très proche de nombreuses sous-unités α de protéines G hétérotrimériques. On reconnaît, sur la Figure 2d, les sites de fixation du GTP et de contact aux sous-unités β et γ auxquelles elle est accrochée durant sa phase inactive (Lambright *et al.*, 1996). De plus deux sites d'ancrage à des lipides membranaires sont présents dans la partie N-terminale : un site de myristoylation sur une glycine et un site de palmitoylation régulateur sur une cystéine.

● ADNc 11D1 (*CnB*)

Cet ADNc consiste en un fragment de 903 pb (Figure 2e). Le codon d'initiation ATG se situe en position +133 et le codon stop TAA en position +658. L'ADNc possède une portion non codante de 132 nucléotides dans sa partie 5' et de 246 nucléotides dans sa partie 3'. Le site de polyadénylation est placé en position +903. La phase de lecture code 213 acides aminés et présente 88% de similarité avec la séquence d'une sous-unité régulatrice de la calcineurine (protéine phosphatase dépendante du calcium et sensible à la calmoduline) de *Filobasidiella neoformans*. La séquence codante présente aussi de forts taux de similarité avec la sous-unité régulatrice de la calcineurine d'autres organismes comme *Neurospora crassa* (85%), *Saccharomyces pombe* (81%) et *Saccharomyces cerevisiae* (79%). La comparaison de la séquence polypeptidique déduite de l'ADNc 11D1 aux séquences décrites chez *N. crassa* et *Saccharomyces cerevisiae* a permis d'identifier quatre sites d'ancrage au calcium très conservés (Figure 2e) et un site de myristoylation présent dans la partie N-terminale (glycine en position 2). Cette sous-unité est assez proche dans sa structure primaire de la calmoduline et elle est sensible aux flux de calcium dans la cellule (Cohen, 1992).

● ADNc 11C5 (*stk*)

Cet ADNc a une taille de 1449 pb (Figure 2f). Le codon d'initiation ATG se trouve à la position +136 et le codon stop TAG en position +1299. Cet ADNc présente une partie non codante de 135 nucléotides dans sa partie 5' et de 150 nucléotides dans sa partie 3'. Le site de polyadénylation se situe quant à lui en position +1449. La séquence code 388 acides aminés et est similaire à des protéines Sérine/Thréonine kinases (MAPKKK - Mitogen Activated Protein kinases, RAF) de différents organismes (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Fagus sylvatica*, *Brassica napus*). Néanmoins, elle ne présente pas, comme dans les cas précédents, de similarités très élevées avec les autres protéines (< 50%). La confrontation de la séquence polypeptidique déduite de l'ADNc 11C5, aux profils protéiques répertoriés dans les bases de données sur le site web PROSITE (<http://www.expasy.ch>), confirme son appartenance au groupe des protéines Sérine/Thréonine kinases et permet de replacer dans la séquence un domaine conservé caractéristique des protéines kinases eukaryotiques.

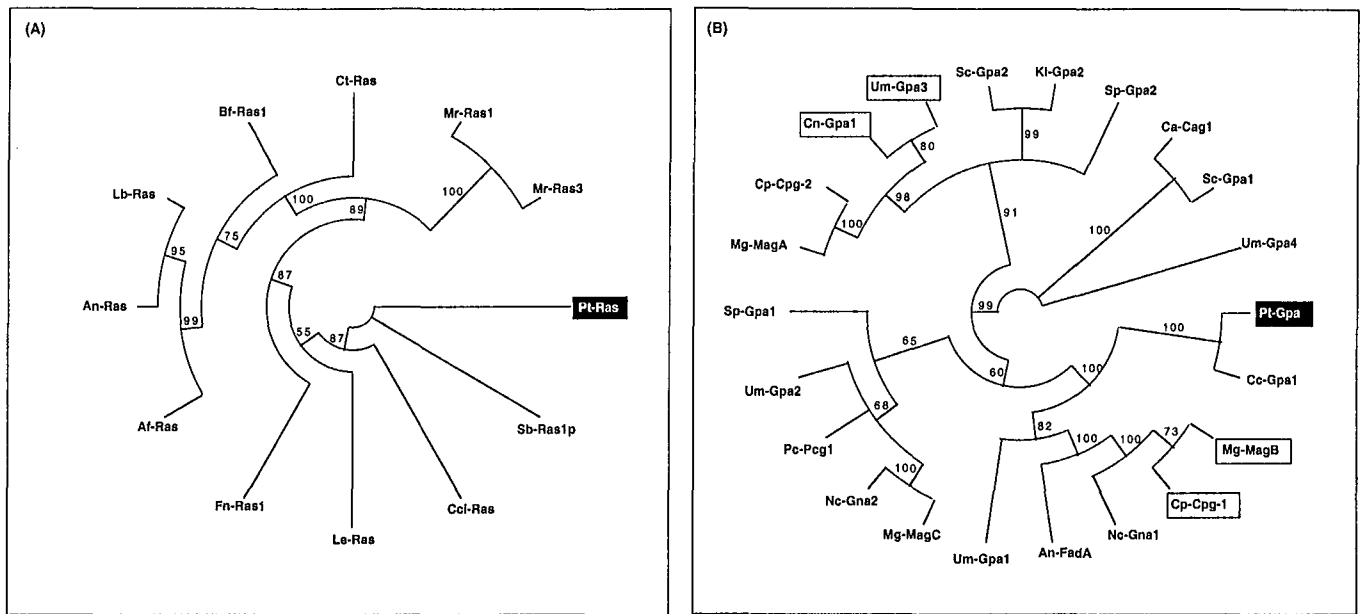


Figure 4 : Analyse phylogénétique des GTPases de type Ras (A) et des protéines G hétérotrimériques (B) des champignons filamenteux et des levures. Les arbres (non enracinés) ont été construits à l'aide du programme PAUP 4.04 en utilisant les alignements des séquences réalisés par le programme MultAlin (Corpet 1988). Dans l'arbre en (B), la séquence Um-Gpa a servi de référence (Regenfelder *et al.* 1997). Les séquences de *Pisolithus tinctorius* (ce travail) sont indiquées dans un cadre noir. En (B), les sous-unités α des protéines G hétérotrimériques sont indiquées dans un cadre blanc. Les valeurs de "bootstrap" pour (A) et pour (B) ont été obtenues pour 1000 répétitions. Abréviations : Pt, *Pisolithus tinctorius* ; Cc, *Coprinus congregatus* ; Mg, *Magnaporthe grisea* ; Cp, *Cryptonectria parasitica* ; Nc, *Neurospora crassa* ; An, *Aspergillus nidulans* ; Um, *Ustilago maydis* ; Pc, *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* ; Sp, *Schizosaccharomyces pombe* ; Cn, *Cryptococcus neoformans* ; Sc, *Saccharomyces cerevisiae* ; Kl, *Kluyveromyces lactis* ; Ca, *Candida albicans* ; Sb, *Suillus bovinus* ; Cci, *Coprinus cinereus* ; Le, *Lentinula edodes* ; Fb, *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* ; Af, *Aspergillus fumigatus* ; Lb, *Laccaria bicolor* ; Bf, *Botryotinia fuckeliana* ; Ct, *Colletotrichum trifolii* ; Mr, *Mucor racemosus*. Numéros d'accèsion (DDBJ/EMBL/GenBank) des séquences des sous-unités α des protéines G hétérotrimériques : Cc-Gpa1, X68031 ; Mg-MagB, AF011341 ; Cp-Cpg-1, L32176 ; Nc-Gna1, L11453 ; An-FadA, U49917 ; Um-Gpa1, U85775 ; Mg-MagC, AF011342 ; Nc-Gna2, L11452 ; Pc-Pcg1, U30791 ; Um-Gpa2, U85776 ; Sp-Gpa1, M64286 ; Mg-MagA, AF011340 ; Cp-Cpg-2, L32177 ; Cn-Gpa1, U09372 ; Um-Gpa3, U85777 ; Sc-Gpa2, U18778 ; Kl-Gpa2, L47105 ; Sp-Gpa2, D13366 ; Ca-Cag1, M88113 ; Sc-Gpa1, M15867 ; Um-Gpa4, U85778. Numéros d'accèsion (DDBJ/EMBL/GenBank) des séquences des protéines G de type Ras : Sb-Ras1p, AF250024 ; Cci-Ras, D13295 ; Le-Ras, D00742 ; Fb-Ras, AF294647 ; Af-Ras, L42299 ; An-Ras, U03025 ; Lb-Ras, AF034098 ; Bf-Ras1, U79558 ; Ct-Ras, AF044895 ; Mr-Ras1, M55175 ; Mr-Ras3, M55177.

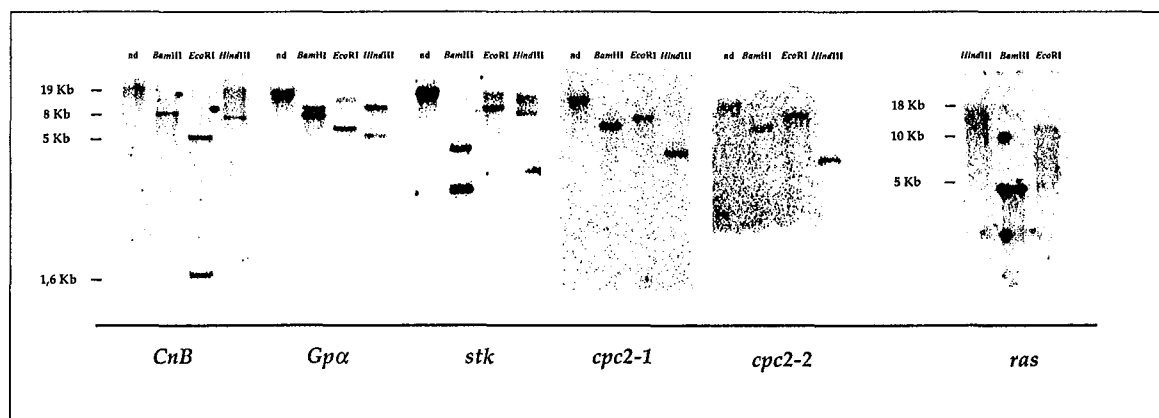


Figure 5 : Détermination par empreinte électrophorétique selon Southern de la représentativité des gènes *CnB*, *Gpa*, *Stk*, *ras* et *cpc2-1/cpc2-2* dans le génome de *Pisolithus tinctorius*. Environ 5 μ g d'ADN total de *P. tinctorius* ont été digérés par les enzymes de restriction indiquées sur la figure. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (p/v), transférés sur membrane de Nylon puis hybridés à l'aide des ADNc radioactifs 11D1, 11A6, 11C5, 6C8 et 7B5 respectivement. Une échelle de taille des fragments d'ADN est indiquée à gauche des autoradiogrammes. nd : ADN génomique non digéré.

L'analyse phylogénétique des séquences polypeptidiques déduites des gènes *ras* (Figure 4A) et *Gpα*, (Figure 4B) qui présentaient les pourcentages de similarités les plus élevés avec d'autres protéines (respectivement 92% et 95%), a aussi été réalisée. Les cladogrammes ont été construits, à l'aide du logiciel PAUP 4.0b4a, à partir des séquences des protéines RAS et GPA de levures et de champignons filamenteux alignées avec les séquences de *P. tinctorius* en utilisant le programme MultAlin (Corpet, 1988). La protéine RAS est très proche dans sa séquence de celle de Ras1p du basidiomycète *Suillus bovinus*. Chez ce champignon deux gènes codant deux protéines Ras distinctes ont été clonés (non publié, séquences disponibles sur le site du NCBI) alors que les empreintes selon Southern révèlent dans le cas du *Pisolithe* la présence d'un seul gène (Cf. *Origine génomique des ADNc étudiés*). La séquence de RAS décrite ici est assez éloignée de celle décrite chez un autre champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* où la présence d'un seul gène codant RAS a aussi été détectée (S. Sundaram & G. Podila, communication personnelle). La séquence déduite de *Gpα* quant à elle, est regroupée avec deux protéines *Gα* décrites chez les champignons *Magnaporthe grisea* et *Cryphonectria parasitica* pour leur rôle majeur dans la mise en place des structures pathogènes.

Origine génomique des ADNc étudiés

Sur la base du pourcentage de similarité de séquence, il apparaît que les différents ADNc étudiés sont d'origine fongique (tableau 1). La banque d'ADNc d'ectomycorhize ayant été construite à partir de transcrits d'origine à la fois fongique et végétal. Il était nécessaire de vérifier l'origine génomique des clones ADNc sélectionnés par empreinte électrophorétique selon Southern (Figure 5) sur de l'ADNg de *Pisolithus*, mais aussi d'*Eucalyptus*. Tous les ADNc - 7B5 (*ras*), 6C8 (*cpc2-1*), 9C4 (*cpc2-2*), 11A6 (*Gpα*), 11D1 (*calcineurine*, *CnB*) et 11C5 (*stk*) - s'hybrident avec l'ADNg de *Pisolithus tinctorius*. Pour la plupart des gènes, un faible nombre de bandes d'hybridation est observé sur les pistes d'ADN génomique digéré par les enzymes *Bam*HI, *Eco*RI et *Hind*III démontrant l'existence d'une seule ou d'un petit nombre de copies de ces gènes.

Les gènes *cpc2-1* et *cpc2-2* présentent des signaux d'hybridation similaires dans chaque profil de digestion, ce qui signifierait que les deux ADNc correspondraient à un seul et même gène. Sur ces empreintes et sur celle de *ras*, une seule bande est observée par profil de digestion, ce qui suggère l'existence d'un gène en copie unique au sein du génome du *Pisolithe*. L'hybridation du clone 11D1 (*CnB*) en deux points sur l'ADNg fongique digéré par *Eco*RI s'explique par l'existence d'un site de restriction au sein de la séquence nucléotidique de l'ADNc, suggérant là aussi l'existence d'un gène en copie unique. Les empreintes des gènes *Gpα* et *stk* présentent plusieurs signaux d'hybridation par piste d'ADN digéré. Ces bandes surnuméraires peuvent s'expliquer par la présence d'une ou plusieurs séquences introniques portées par les gènes qui possèderaient des sites de restriction pour ces enzymes. Nous pouvons aussi

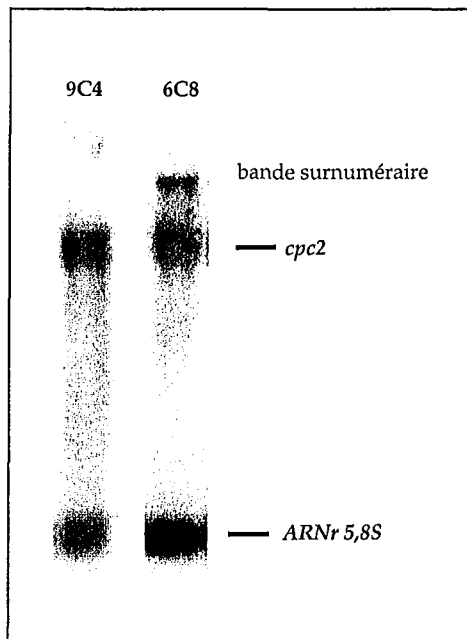


Figure 6 : Mise en évidence par empreinte électrophorétique de type "northern" de deux transcrits *cpc2* de tailles différentes dans le mycélium de *Pisolithus tinctorius*. Environ 3 μ g d'ARN totaux extraits du mycélium ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose en conditions dénaturantes, transférés sur une membrane de Nylon puis hybridés avec des sondes d'ADNc radioactives correspondant à l'ADNc 9C4 ou 6C8. Une seconde hybridation avec une sonde correspondant à l'ARNr 5,8S a été réalisée afin d'apprécier la présence et la quantité d'ARN sur les pistes.

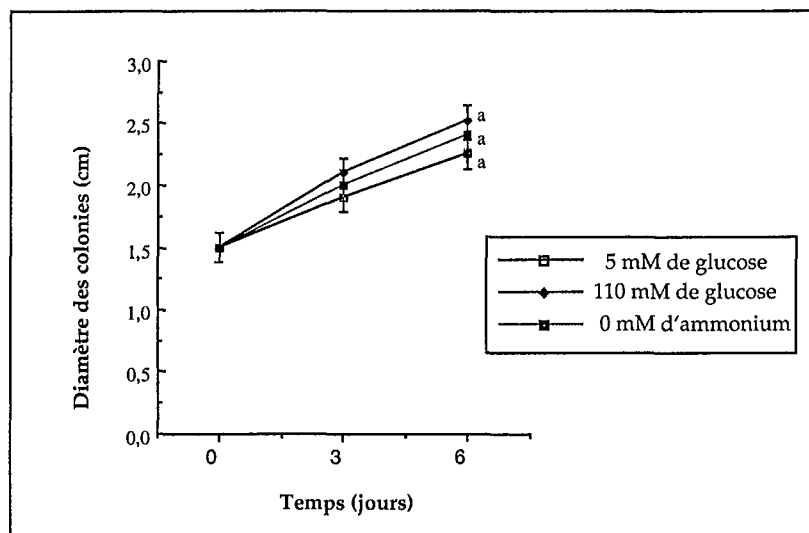


Figure 7 : Croissance des colonies fongiques de *P. tinctorius* sur milieu de Pachlewski modifié (5 mM de glucose, 5 mM d'ammonium), enrichi en glucose (110 mM de glucose, 5 mM d'ammonium) ou appauvri en azote (5 mM de glucose, 0 mM d'ammonium). Les colonies sont cultivées pendant 2 semaines sur milieu de Pachlewski modifié avant transfert sur le nouveau milieu de culture à t0. Les diamètres ont été mesurés aux temps t0, 3 et 6 jours sur 12 colonies fongiques. Test t de Student ($P=0,5$).

avoir affaire à des familles multigéniques. La recherche de gènes codant une sous-unité α de protéine G, par PCR dirigée chez plusieurs champignons filamenteux pathogènes (*Magnaporthe grisea*, *Cryphonectria parasitica*, *Ustilago maydis*...) a d'ailleurs permis la mise en évidence de deux à quatre gènes de $G\alpha$ chez chacune de ces espèces. Il en est généralement de même avec les sérine/thréonine protéine kinases (Andrews *et al.*, 2000).

Analyse de l'expression de gènes des voies de transduction chez P. tinctorius

Concentration des transcrits chez P. tinctorius

Après avoir sélectionné et caractérisé les ADNc codant des gènes des voies de transduction de *P. tinctorius*, l'expression de ces gènes et la régulation de cette expression chez le champignon cultivé sous différentes conditions expérimentales a été étudiée. Dans un premier temps, la concentration en ARNm de ces gènes a été estimée chez le *Pisolithus*. Des empreintes électrophorétiques ADNc/ARN, réalisées avec 3 μ g d'ARN totaux extraits de colonies fongiques, permettent de détecter les transcrits des gènes *cpc2*, *ras*, *Gp α* , *stk* et *CnB* chez le champignon cultivé sur milieu de Pachlewski modifié. Il est à noter que plusieurs empreintes réalisées à partir du clone ADNc 6C8 (*cpc2-1*), ont montré une bande d'hybridation surnuméraire d'un poids moléculaire supérieur à celui de la bande commune aux empreintes des deux ADNc correspondant au gène *cpc2* (Figure 6). Ce résultat suggère l'existence d'un épissage alternatif d'un gène unique *cpc2* chez le *Pisolithus*. Le clone 6C8 pourrait être un précurseur de l'ARNm mature qui correspondrait donc au clone 9C4. Une observation identique a été rapportée lors de l'étude du gène *cpc2* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hoffmann *et al.*, 1999). De même, chez le champignon phytopathogène *Cryphonectria parasitica*, un gène unique codant une sous-unité β de protéine G a été identifié, alors que l'analyse des transcrits par Northern blot a révélé la présence de deux ARNm de tailles différentes (Kasahara & Nuss, 1997).

Effet de la disponibilité en carbone et en azote et de la mycorhization sur le niveau des transcrits

La régulation des différents gènes dans le mycélium cultivé sous différentes conditions trophiques a été appréciée. Pour cela, j'ai cultivé le champignon sur milieu de Pachlewski modifié (contrôle) et sur milieu de Pachlewski supplémenté en glucose ou ne contenant pas d'azote. Des observations au microscope photonique, menées sur plusieurs colonies fongiques, n'ont pas permis de détecter de modifications dans la morphologie des hyphes mycéliens soumis à une modification trophique (résultats non présentés). De plus, des mesures de la croissance mycélienne à partir de la taille des colonies ont montré que les traitements expérimentaux ne modifiaient pas la croissance du champignon (Figure 7). La technique des filtres à faible densité en ADNc a été retenue, afin de suivre simultanément l'expression des différents gènes étudiés, en déposant les 6 ADNc sur des filtres de nylon (Voiblet *et al.*,

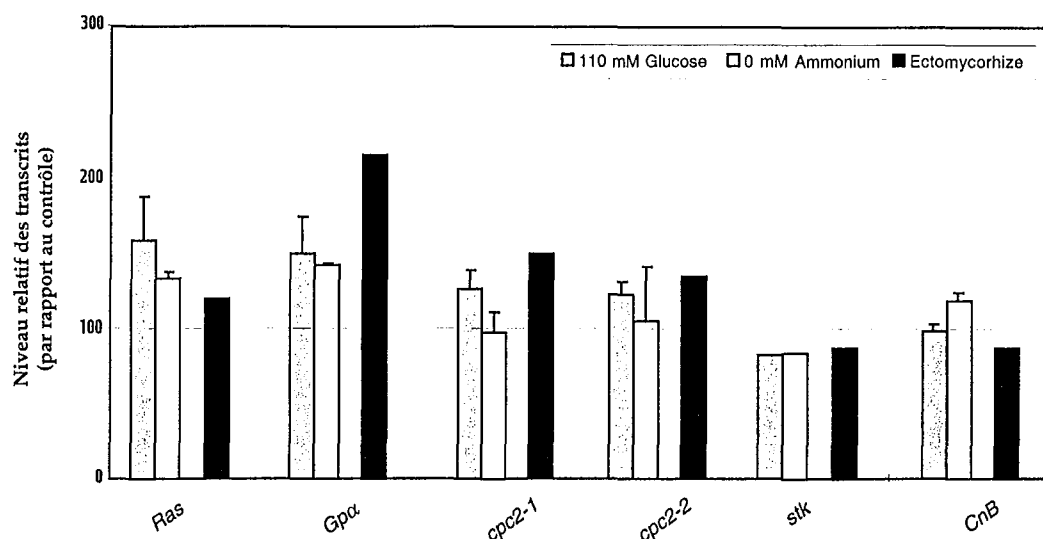


Figure 8 : Niveaux d'accumulation des transcrits *Ras*, *GPα*, *cpc2*, *stk*, et *CnB* dans l'ectomycorhize d'*E. globulus*-*P. tinctorius* (en noir) et dans le mycélium de *P. tinctorius* enrichi en glucose (en gris) ou appauvri en ammonium (en blanc). Les niveaux d'expression sont exprimés par rapport à ceux obtenus pour du mycélium se développant sur un milieu standard contenant 5 mM de glucose et d'ammonium (valeur 100 : ligne en pointillés). Les expériences ont été répétées deux fois pour le mycélium cultivé sur milieu enrichi en glucose ou sans azote (moyennes et écart-types rapportés sur le graphique).

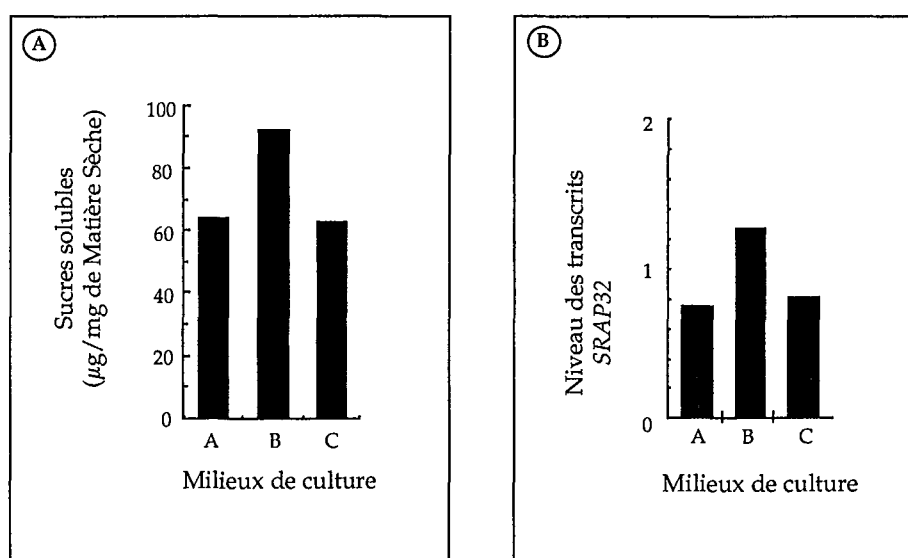


Figure 9 : (A) Dosage des sucres solubles de *P. tinctorius* après 6 jours de croissance sur différents milieux de culture par colorimétrie (dosage à l'anthrone). (B) Niveau des transcrits SRAP32 du mycélium de *P. tinctorius* cultivé sur différents milieux de cultures (A, 5 mM de glucose et 5 mM d'ammonium ; B, 110 mM de glucose et 5 mM d'ammonium ; C, 5 mM de glucose et 0 mM d'ammonium). Les mesures ont été effectuées sur 20 mg de mycélium lyophilisé.

2001). En plus des gènes des voies de transduction étudiés, des ADNc fongiques correspondant à des gènes fortement exprimés (*HydPt2* codant une hydrophobine et *SRAP32* codant une protéine pariétale régulée par la symbiose et le glucose) et à des gènes de ménage cellulaire qui sont exprimés de façon stable (*ATP Synthase* et *rp60*), ont été déposés sur les filtres,. La concentration relative des différents transcrits a été mesurée à l'aide d'un phosphorimageur à partir des empreintes obtenues. Elle est exprimée par rapport à la concentration des deux gènes de ménage dont l'expression ne varie pas chez le *Pisolithes* cultivé sur les différents milieux (Figure 8).

Le mycélium de *Pisolithes*, transféré d'un milieu contenant 5mM, cultivé sur 110 mM de glucose, présente une concentration intracellulaire en sucres solubles supérieure à celle du mycélium contrôle (Figure 9A). Sachant que la protéine *SRAP32* voit son expression régulée par la teneur extracellulaire en glucose (Laurent, 1991), le niveau des transcrits du gène *SRAP32* dans ces conditions expérimentales a été vérifié. Il apparaît effectivement que la concentration des transcrits de *SRAP32* est stimulée par l'ajout de glucose dans le milieu de culture (Figure 9B). Le mycélium perçoit bien le changement de concentrations extracellulaire et intracellulaire en glucose. Après normalisation des concentrations des transcrits, il apparaît que le taux d'expression des gènes *CnB* et *stk* restent stables. Une légère augmentation de la teneur en ARNm *ras* et *Gpα* est mesurée dans le mycélium cultivé sur milieu enrichi en glucose ou sans azote. Il semblerait donc que la concentration en glucose et en azote extracellulaire n'affecte que modérément l'expression des gènes étudiés. Nous avons suivi par ailleurs l'expression de ces gènes dans l'ectomycorhize d'*E. globulus-P. tinctorius* lors de la formation du manteau (Voiblet *et al.*, 2001, Chapitre 2). Les données expérimentales obtenues par filtres de faible densité en ADNc sont similaires à ceux attendus (Figure 8) et seule l'expression des gènes *cpc2* et *Gpα* est modifiée par le processus symbiotique (150% pour *cpc2* et 210% pour *Gpα*, par rapport au contrôle ; Tableau 2).

Effet des exsudats racinaires d'Eucalyptus sur le niveau des transcrits (étude réalisée en collaboration avec Hubert Lagrange)

Les régulations de faible ampleur observées pour les gènes de communication étudiés, lors de la formation du manteau de l'ectomycorhize *E. globulus-P. tinctorius*, nous ont amené à nous interroger sur la possibilité d'une régulation plus précoce des gènes des voies de transduction. Par exemple, lors du stade de préinfection, lorsque les deux partenaires de la symbiose n'ont pas encore établi de contacts physiques et qu'un dialogue moléculaire existe déjà par le biais de signaux moléculaires rhizosphériques. Nous avons testé l'effet des exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* et d'une molécule présente parmi ces exsudats, la cytokinine zéatine, sur l'expression des gènes des voies de transduction.

Nous avons suivi l'expression des gènes chez le *Pisolithes* après 9 jours de croissance sur un milieu de culture contenant des exsudats racinaires d'*E. globulus* (selon Lagrange *et al.*, 2001) ou de la zéatine (10^{-6}

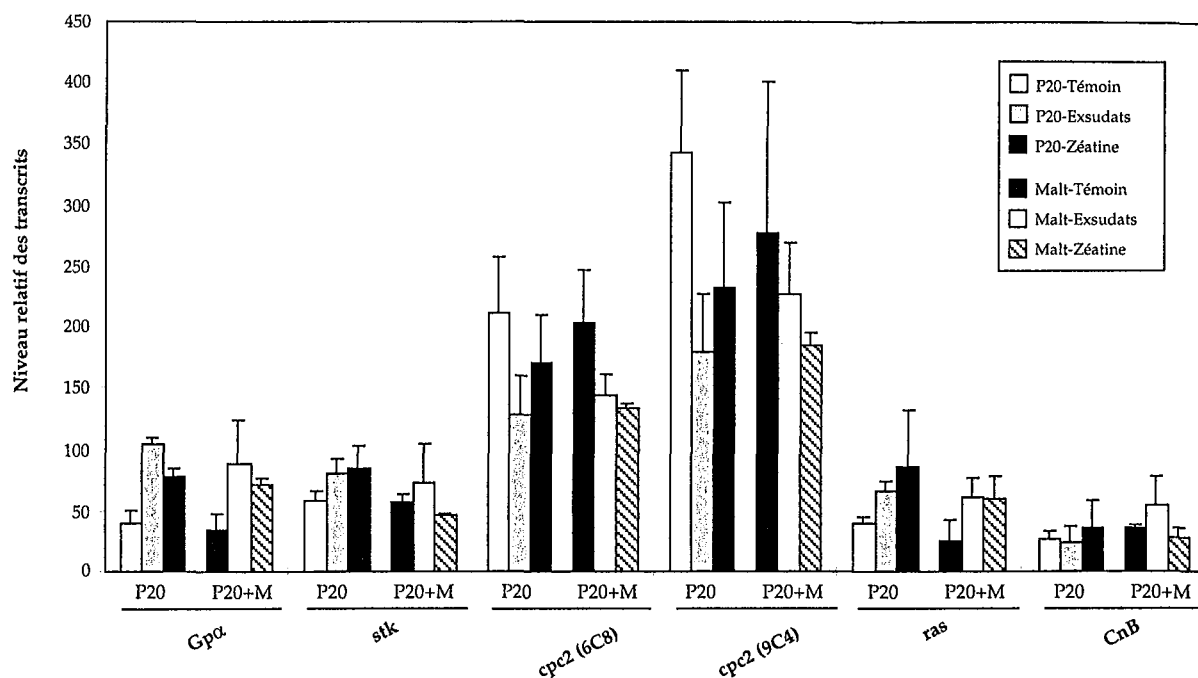


Figure 10 : Niveaux d'accumulation des transcrits *Gpα*, *stk*, *cpc2* (6C8 & 9C4), *ras* et *CnB* dans le mycélium de *Pisolithus tinctorius* cultivé sur un milieu de Pachlewski modifié (P20) ou un milieu complétement en Malt (P20+M) contenant des exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* (Lagrange *et al.*, 2001) ou 10^{-6} M de zéatine, une molécule de ces exsudats. Les niveaux d'expression sont exprimés par rapport à l'expression de gènes de ménage cellulaire présent sur les filtres de nylon et dont l'expression ne varie pas. Les expériences ont été répétées deux fois. Les moyennes et les écart-types pour ces deux répétitions sont reproduits sur la figure.

M). Des modifications morphologiques du mycélium, similaires à celles décrites lors des stades précoces de mycorhization, ont été observées aux concentrations testées. Notamment, on note une modification de l'ordre de ramification des hyphes mycéliens (Lagrange, 1997) ou encore une augmentation de la synthèse d'hypaphorine (Lagrange, communication personnelle), le composé indolique majeur de *P. tinctorius* qui régule par ailleurs le gène *EgHypar* dans la racine de la plante hôte (Nehls *et al.*, 1998).

Plusieurs gènes des voies de transduction voient leur expression génique modifiée sous l'effet des signaux testés (Figure 10). Ainsi, le gène *stk* de *Pisolithus tinctorius* est légèrement stimulé par les exsudats de l'Eucalyptus (137%) et par la zéatine (143%), alors que les gènes *Gpα* et *ras* le sont plus fortement (165 à 260% en fonction du traitement, Tableau 2). Par ailleurs, une légère répression de *cpc2-1* et *cpc2-2* est observée dans ces conditions (50 à 81%).

Tableau 2 : Concentrations relatives normalisées des transcrits *ras*, *cpc2-1*, *cpc2-2*, *Gpα*, *Stk* et *CnB* de *Pisolithus tinctorius* mesurées dans les différents traitements expérimentaux.

Conditions expérimentales	<i>ras</i>	<i>cpc2-1</i>	<i>cpc2-2</i>	<i>Gpα</i>	<i>stk</i>	<i>CnB</i>
<i>P. tinctorius</i> témoin (milieu de Pachlewski, 5 mM Glucose et 5 mM Ammonium)	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Pachlewski supplémenté en glucose (110 mM Glucose et 5 mM Ammonium)	165%	130%	125%	150%	80%	100%
Pachlewski appauvri en Ammonium (5 mM Glucose et 0 mM Ammonium)	140%	95%	105%	145%	80%	120%
Ectomycorhize <i>E. globulus</i> - <i>P. tinctorius</i> âgées de 4 jours (Voiblet <i>et al.</i> , 2001)	125%	150%	130%	210%	85%	85%
Pachlewski + exsudats racinaires d' <i>Eucalyptus globulus</i> (Lagrange <i>et al.</i> , 2001)	165%	61%	81%	260%	137%	88%
Pachlewski + 10 ⁻⁶ M de zéatine	215%	52%	68%	196%	143%	138%

La mise en place de l'organe symbiotique ectomycorhizien s'accompagne de la régulation de nombreux gènes et de nombreuses protéines (Hilbert *et al.*, 1991 ; Simoneau *et al.*, 1993 ; Voiblet *et al.*, 2001, Chapitre 2). Les signaux moléculaires échangés entre les partenaires, durant le stade de préinfection, affectent l'expression de certains de ces gènes (Nehls *et al.*, 1998). Ces modifications dans l'expression génique aboutissent en quelques jours au développement d'un organe caractéristique au niveau du système racinaire (Horan *et al.*, 1988 ; Brun *et al.*, 1995) qui permet à la plante-hôte et au mycobionte d'améliorer l'assimilation de métabolites nécessaires à leur croissance (Botton & Chalot, 1995 ; Vivin *et al.*, 1996 ; Hampp & Wingler, 1997 ; Wallenda *et al.*, 2000).

Les voies de transduction de signaux sont impliquées dans les processus de différenciation et de morphogénèse de la plupart des organismes (Yang, 1996, Hunter, 2000) même si toutefois, certains éléments n'ont pas été identifiés dans certains règnes (cas de la protéine Ras chez les plantes ; Ma, 1994 ; 'The Arabidopsis Genome Initiative', 2000). Le rôle primordial de ces voies a été mis en évidence dans l'étude de structures pathogènes de plusieurs champignons filamenteux (Mitchell & Dean, 1995 ; Xu & Hamer, 1996 ; Gold *et al.*, 1997). Ces travaux m'ont amené à m'interroger sur l'implication de telles voies dans la mycorhizogénèse. Des études réalisées sur les ectomycorhizes, il apparaît que la morphologie des hyphes de *Pisolithus tinctorius* est affectée par les exsudats racinaires de son partenaire végétal *Eucalyptus globulus* (Lagrange, 1997) ainsi que par la rutine, émise par la plante (Lagrange *et al.*, 2001). De plus, l'hypaphorine émise par *Pisolithus* est perçue par *E. globulus*. En effet, cette molécule stimule l'expression du gène *EgHypar* dans les tissus racinaires (Nehls *et al.*, 1998). De même, elle stoppe la croissance des poils absorbants de la racine (Ditengou *et al.*, 2000) et modifie la balance hormonale au sein du système racinaire (Ditengou & Lapeyrie, 2000).

— Dans quelles mesures les voies de transduction sont impliquées dans la transduction de ces signaux ?

— Quelle est leur rôle dans le développement de l'organe mycorhizien ?

Afin de préciser le rôle des voies de transduction dans la mycorhizogénèse, nous envisageons d'inactiver des gènes-clés des voies de transduction chez les deux partenaires de la symbiose *E. globulus*-*P. tinctorius*. Pour atteindre ces objectifs, nous devons d'abord cloner ces gènes, les caractériser et étudier leur expression. J'ai identifié dans la base d'EST de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius* (<http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>) plusieurs ADNc codant des protéines-clés des voies de transduction. Parmi ces ADNc, j'en ai sélectionné six codant des protéines intervenant dans l'établissement du pouvoir pathogène de plusieurs champignons filamenteux. J'ai réalisé le séquençage pleine longueur de ces ADNc et caractérisé les protéines qui leur correspondaient par homologie de séquence. A l'issue de cette analyse typologique, je dispose des gènes codant une sous-

unité α de protéine G hétérotrimérique, deux protéines G β , une petite protéine G monomérique de la famille ras et une sous-unité régulatrice de la calcineurine, une protéine phosphatase régulée par le calcium. La caractérisation typologique de ces séquences ADNc nous montre que les protéines de *Pisolithus* sont très conservées par rapport à leurs homologues chez d'autres Champignons Supérieurs. Enfin, j'ai confirmé la présence de ces gènes dans le génome du Pisolithe. Ces travaux présentent la première description de gènes codant des protéines des voies de transduction d'un basidiomycète mycorrhizien.

Les gènes étudiés présentent un intérêt particulier. En effet, les protéines, codées par ces gènes, se situent pour la plupart en amont des voies de transduction, en contact étroit avec les récepteurs qui perçoivent les signaux extracellulaires et morphogènes. Les protéines codées par ces gènes ont souvent été rapportées pour leur rôle déterminant dans la plupart des processus morphogénétiques (Yang, 1996 ; Bourne *et al.*, 1990 ; Janoueix-Lerosay, 1995).

Les sous-unités β de protéines G hétérotrimériques sont décrites pour leur fonction régulatrice de l'activité des sous-unités α des mêmes protéines. Elles peuvent également avoir un rôle propre dans le déclenchement de voies de transduction (Clapham, 1996 ; Coleman & Sprang, 1996). La protéine G β de Pisolithe est proche d'une protéine G β à motifs WD répétés décrite chez le Rat pour son interaction avec une protéine kinase C activée. Il a été rapporté que cette protéine interagissait directement avec une phosphodiesterase AMPc dépendante (Yarwood *et al.*, 1999) et qu'elle ne présentait aucun lien avec des sous-unités β de protéines G hétérotrimériques, en dehors des similarités partagées dans leur structure primaire. Le rôle encore mal défini des protéines G β à motifs WD répétés serait de servir de support dans la mise en place de complexes protéiques (Smith *et al.*, 1999). La protéine PtCPC2 de Pisolithe est surtout très proche de la protéine CPC2 décrite chez *Neurospora crassa* et Cpc2p de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette protéine régulatrice est impliquée dans le contrôle transcriptionnel des gènes responsables de la biosynthèse d'acides aminés lorsque ce champignon est cultivé sur milieu appauvri en acides aminés (Müller *et al.*, 1995 ; Hoffman *et al.*, 1999) avec un mode d'action, toutefois, mal défini. L'étude de cette protéine chez le Pisolithe présente un intérêt particulier, puisque le métabolisme azoté est profondément modifié lors du fonctionnement de l'ectomycorhize (Martin & Botton, 1993 ; Plassard *et al.*, 1997). La caractérisation de ce gène et l'étude de l'expression de ce gène devra être approfondie. Il est notamment prévu de réaliser des complémentations de souches de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Neurospora crassa* mutantes pour cette fonction avec le gène *cpc2* du Pisolithe. Elles devraient permettre de vérifier si la fonction de la protéine CPC2 est conservée chez *P. tinctorius*.

Plusieurs gènes codant des sous-unités α des protéines G hétérotrimériques ont été clonés ces dernières années chez différents champignons filamenteux pathogènes des plantes ou de l'Homme (Gao & Nuss, 1996 ; Regenfelder *et al.*, 1997 ; Alspaugh *et al.*, 1997 ; Liu & Dean, 1997 ; Coca *et al.*, 2000 ; Truesdell *et al.*, 2000). Chez certains de ces champignons, l'inactivation expérimentale de ces gènes a

permis de montrer qu'une seule de ces sous-unités était nécessaire à la différenciation de l'appressorium, la structure de contact, développée par le champignon après perception de son hôte (Alspaugh *et al.*, 1998 ; Kahmann *et al.*, 1999). Cette sous-unité présente une séquence fortement homologue à celle décrite pour *P. tinctorius*. Ce point est très intéressant dans l'optique d'une transformation génétique de ce champignon. En effet, le gène *Gpα* serait un bon gène candidat pour étudier le rôle des voies de signalisation lors de la mise en place des interfaces de contact entre les deux partenaires de la symbiose.

Les petites protéines G de la famille Ras se trouvent, comme les protéines G hétérotrimériques, au contact de la membrane plasmique et elles déclenchent l'activité des MAP kinases, transductrices de signaux extracellulaires par cascade de phosphorylation (Moodie & Wolfman, 1994 ; Jaoueix-Lerousey, 1995 ; Reuther & Der, 2000). Ces enzymes régulent de nombreux processus morphogénétiques chez la plupart des organismes, à l'exception notable des plantes (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). L'implication de ces petites protéines G a souvent été rapportée dans la régulation de la croissance végétative chez d'autres champignons filamenteux (Roze *et al.*, 1999). Leur rôle a aussi été particulièrement étudié chez différents organismes modèles (par exemple, *Caenorhabditis elegans* ; Sternberg & Han, 1998) permettant ainsi de déterminer le rôle central de la protéine RAS dans différents processus développementaux (Reuther & Der, 2000). De plus, il semblerait qu'un gène codant une protéine RAS décrite chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* soit exprimé spécifiquement au cours de l'étape de préinfection précédant la colonisation de racines de Pin par ce Laccaire (G. Podila, communication personnelle). Ce résultat est des plus intéressant car il souligne l'implication potentielle de RAS dans les premières étapes de mycorhization.

La sous-unité de la calcineurine décrite dans ce travail est dépendante du calcium. Son rôle dans la trame des voies de transduction cellulaires est complexe. En effet, il a été rapportée qu'elle jouait un rôle de régulateur dans le cas de signaux générant des messagers secondaires multiples : le calcium et l'AMP cyclique (Cohen, 1992). Ces messagers influençant de nombreuses autres protéines lorsque leurs concentrations varient dans la cellule. Il a notamment été montré que la calcineurine était impliquée dans la virulence de l'agent de la méningite, *Cryptococcus neoformans* (Odom *et al.*, 1997 ; Alspaugh *et al.*, 1998). De même, cette protéine phosphatase est impliquée dans la croissance végétative d'autres champignons. Par exemple, il a été montré que cette protéine était impliquée dans la croissance et la morphologie des hyphes de *Neurospora crassa* (Prokish *et al.*, 1997 ; Kothe & Free, 1998).

De nombreux gènes codant des protéines kinases ont été décrits ces dernières années chez des champignons phytopathogènes (Xu & Hamer, 1996 ; Xu *et al.*, 1998 ; Muller *et al.*, 1999). Leur clonage fait suite à l'étude des protéines des premiers modules des voies de transduction (protéines G, adénylate cyclase...). Les gènes clonés codent différentes protéines kinases (PKA, PKC, MAPKKK). Ces différentes protéines appartiennent parfois chez ces champignons à des mêmes voies de transduction de signaux (par exemple la protéine kinase AMPc dépendante et la MAP kinase de *Magnaporthe grisea* - Thines *et*

al., 2000) et la relation avec le premier module a souvent été démontrée. Leur rôle a été rapporté dans la croissance végétative et la virulence de ces champignons pathogènes (Mayorga & Gold, 1999 ; Andrews *et al.*, 2000 ; Zheng *et al.*, 2000). La protéine codée par le gène *stk*, partiellement décrit au cours de ce travail possède un domaine conservé spécifique des sérine/thréonine protéines kinases et est proche d'une RAF (MAPKKK) humaine. Cette protéine appartient au groupe des protéines kinases et elle pourrait être impliquée dans la transmission de signaux perçus par les protéines G dans les cellules du *Pisolithus*.

Avant d'envisager l'inactivation des gènes codant ces différentes protéines par transformation expérimentale du mycelium de *Pisolithus tinctorius*, il était nécessaire d'étudier l'expression de ces gènes ainsi que leur régulation. J'ai montré que les différents gènes étaient exprimés à un niveau suffisamment décelable chez *P. tinctorius*. J'ai ensuite suivi leur régulation sous l'effet de modifications nutritionnelles. En effet, le déclenchement des voies de transduction et la régulation des niveaux d'expression de nombreux gènes, par le glucose et l'azote, a souvent été rapporté chez les champignons (Gadd, 1994). De plus, les hyphes du *Pisolithus* évoluent habituellement dans le sol qui est un milieu pauvre en sucres. En pénétrant entre les cellules de l'épiderme, puis du cortex racinaire, les hyphes sont en contact avec des concentrations importantes en ressources carbonées directement assimilables (Hampp & Wingler, 1997 ; Smith & Read, 1997).

Les niveaux d'expression des gènes *stk* et *CnB* ne varient pas dans les conditions expérimentales appliquées (forte teneur en glucose et carence en azote), alors que l'expression de *ras*, *Gpa* et *cpc2* est légèrement stimulée (Tableau 2). Les voies de transduction ne sont donc pas régulées de manière forte au niveau transcriptionnel par la disponibilité en glucose et en azote. Cette étude des gènes des voies de transduction n'étant pas exhaustive, il est aussi possible que des signaux engendrés par un changement de concentration en glucose ou azote extracellulaire, passent par d'autres composantes des voies de transduction (par exemple, protéine kinases AMPc ou GMPc dépendante). L'analyse des niveaux d'expression observés pour ces gènes dans l'ectomycorhize de 4 jours ne met pas en évidence de régulation forte. Toutefois, ce stade de développement correspondant à la formation du manteau, il est tout à fait possible qu'une régulation plus précoce ait été occultée. Pour tester cette hypothèse, nous avons regardé l'influence des exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* sur l'expression de ces gènes. Nous avons aussi suivi les effets d'une cytokinine présente dans ces exsudats, la zéatine, qui induit des modifications morphologiques chez *P. tinctorius* (Lagrange, non publié). Dans les conditions testées, les gènes *ras*, *Gpa* et *stk* sont sur-exprimés à différents niveaux (Tableau 2), indiquant l'existence d'une régulation précoce de ces gènes des voies de transduction fongique. Les signaux racinaires régulent donc l'expression de ces gènes avant même que les premiers contacts physiques aient lieu entre les symbiotes. De tels résultats permettraient de discuter de l'existence d'un déterminisme précoce lors de la mise en place de la symbiose.

L'existence dans notre modèle d'étude d'une régulation génique de certains gènes fongiques des voies de transduction se doit d'être complétée par une étude des modifications post-traductionnelles (par exemple acylation, Gao & Nuss, 1998) de ces protéines. De plus, afin de démontrer le rôle de ces protéines en dehors de tout phénomène régulateur (transcription, traduction ou post-traduction), il est nécessaire de pouvoir inactiver les gènes de signalisation par transformation génétique.

Matériel & méthodes

Le matériel et l'ensemble des méthodes que j'ai utilisé pour réaliser ce travail (matériel biologique, extraction des acides nucléiques, analyse moléculaire, analyse de l'expression) sont décrits dans les parties Matériel & Méthodes des articles Voiblet *et al.*, 2001 et Duplessis *et al.*, 2001b, présentés dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse. Elles ne sont pas répétées ici afin d'éviter toute redondance.

Les manipulations expérimentales qui concernent la culture de *Pisolithus* en présence d'exsudats racinaires de l'*Eucalyptus* sont le fait de travaux réalisés par Hubert Lagrange en thèse au sein de l'UMR. Ces parties expérimentales sont reproduites dans son mémoire de DEA (Lagrange, 1997) et dans un article de recherche (Lagrange *et al.*, 2001).

Bibliographie

- Alspaugh J.A., Perfect J.R. & Heitman J. (1997) *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein α subunit GPA1 and cAMP. *Genes and Devel.* **11**, 3206-3217.
- Alspaugh J.A., Perfect J.R., Heitman J. (1998) Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* **25**: 1-14.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Andrews D. L., Egan J. D., Mayorga M. E. & Gold S. E. (2000) The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 781-786.
- Béguiristain T. & Lapeyrie F. (1997) Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytol.* **136**, 525-532.
- Botton B. & Chalot M. (1995) Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizae. In *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. (Edts, Hock B. and Varma A.), Springer-Verlag, pp325-363.

- Bourne H.R., Sanders D.A. & McCormick F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.
- Brun A., Chalot M., Finlay R.D. & Söderström B. (1995) Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* Roth. I. Dynamics of mycorrhiza formation. *New Phytol.* 129, 487-493.
- Charvet-Candela V. (2000) Rôle de l'auxine fongique dans la symbiose ectomycorhizienne *Hebeloma cylindrosporum*/*Pinus pinaster*. Identification et caractérisation de gènes de la plante régulés par l'auxine fongique. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard - Lyon I. pp-158.
- Clapham D.E. (1996) The G-protein nanomachine. *Nature* 379, 297-298.
- Coca M. A., Damsz B., Yun D.-J., Hasegawa P. M., Bressan R. A. & Narasimhan M. L. (2000) Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *Plant J.* 22(1), 61-69.
- Coleman D.E. & Sprang S.R. (1996) How G proteins work: a continuing story. *TIBS* 21, 41-44.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". *Nucleic Acids Res.*, 16 (22), 10881-10890.
- Chardin P. (1994) Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *Médecine/Sciences* 10, 657-664.
- Cohen P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *TIBS* 17, 408-413.
- Dean R. A. (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 211-234.
- Dickman M. B. & Yarden O. (1999) Serine/Threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Gen. Biol.* 26, 99-117.
- Ditengou F.A. & Lapeyrie F. (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13: 151-158.
- Ditengou F.A., Béguiristain T. & Lapeyrie F. (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Planta* 211, 722-728.
- Duplessis S. (1998) Caractérisation et étude de l'expression de gènes des voies de transduction chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. DEA de Biologie Forestière. Université Henri Poincaré - Nancy 1, pp-20.
- Duplessis S., Tagu D. & Martin F. (2001a) Living together underground : a molecular glimpse of the ectomycorrhizal symbiosis In *Molecular biology of fungal development* (Osiewacz, ed.). Mycology Series, Dekker & Dekker, New York, sous presse.
- Duplessis S., Sorin C., Voiblet C., Palin B., Martin F. & Tagu D. (2001b). Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. Soumis à *Cur. Genet.*

- Encelot N. (2000) Caractérisation du transcriptome des arbres forestiers. Etude de l'expression génique de l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius*, des racines et des feuilles de *Populus x interamericana*. DEA de Biologie Forestière. Université Henri Poincaré - Nancy 1, pp-20.
- Gadd G.M. (1994) Signal transduction in fungi. In *The Growing Fungus*, (Edts, Gow N.A.R., Gadd G.M). Chapman & Hall, London, pp 183-210.
- Gao S. & Nuss D.L. (1996) Distinct roles for two G protein α subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14122-14127.
- Gao S. & Nuss D. L. (1998) Mutagenesis of putative acylation sites alters function, localization, and accumulation of a $G\alpha$ subunit of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1130-1135.
- Gea L., Normand L., Vian B. & Gay G. (1994) Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait) Sol. Formed by an IAA-overproducer mutant of the fungus *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. *New Phytol.* **128**, 659-670.
- Gold S.E., Brogdon S.M., Mayorga M.E. & Kronstad J.W. (1997) The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation maize. *Plant Cell* **9**, 1585-1594.
- Hampp R. & Wingler A. (1997) The role of mycorrhiza. In *A molecular approach to primary metabolism in higher plants*. (Edts, Foyer C. & Quick W.P.) Taylor & Francis, London, pp275-292.
- Hilbert J.L., Costa G. & Martin F. (1991) Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiol.* **97**, 977-984.
- Hirsch A.M. & McFall-Ngai M.J. (2000) Fundamental concepts in symbiotic interactions: light and dark, day and night, squid and legume. *J. of Plant Growth Regul.* **19**, 113-130.
- Hirt H. (1999) Transcriptional upregulation of signaling pathways: more complex than anticipated? *TIPS* **4**, 7-8.
- Hoffmann B., Mosch H.U., Sattlegger E., Barthelmess I.B., Hinnebusch A., Braus G.H. (1999) The WD protein Cpc2p is required for repression of Gcn4 protein activity in yeast in the absence of amino-acid starvation. *Mol. Microbiol.* **31**, 807-822.
- Horan D.P., Chilvers G.A. & Lapeyrie F. (1988) Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytol.* **109**, 451-458.
- Hunter T. (2000) Signalling—2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Janoueix-Lerosey I. (1993) Mode d'action et rôle biologique des protéines de la superfamille ras. *Regard sur la Biochimie* **1**, 44-56.
- Janoueix-Lerosey I. (1995) Signalisation intracellulaire par les protéines de la superfamille ras. *Regard sur la Biochimie* **1**, 21-31.
- Kahmann R., Basse C. & Feldbrügge M. (1999). Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis* maize pathosystem. *Cur. Opin. Microbiol.* **2**: 647-650.

- Karin M. & Smeal T. (1992) Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *TIBS* 17, 418-426.
- Kasahara S. & Nuss D.L. (1997) Targeted disruption of a fungal G-protein β subunit gene results in increased vegetative growth but reduced virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 984-993.
- Kothe G. O. & Free S. J. (1998) Calcineurin subunit B is required for normal vegetative growth in *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Biol* 23, 248-258.
- Lagrange H. (1997) Echanges de signaux lors de l'interaction précoce entre *Eucalyptus globulus* et le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*: rôle de quelques flavonoïdes racinaires. DEA de Biologie Forestière. Université Henri Poincaré - Nancy 1, pp-20.
- Lagrange H., Jay-Allemand C. & Lapeyrie F. (2001). Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytol.* 149(2), 349-355.
- Lambright D.G., Sondek J., Bohm A., Skiba N.P., Hamm H.E. & Sigler P.B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 211-319.
- Laurent P. (1991) Evolution des protéines solubles et quantification de certaines enzymes de la glycolyse de la mycorhize d'*Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius*. DEA de Biologie Forestière. Université Henri Poincaré - Nancy 1, pp-26.
- Li D., Rogers L. & Kolattukudy P.E. (1997) Cloning and expression of cDNA encoding a mitogen-activated protein kinase from a phytopathogenic filamentous fungus. *Gene* 195, 161-166.
- Liu S. & Dean R.A. (1997) G protein α subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 1075-1086.
- Lorenz M.C., Pan X., Harashima T., Cardenas M. E., Xue Y., Hirsch J. P. & Heitman J. (2000) The G protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 609-622.
- Luan S. (1998) Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *TIPS* 3, 271-275.
- Ma H. (1994) GTP-binding proteins in plants: new members of an old family. *Plant Mol. Biol.* 26, 1611-1636.
- Martin F. & Botton B. (1993) Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. *Adv. Plant Pathol.* 9, 83-102.
- Martin F. & Voiblet C. (1998) Large scale sequencing of anonymous cDNA clones. In *Mycorrhiza manual*. (Edts, Varma A.), Springer Lab Manual, pp475-493.
- Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C. & Lapeyrie F. (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis : signals and communication genes, *New Phytol.*, sous presse.

- Mayorga M. E. & Gold S. E. (1999) A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol. Microbiol.* **34**, 485-497.
- Mitchell T.K. & Dean R.A. (1995) The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **7**, 1869-1878.
- Moodie S. A. & Wolfman A. (1994) The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *TIG* **10**, 44-48.
- Muller P., Aichinger C., Feldbrugge M. & Kahmann R. (1999) The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.*, **34** (5), 1007-1017.
- Müller F., Krüger D., Sattlegger E., Hoffmann B., Ballario P., Kanaan M. & Barthelmess I.B. (1995) The *cpc-2* gene of *Neurospora crassa* encodes a protein entirely composed of WD-repeat segments that is involved in general amino acid control and female fertility. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 162-173.
- Nehls U., Beguiristain T., Ditengou F., Lapeyrie F. & Martin F. (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta*, 296-302.
- Odom A., Muir S., Lim E., Toffaletti D.L., Perfect J. & Heitman J. (1997) Calcineurine is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO J.* **10**, 2576-2589.
- Plassard C., Chalot M., Botton B. & Martin F. (1997) Le rôle des ectomycorhizes dans la nutrition azotée des arbres forestiers. In *Champignons et mycorhizes en forêt*. Revue Forestière Française, numéro spécial, pp82-98.
- Prokish H., Yarden O., Dieminger M., Tropshug M & Barthelmess I. B. (1997) Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca^{2+} gradient. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 104-114.
- Regenfelder E., Spellig T., Hartmann A., Lauenstein S., Bölker M. & Kahmann R. (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals ? *The EMBO J.* **16**, 1934-1942.
- Reuther G. W. & Der C. J. (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Cur. Opin. Cell Biol.* **12**, 157-165.
- Roze L. V., Mahanti N., Mehig R., McConnell & Linz J. E. (1999) Evidence that Mras1 and Mras3 proteins are associated with distinct cellular functions during growth and morphogenesis in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet. Biol.* **28**, 171-189.
- Rupp L. A & Mudge K. W. (1985) Etephon and Auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ culture of Mugo pine. *Physiol. Plant.* **64**, 316-322.
- Salzer P., Hebe G. & Hager A. (1997) Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K^{+} and Cl^{-} release, extracellular alkalinisation and H_2O_2 synthesis of *Picea abies* cells. *Planta* **203**, 470-479.
- Scheffzek K., Reza Ahmadian M. & Wittinghoffer A. (1998) GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *TIBS* **23**, 257-260.

- Simoneau P., Viémont J.D., Moreau J.C. & Strullu D.G. (1993) Symbiosis-related polypeptides associated with the early stages of ectomycorrhiza organogenesis in birch (*Pendula betula* Roth). *New Phytol.* **124**, 495-504.
- Smith S.E. & Read D.G. (1997) Section 2: Ectomycorrhizas / Structure and development of ectomycorrhizal roots. In *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, New-York, pp 163-232.
- Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K. & Neer E. J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *TIBS* **24**, 181-185.
- Sondek J., Bohm A., Lambright D.G., Hamm H.E. & Sigler P.B. (1996) Crystal structure of a G_A protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* **379**, 369-374.
- Sternberg P. W. & Han M. (1998) Genetics of RAS signaling in *C. elegans*. *TIG* **14**, 466-472.
- Tagu D. & Martin F. (1995) Expressed sequence tags of random selected cDNA clones from *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 781-783.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thines E., Weber R.W. & Talbot N.J. (2000) MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, **12** (9), 1703-1718.
- Truesdell G. M., Yang Z. & Dickman M. B. (2000) A G α subunit gene from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum trifolii* is required for conidial germination. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **56**, 131-140.
- Vivin P., Martin F. & Guehl J-M (1996) Acquisition and within-plant allocation of ¹³C and ¹⁵N in CO₂- enriched *Quercus robur* plants. *Physiol. Plant.* **98**, 89-96.
- Voiblet C. (1999) Etude des modifications du transcriptome d'*Eucalyptus globulus* et *Pisolithus tinctorius* au cours du développement de la symbiose ectomycorhizienne. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, pp-133.
- Voiblet C., Duplessis S., Encelot N. & Martin F. (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant J.* **25** (2), 181-192.
- Wallenda T., Strober C., Högbom H., Schinkel H., George E., Högbom P. & Read D. J. (2000) Nitrogen uptake processes in roots and mycorrhizas. *Carbon and Nitrogen Cycling in European Forest Ecosystems* Ecological Studies 142, ED Schulze (ed.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 122-143.
- Xu J-R. & Hamer J.E. (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes and Devel.* **10**, 2696-2706.
- Xu J-R. , Staiger C.J. & Hamer J.E. (1998) Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (21), 12713-12718.

- Yang Z. (1996) Signal transducing proteins in plants: an overview. *In* Signal transduction in plant growth and development. (Edts, Verma D.P.S.), Springer-Verlag, Wien, New York, pp1-37.
- Yarwood S. J., Steele M. R., Scotland G., Houslay M. D. & Bolger G. B. (2000) The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J. Biol. Chemistry* **247**, 14909-14917.
- Zheng L., Campbell M., Murphy J., Lam S. & Xu J-R. (2000) The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 724-732.

Discussion générale

L'activité de recherche menée au cours de cette thèse de Doctorat concerne essentiellement l'étude du développement et du fonctionnement de l'association ectomycorhizienne des arbres forestiers. Dans le cadre de ce programme développé au sein de l'UMR INRA/UHP, "Interactions Arbres/Micro-Organismes", il s'agit de caractériser les interactions plantes-champignons et de comprendre les mécanismes permettant l'intégration de la symbiose dans la biologie de la plante et du mycobionte. Cette problématique s'étend au-delà des interactions mycorhiziennes ; elle s'intègre pleinement à l'étude des interactions plantes-microorganismes visant à appréhender les processus relationnels établis au cours de l'évolution entre les plantes et leurs partenaires symbiotiques, mutualistes ou phytopathogènes.

Le développement et le fonctionnement des ectomycorhizes est sous le contrôle génétique des deux partenaires (Rosado *et al.*, 1994a, Rosado *et al.*, 1994b, Tagu *et al.*, 2001). Ce contrôle s'exerce sur : les processus de reconnaissance plante-hôte/champignon, la colonisation des tissus racinaires, la morphologie de la racine et des tissus fongiques et la réorganisation du métabolisme des symbiotes. La compréhension des mécanismes moléculaires induisant et accompagnant l'établissement de l'ectomycorhize constitue donc l'objectif majeur de ces études (Martin *et al.*, 1997). La découverte en 1988 de protéines dont la synthèse est régulée par la symbiose (protéines SR) a confirmé l'activation ou la répression de certains programmes géniques lors du développement et du fonctionnement de l'ectomycorhize (Hilbert & Martin 1988). Ainsi, par des approches complémentaires (séquençage de protéines SR, gènes candidats, criblage différentiel d'ADNc) les recherches conduites sur l'expression des gènes ont permis de cloner une dizaine de gènes exprimés et régulés lors de la formation et du fonctionnement de la symbiose, dont des protéines pariétales fongiques : les hydrophobines et les SRAPs (Tagu *et al.*, 1996 ; Laurent *et al.*, 1999). Toutefois, de manière à obtenir une vision globale des fonctions exprimées et des gènes régulés, une approche d'ingénierie génomique a été initiée (Voiblet, 1999) afin (1) d'identifier l'ensemble des fonctions cellulaires en activité dans la symbiose et (2) d'obtenir une image plus large des changements de l'expression génique. Ce projet repose sur l'obtention de milliers d'ESTs et l'analyse de l'expression génique par filtres d'ADNc. De plus, compte-tenu de leur importance dans le processus de différenciation symbiotique, il s'agit également de poursuivre une étude détaillée des gènes et des protéines fongiques de l'interface symbiotique (hydrophobines de la paroi et de la matrice extracellulaire), des membranes plasmalemmiques (FUN34, ...) et impliquées dans les fonctions cellulaires critiques pour la morphogenèse symbiotique (signalisation, cytosquelette, contrôle du cycle cellulaire...).

Ce projet a nécessité, dans un premier temps, la mise en place des outils expérimentaux indispensables à l'obtention de centaines d'étiquettes de gènes exprimés (ESTs) dans la symbiose et à l'établissement de leur profil d'expression dans les partenaires non associés et dans l'ectomycorhize. Il s'agissait (1) de construire une banque d'ADNc d'ectomycorhize d'*E. globulus* – *P. tinctorius*, (2) d'isoler

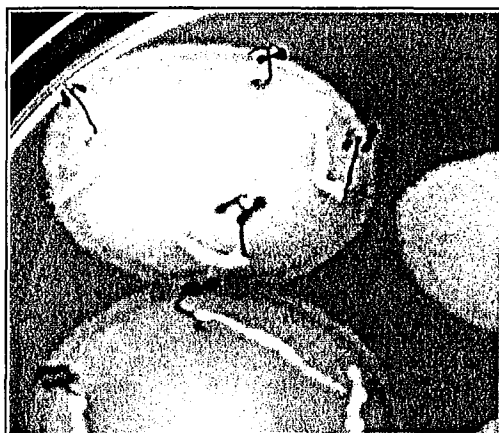
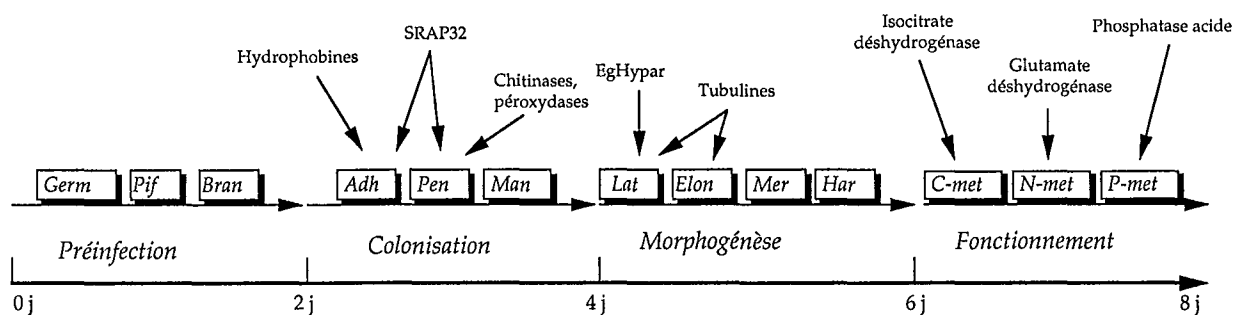


Figure 1 : Modèle 1, racines d'*Eucalyptus globulus* mycorhizées par le Basidiomycète *Pisolithus tinctorius* selon la technique développée par Malajczuk *et al.*, (1990). Dans ce système expérimental, la racine est contrainte à un développement plagiotrope. Les germinations d'*E. globulus* âgées d'une semaine sont déposées à la surface du tapis mycélien de *P. tinctorius* âgé de 3 semaines. Les racines sont mycorhizées par le champignon en moins de 10 jours.



Développement de l'ectomycorhize Eucalyptus - Pisolithus in vitro (Malajczuk et al., 1990)

Figure 2. Exemple de gènes régulés par la symbiose ectomycorhizienne. La différenciation *in vitro* de l'ectomycorhize d'*Eucalyptus* - *Pisolithus* peut se subdiviser en quatre étapes principales : préinfection (phase rhizosphérique), colonisation, morphogénèse et fonctionnement. SRAP32, Symbiosis Regulated Acidic Polypeptide (32 KDa) ; EgHypar, protéine induite par la présence d'hypaphorine ou d'auxine ; *Germ*, germination des spores ; *Pif*, préinfection, croissance des hyphes ; *Bran*, ramification des hyphes ; *Adh*, adhérence des hyphes à la surface de la racine ; *Pen*, pénétration des hyphes entre les cellules épidermiques ; *Man*, aggrégation des hyphes pour former le manteau ; *Lat*, formation de racines latérales ; *Elon*, élongation radiale des cellules épidermiques ; *Mer*, modification de l'activité méristématique ; *Har*, différenciation du réseau de Hartig ; *C-met*, *N-met*, *P-met*, modifications des métabolismes C, N et P, incluant les transferts entre les symbiotes (d'après Martin & Tagu, 1999).

des centaines de clones d'ADNc et de les séquencer (ESTs), (3) d'annoter ces séquences dans une base de données et (4) de produire des filtres d'ADNc.

Les études effectuées au cours de cette thèse ont consisté à (1) participer à la première étude de l'expression génique de l'ectomycorhize d'*E. globulus* - *P. tinctorius* à l'aide de filtres à faible densité en ADNc (Chapitre 2, Voiblet *et al.*, 2001), (2) élargir cette analyse en étudiant la régulation de ces gènes au cours des différentes étapes de la formation de l'ectomycorhize en utilisant des filtres à haute densité d'ADNc (Chapitre 2, Duplessis & Martin, 2001), (3) développer au laboratoire les méthodes d'analyse statistique bioinformatique des données d'expression des gènes SR et, (4) approfondir le mode de régulation des gènes fongiques codant des protéines pariétales, les hydrophobines et de certaines protéines des voies de transduction (Chapitres 3 et 4, Duplessis *et al.*, 2001).

Dans cette discussion, j'aborderai tout d'abord les facteurs qui ont déterminé le choix des modèles ectomycorhiziens. Ensuite, je rappellerai et je discuterai les résultats obtenus à l'issue du séquençage de près de 1000 ESTs d'ectomycorhize d'*E. globulus* - *P. tinctorius*. J'interpréterai les profils d'expression des gènes analysés par filtres d'ADNc au cours des différentes étapes de la formation de l'ectomycorhize, en soulignant certains aspects méthodologiques, avant de discuter l'expression des gènes d'hydrophobines et des voies de transduction de signaux de *Pisolithus tinctorius* cultivé dans différentes conditions expérimentales.

Analyse du transcriptome de l'ectomycorhize d'Eucalyptus-Pisolithus

Choix du modèle ectomycorhizien et du stade de développement

Le modèle expérimental *E. globulus* et *P. tinctorius* est utilisé depuis 1986 au laboratoire : il permet l'obtention rapide d'ectomycorhizes en conditions contrôlées (boîtes de Pétri). Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux systèmes *in vitro* différents présentant chacun des avantages et des inconvénients.

Le premier système (Malajczuk *et al.*, 1990 ; Hilbert *et al.*, 1991) permet l'obtention de mycorhizes sur la racine pivot de jeunes germinations d'eucalyptus, avant l'apparition des racines secondaires (**Figure 1**). Les conditions de synthèse sont loin des conditions naturelles de mycorhization : la racine a une croissance plagiotrope, elle se développe à la lumière et c'est la radicule qui est colonisée. De plus, les jeunes germinations étant mises directement au contact de la colonie fongique, elle se retrouve confrontée en quelques minutes à une biomasse fongique importante. Dans les conditions naturelles, ce sont les racines secondaires qui sont le plus souvent colonisées par le mycobionte, et le contact entre les deux partenaires se fait progressivement, après l'échange de signaux moléculaires agissant probablement par gradient de concentrations. Cependant, ce système gnotobiotique a l'énorme avantage de produire des mycorhizes dont le développement est synchrone et de permettre la récolte de plusieurs centaines d'ectomycorhizes à un stade de développement déterminé. De plus, nous disposons sur ce modèle *Eucalyptus* - *Pisolithus in vitro* de nombreuses informations morphologiques et cytologiques (Malajczuk *et al.*, 1990 ; Rabbani *et al.*, 1992 ;

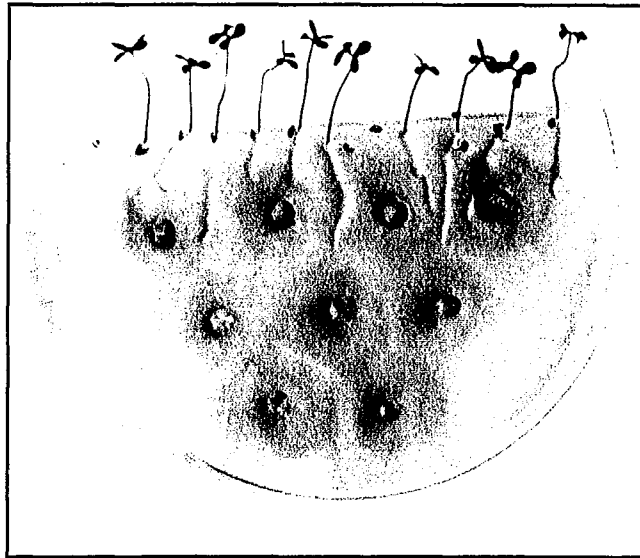


Figure 3 : Modèle 2, système racinaire d'*Eucalyptus globulus* mycorhizé par le basidiomycète *Pisolithus tinctorius* selon la technique développée par Burgess *et al.* (1996). Dans ce système expérimental, le système racinaire (racines pivots et latérales) a un développement orthotrope. Le mycélium de *P. tinctorius* est inoculé dans les deux tiers inférieurs de la boîte de Pétri. Après 10 jours, les graines d'*E. globulus* sont mises à germer dans le tiers supérieur de la boîte dépourvu d'agar. La germination des graines, la croissance des racines et la croissance des hyphes se déroulent simultanément. Lorsque les racines latérales rencontrent le mycélium, la mycorhize commence à se former.

Dexheimer *et al.*, 1994). Des analyses métaboliques ont démontré la présence d'échanges nutritionnels entre la plante et le champignon (Rabbani *et al.*, 1992). Enfin, ce modèle a été utilisé pour un grand nombre d'analyses d'expression de gènes et de protéines (Figure 2 ; Martin & Tagu 1999). C'est sur ce système expérimental que la première description du transcriptome de l'ectomycorhize a été obtenue (Voiblet *et al.*, 2001). Lors de cette première étude, nous avons utilisé des ectomycorhizes âgées de 4 jours. A ce stade de développement intermédiaire, les mycorhizes sont en cours de formation. L'agrégation du manteau fongique et du réseau de Hartig est bien initiée et un allongement des cellules rhizodermiques, ainsi que la perte des poils absorbants des racines, sont déjà visibles (Malajczuk *et al.*, 1990 ; Dexheimer *et al.*, 1994 ; Carnero Diaz, 1996 ; Ditengou *et al.*, 2000). Enfin, après quatre jours de contact, la réorganisation des voies métaboliques est en cours (Rabbani *et al.*, 1992 ; Boiffin, 1997 ; Boiffin *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 1998). Ainsi, le stade de développement choisi était certainement le plus propice à l'identification des gènes impliqués dans la construction des structures (événements précoces) et dans le fonctionnement métabolique (événements tardifs) propre à la symbiose.

Le second système expérimental de mycorhization *in vitro* a été développé par Burgess *et al.*, (1996) et permet le développement simultané du système racinaire d'eucalyptus et du mycélium du mycobionte. Les graines sont mises à germer à l'obscurité dans une boîte de Pétri à distance d'implants fongiques préalablement inoculés (Figure 3). Ainsi, la germination des graines, le développement de la racine pivot, et la croissance du mycélium se font simultanément, permettant un échange progressif des signaux moléculaires nécessaires à la reconnaissance des deux partenaires. Les racines latérales d'ordre 2 se développent et sont colonisées par le mycélium, alors que la croissance rapide orthotrope du pivot empêche sa mycorhization (Dexheimer *et al.*, 1994). Ce système de mycorhization *in vitro* est vraisemblablement plus proche des ectomycorhizes telles qu'elles se développent dans la litière. Cependant, ce système présente le désavantage de générer des mycorhizes dont les stades de développement ne sont pas synchronisés (il n'y a pas synchronisation de l'apparition des racines latérales). Nous avons décidé d'utiliser ce système expérimental afin de disposer à la fois des données obtenues sur le modèle des racines pivots mycorhizées et pour la racine entière portant des racines latérales mycorhizées. De plus, nous avons abordé la régulation temporelle de l'expression des gènes de l'ectomycorhize d'*E. globulus-P. tinctorius*, lors des différentes étapes de développement symbiotique. L'objectif est de déterminer si la mycorhization induit des profils d'expression variés aux différents stades de développement : phase de colonisation (4 jours post-contact), formation du manteau (7 et 12 jours post-contact), pénétration et croissance intra-racinaire (7, 12 et 15 jours post-contact) et activité métabolique (15, 21 et 28 jours post-contact).

Fonctions cellulaires exprimées dans l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* lors de la formation du manteau fongique : analyse des ESTs.

Les fonctions cellulaires exprimées dans l'ectomycorhize d'*E. globulus-P. tinctorius* lors de la différenciation du manteau fongique (racines plagiotropes mycorhizées, 4 jours post contact) ont été caractérisées en analysant la nature des EST exprimées dans les tissus symbiotiques (Voiblet 1999). Cette analyse a été effectuée sur un premier lot de 650 ADNc et a été complétée en collaboration avec

Nathalie Encelot (Encelot 2000) afin d'atteindre un millier d'EST. Ces EST proviennent de deux types de criblages d'une banque d'ADNc d'ectomycorhizes *Eucalyptus-Pisolithus* de 4 jours (Voiblet, 1999). Cette banque a été établie selon un protocole (CLONTECH) basé sur la reconnaissance de la coiffe méthylguanoside dans la partie 5' des ARN messagers, par l'hybridation d'un oligonucléotide spécifique dans cette partie 5' et de l'amplification d'ADNc par RT-PCR. Ce protocole permet un enrichissement de la banque en ADNc pleine longueur (Diatchenko *et al.*, 1996 ; Sasaki *et al.*, 1998). L'étape d'amplification par PCR des ADNc n'entraîne pas de biais dans la population d'ADNc amplifiés par rapport à la population d'ARNm de départ. Sasaki *et al.* (1998) ont utilisé ce protocole pour la construction d'une banque de blastocystes de souris et ne soulignent aucun biais dans la représentation des transcrits. A partir de cette banque d'ADNc, nous avons récupéré **aléatoirement** environ 1000 clones bactériens (Voiblet *et al.*, 2001) lors d'un premier criblage aléatoire. Parmi ces ADNc, environ 700 ont été partiellement séquencés, avec succès, à partir de leur extrémité 5'. Environ 75% de ces clones possèdent un codon ATG (début de traduction) et 71% seraient des clones pleine longueur, possédant à la fois le codon ATG et une queue polyA⁺. Un second **criblage différentiel** par SSH (Hybridation Soustractive et Suppressive, CLONTECH) a permis de caractériser 182 EST supplémentaires. Ces EST correspondent à des gènes de mycorhize différentiellement exprimés par rapport à la racine non mycorhizée et au mycélium libre (Voiblet & Martin, 1999 ; Encelot, 2000 ; Voiblet *et al.*, 2001).

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été éditées (élimination des séquences correspondant au vecteur, correction des bases ambiguës), puis comparées aux séquences répertoriées dans les bases de données internationales à l'aide du programme WU-BlastX 2.0 (Altschul *et al.*, 1997). Les comparaisons de séquences ont été réalisées sur le site Web du Baylor College of Medicine (Beauty). Ce dernier permet une analyse automatique groupée (en batch) grâce à un script MacPerl, MacSearchLauncher (<ftp://dot.imgen.bcm.tcm.edu/pub/software/search-launcher>).

Les résultats obtenus au cours de ces différents criblages d'ADNc ont été comparés. Plus de 50% des gènes collectés par la technique de SSH sont des gènes SR (Voiblet, 1999 ; Voiblet & Martin, 1999). Cette efficacité de la SSH à cloner des gènes différentiellement exprimés ou spécifiques d'un tissu a déjà été soulignée (Diatchenko *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 1999). Il faut noter cependant la présence de 18,6% d'ARNr 28S récupérés par SSH. L'analyse de ces séquences d'ADNr indique l'existence d'une séquence longue très riche en A qui a probablement été reconnue par l'amorce polyT lors de la synthèse par la transcriptase inverse du premier brin d'ADNc. Environ 50% des ESTs présentent une similitude avec des séquences présentes dans GenBank. Les séquences annotées sont répertoriées sur le serveur Web du laboratoire (<http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>).

La répartition quantitative des différentes protéines homologues en catégories correspondant aux grandes fonctions biochimiques indique que plus de 30% des gènes exprimés dans l'ectomycorhize codent des protéines impliquées dans la synthèse des ARNm/protéines (protéines ribosomiques, sous-unités du protéasome, facteurs d'élongation). Près de 13% des gènes identifiés codent des protéines du métabolisme primaire ou secondaire (ATP synthase, glyceraldéhyde-3-P déshydrogénase, alanine aminotransférase). Plus de 15% des séquences exprimées codent des

protéines pariétales (SRAPs, hydrophobines, extensines). Cette image correspond bien à l'activité d'un organe en construction à forte activité assimilatrice.

Parmi les 324 protéines pour lesquelles une fonction potentielle a été établie, 89% partagent une homologie avec des protéines dont la fonction est connue et 11% avec des protéines identifiées, mais dont la fonction n'est pas élucidée (SRAP17, FUN34). Quarante quatre pour cent des ESTs homologues présentent une similarité avec des séquences d'origine fongique, essentiellement avec les levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*), *Neurospora crassa* ou le Basidiomycète *Agaricus bisporus*. Trente sept pour cent des ESTs sont similaires à des séquences d'origine végétale et notamment d'*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max* et *Zea mays*. Enfin, 19% des séquences présentent une homologie avec divers organismes Eucaryotes ou Procaryotes comme *Homo sapiens* ou *Mus musculus*. Nous avons classé ces ESTs (<http://mycor.nancy.inra.fr/pages/DNAatabases/EctomycorrhizaDB.html>) selon la fonction cellulaire potentielle qui leur a été assignée, en 8 catégories définies dans la base EGAD (Expressed Gene Anatomy Database : <http://www.tigr.org/tdb/egad/egad.html>).

Nous pouvons remarquer que la majorité des ADNc clonés est homologue de gènes codant des fonctions de ménage (30,5%). Ceci confirme que l'ectomycorhize est formée de tissus très actifs, lieu de synthèse protéique importante puisque lors de la différenciation de l'ectomycorhize, les hyphes fongiques se multiplient abondamment pour former le manteau et le réseau de Hartig (Massicotte *et al.*, 1990). Le transcriptome de nombreux tissus humains présente un très fort pourcentage (environ 30%) de gènes liés à l'expression des gènes et à la synthèse des protéines (Adams *et al.*, 1995) et la même observation a pu être faite au regard des analyses génomiques menées chez différents champignons (Goffeau *et al.*, 1996 ; Nelson *et al.*, 1997 ; Ospina-Giraldo *et al.*, 2000 ; Qutob *et al.*, 2000) ou plantes (Hofte *et al.*, 1993 ; Newman *et al.*, 1994 ; Györgyey *et al.*, 2000 ; White *et al.*, 2000).

Enfin, environ 15% des gènes inventoriés par cette étude correspondent à des protéines structurales et 13% à des polypeptides intervenant dans les voies de transduction de signaux. Ceci confirme l'importance de la communication cellulaire et de la restructuration des parois lors du développement de l'ectomycorhize (Martin *et al.*, 1999 ; Martin *et al.*, 2001)

Grâce aux ESTs que nous avons produites, nous avons pu obtenir, pour la première fois, une image globale des fonctions exprimées dans une ectomycorhize. Toutefois, la production de près de 1000 ESTs ne constitue que l'ébauche d'un inventaire des gènes exprimés dans la symbiose. En effet, il est probable que le nombre de gènes présents chez *Eucalyptus globulus* soit proche de celui d'*Arabidopsis thaliana* (soit 25 000 gènes environ ; The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) et que *Pisolithus tinctorius* se rapproche des ascomycètes *Neurospora crassa* et *Aspergillus nidulans* pour lesquels environ 12 000 gènes ont été identifiés.

Construction et analyse des filtres à faible densité en ADNc.

Après cette phase d'inventaire, les ADNc séquencés ont été déposés sur des filtres d'ADNc, à faible densité (96 ADNc par filtre), pour mesurer le niveau d'expression des gènes. Ces étapes ont nécessité

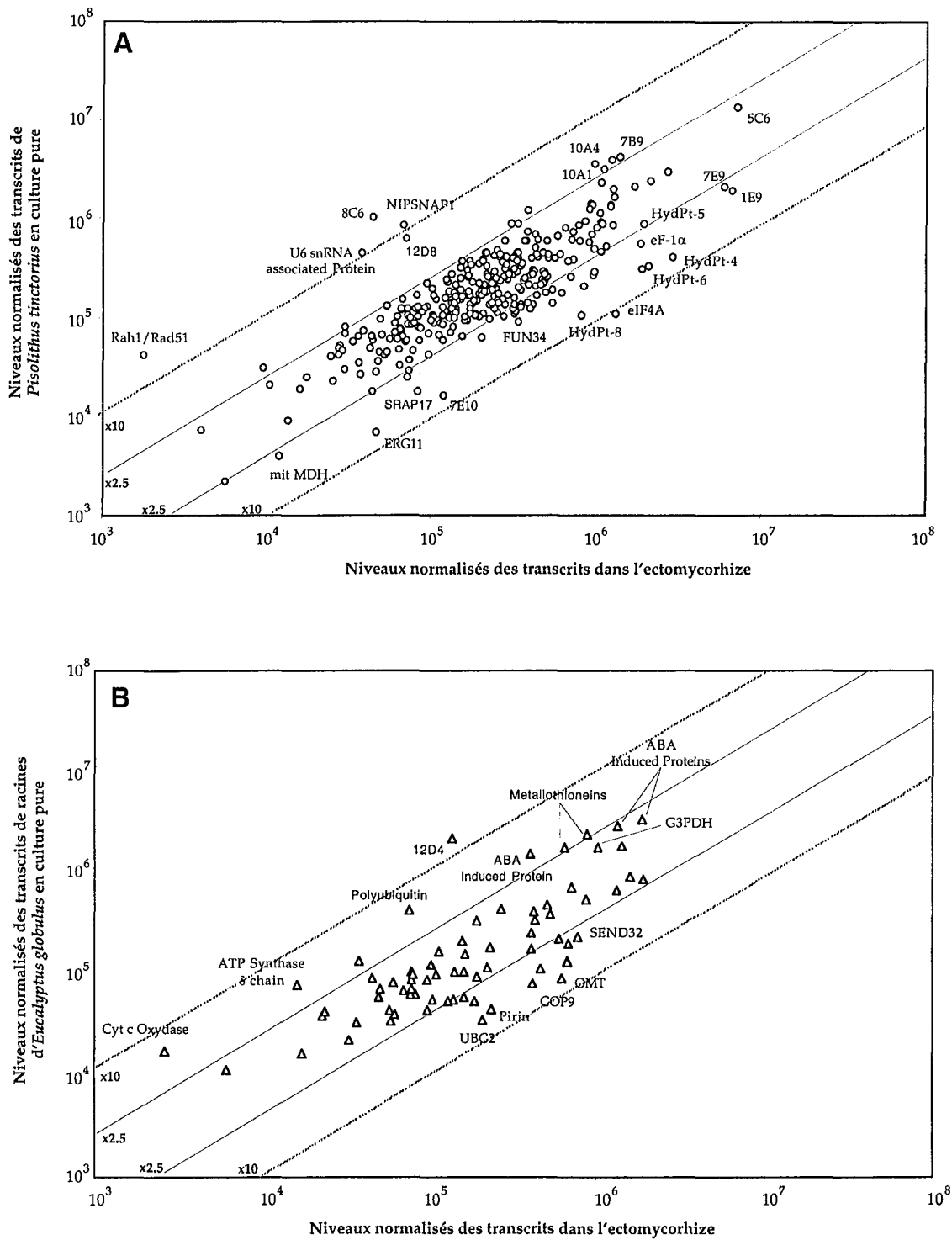


Figure 4 : Comparaison du niveau d'expression de 400 gènes fongiques et racinaires dans l'ectomycorhize de 4 jours et chez les deux partenaires non associés. Les ectomycorhizes sont produites par le système *in vitro* du modèle 1 (figure 1). Pour chaque gène, le niveau de transcrit a été mesuré chez le champignon *Pisolithus tinctorius* (A), dans la racine d'*Eucalyptus globulus* non mycorhizée (B) et dans l'ectomycorhize (axe des abscisses dans A et B) et reporté sur un graphique. Les gènes qui sont localisés entre les deux lignes pleines (régulation $\times 2,5$) sont considérés, pour des raisons de reproductibilité, comme n'étant pas affectés par le développement de l'ectomycorhize. Les gènes dont le niveau de régulation est supérieur à 10 fois se trouvent au delà des lignes pointillées.

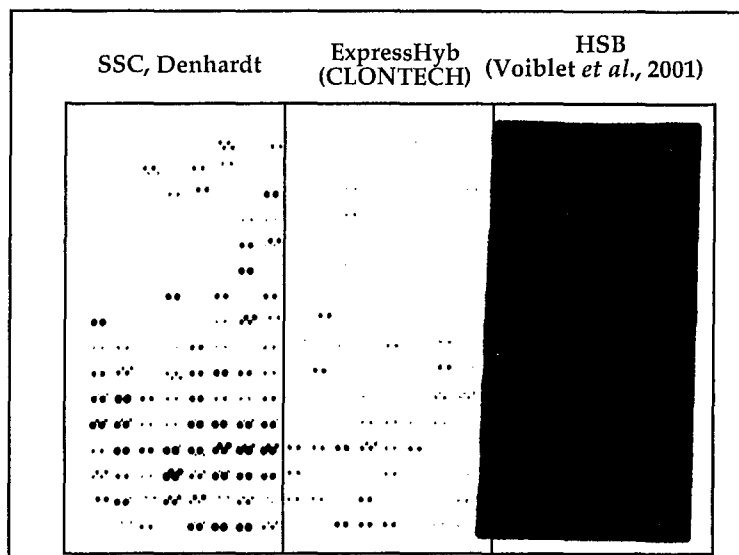
de nombreuses optimisations techniques (Voiblet, 1999) et nous nous sommes attachés par la suite à développer l'analyse de filtres à haute densité en ADNc (2000 ADNc par filtre).

La première approche a été de déposer manuellement des séries de 96 clones ADNc, amplifiés par PCR, sur filtres de Nylon. Nous avons ainsi généré plusieurs ensembles de filtres portant au total plus de 450 ESTs, correspondant aux gènes étudiés et à des gènes marqueurs fongiques et racinaires. Les gènes correspondant aux ESTs ont été ordonnés par fonctions cellulaires sur les filtres (métabolisme, expression, stress...) et nous avons suivi leur expression chez chacun des partenaires en culture pure et dans l'ectomycorhize au moment de la formation du manteau fongique (4 jours après contact).

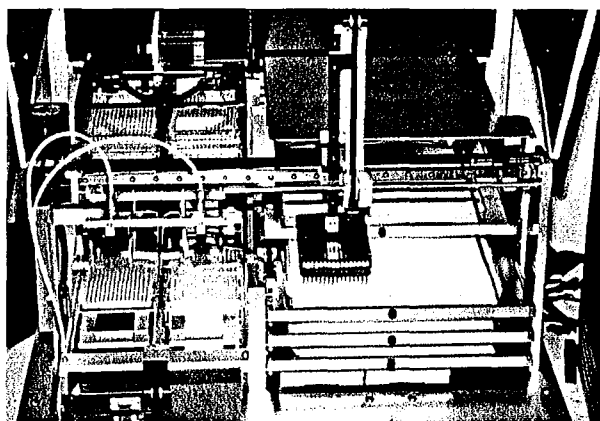
Nous avons ainsi obtenu les profils d'expression de 400 gènes (328 gènes fongiques et 72 gènes racinaires), générant ainsi la première analyse de transcriptome d'une ectomycorhize (Voiblet *et al.*, 2001). Dans l'ectomycorhize développée sur la racine plagiotrope d'*Eucalyptus*, 17 % des gènes sont régulés (niveau de régulation $\geq 2,5$) à la fois dans la racine et le champignon (Figures 4A et 4B). Toutefois, les profils d'expression obtenus n'ont pas mis en évidence des gènes spécifiques uniques de la symbiose. Le gène le plus fortement stimulé ($\times 12$), *eIF4a*, code un facteur d'initiation de la traduction de la famille des "dead-box" hélicases d'origine fongique. D'autres gènes impliqués dans la traduction, tel que le facteur de transcription *tef1*, sont stimulés indiquant une régulation de la traduction. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de la biosynthèse des protéines fongiques observés dans l'association *E. globulus*-*P. tinctorius* (Hilbert *et al.*, 1991) liée à la forte activité de division cellulaire des hyphes mycéliens lors de la colonisation du système racinaire. Chez le champignon, l'expression de deux familles de gènes codant des protéines pariétales abondantes (SRAP32 et hydrophobines) sont également fortement stimulées. La forte synthèse de ces protéines pariétales fongiques avait été préalablement observée par 2D-PAGE et par l'analyse des niveaux de transcrits par Northern blots (Tagu *et al.*, 1996 ; Laurent *et al.*, 1999), validant les données acquises par filtres d'ADNc (Figure 4A). Chez *Eucalyptus globulus* (Figure 4B), les gènes fortement stimulés comprennent ceux codant une 7-O-méthyltransférase (synthèse des phénylpropanoïdes) et de nombreux composants des voies de dégradation des protéines (ubiquitine/protéasome). Ce résultat conforte les observations effectuées par 2D-PAGE d'une dégradation des protéines racinaires au cours du développement de l'ectomycorhize (Hilbert *et al.*, 1991). Il est à noter que de nombreux gènes réprimés dans la symbiose appartiennent à l'hôte végétal : ils sont impliqués notamment dans les réactions de stress et le métabolisme respiratoire. Enfin, parmi les gènes SR mis en évidence dans cette étude se trouvent de nombreux gènes sans fonction connue. Ces gènes pourraient coder des fonctions spécifiques à la morphogénèse mycorhizienne.

A ce stade de la thèse, nous disposons donc d'outils solides pour analyser le transcriptome symbiotique. Nous avons cherché à compléter l'analyse du développement de la symbiose ectomycorhizienne en suivant les profils d'expression au cours d'une cinétique de mycorhization. Nous supposons qu'à chaque phase du développement symbiotique correspondaient des profils d'expression spécifiques (régulons).

A



B



C

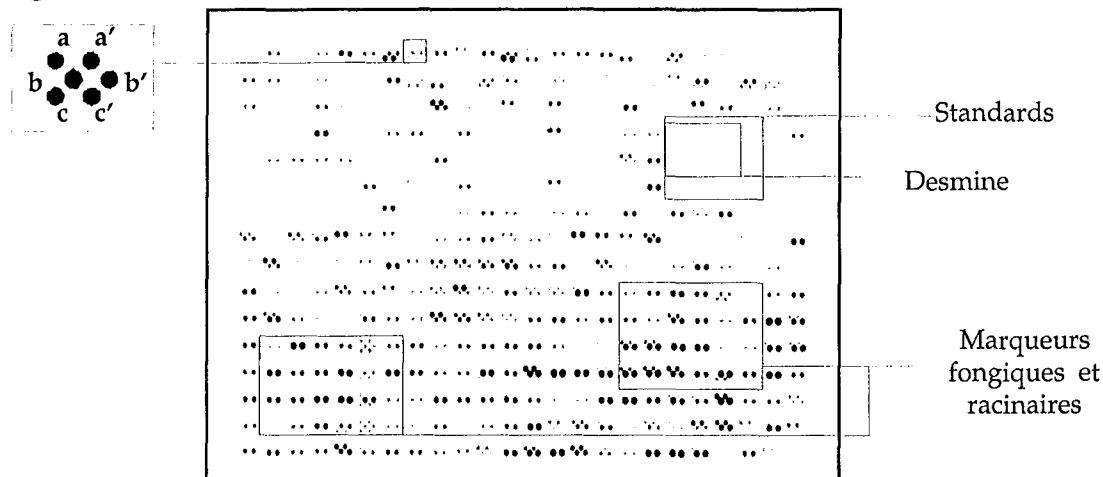


Figure 5 : Obtention de filtres d'ADNc à haute densité. (A) Mise au point des protocoles d'hybridation. La membrane composite présente le résultat d'une série d'hybridations entre une sonde ^{33}P -ADNc correspondant aux transcrits d'ectomycorhize de 4 jours et des ADNc de mycorhizes d'*E. globulus*-*P. tinctorius* déposés sur une membrane de nitrocellulose. Ces hybridations ont été réalisées avec 3 tampons différents (5XSSC, ExpressHyb et 5XHSB), en vue d'optimiser le rapport signal/bruit de fond. Le tampon 5XSSC (Sambrook *et al.*, 1989) a permis de générer, après préhybridation et hybridation, les signaux radioactifs présentant la plus forte intensité et le meilleur rapport signal/bruit de fond. Le tampon HSB, adapté aux membranes de Nylon, ne convient pas aux membranes de nitrocellulose. **(B)** Robot *MicroGrid* de la société *BioRobotics*, ayant servi à réaliser le dépôt des clones d'ADNc sur filtres. **(C)** Un exemple d'hybridation d'une membrane portant 1800 clones avec une sonde ^{33}P -ADNc de *Pisolithe*. Les clones ont été déposés en double (exemple de 3 ADNc : a, b et c) afin d'apprécier la qualité du dépôt par le robot. Les gènes marqueurs et les standards ont été encadrés.

Caractérisation des profils d'expression génique de *Pisolithus tinctorius* et d'*Eucalyptus globulus* au cours du développement de la symbiose ectomycorhizienne.

Avant d'aborder l'analyse des différents stades de développement, nous nous sommes attachés à maîtriser la production et l'analyse de filtres à haute densité en ADNc (2000 ADNc/filtre). Le passage à une forte densité en acides nucléiques sur le support d'hybridation (environ 25 clones/cm²) a nécessité une optimisation des techniques utilisées jusqu'alors. À partir de la bibliographie disponible concernant les études de génomique fonctionnelle menées chez d'autres organismes (Nguyen *et al.*, 1995 ; Piétu *et al.*, 1996 ; Richmond *et al.*, 1999 ; Bowtell, 1999), différentes procédures d'hybridation ont été testées et la méthode la plus adaptée à notre système a été sélectionnée. Les protocoles d'hybridation ADNc/ADNc, la nature des tampons d'hybridation, les conditions de lavage des filtres de nitrocellulose et le radioélément utilisé (**Figure 5A**) ont été choisis afin d'obtenir le meilleur signal d'hybridation et le rapport signal/bruit de fond le plus élevé (Duplessis & Martin, 2001 ; Chapitre 2, p.43). Enfin, à partir de gènes marqueurs et de standards internes déposés sur les filtres, nous avons pu apprécier la reproductibilité entre expérimentations des données et nous assurer ainsi de la fiabilité des résultats générés.

Neuf cents ADNc ont été amplifiés à partir de colonies bactériennes correspondant à la banque d'ADNc de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius*, parmi lesquels 715 ESTs différentes et de nombreux gènes marqueurs. Les gènes marqueurs correspondent à : un gène humain, la desmine (Desprez *et al.*, 1998), qui n'existe ni chez la plante, ni chez le champignon ; 23 gènes fongiques et 7 gènes racinaires dont la régulation ou la stabilité d'expression est connue et qui ont été placés de 2 à 4 fois en des points différents des filtres; et des contrôles de spécificité d'hybridation (plasmide, site de multiclonaage qui encadre les ADNc, oligonucléotide polyA de 15-18 nt et tampon d'amplification des réactions de PCR). Nous nous sommes ensuite rendus dans le laboratoire "DNA array" de la société Eurogentec (Saraing, Belgique) afin de déposer les ADNc amplifiés (25 clones/cm²) à l'aide du robot *MicroGrid* (BioRobotics, **Figure 5B**). Les ADNc ont été déposés sur les filtres sans classement préalable et chaque ADNc a été déposé deux fois, afin de s'assurer de la fiabilité des dépôts par le robot.

Nous avons obtenu les profils d'expression de 715 gènes (608 gènes fongiques et 107 gènes racinaires) dans la racine d'*Eucalyptus* non mycorhizée, dans le mycélium végétatif du *Pisolithus* et dans les racines mycorhizées 4, 7, 12, 15, 21 et 28 jours après contact entre les partenaires (colonisation de la surface racinaire, formation d'un manteau fongique autour de la racine, pénétration du mycélium dans le cortex racinaire et formation du réseau de Hartig, organe mixte en fonctionnement). Cette analyse a généré plus de 20 000 mesures de concentration de transcrits et nécessitait donc l'introduction d'outils informatiques et mathématiques plus puissants que ceux utilisés préalablement. En effet, il est difficile d'établir des relations entre les variations d'expression de tous les gènes par une visualisation en nuage de points (Scatter plot, **Figure 6**), comme nous l'avions fait précédemment (Voiblet *et al.*, 2001 ; Cf. **Figure 4**). Une telle représentation ne permet de distinguer que les gènes le plus régulés ($\geq 2,5$ fois).

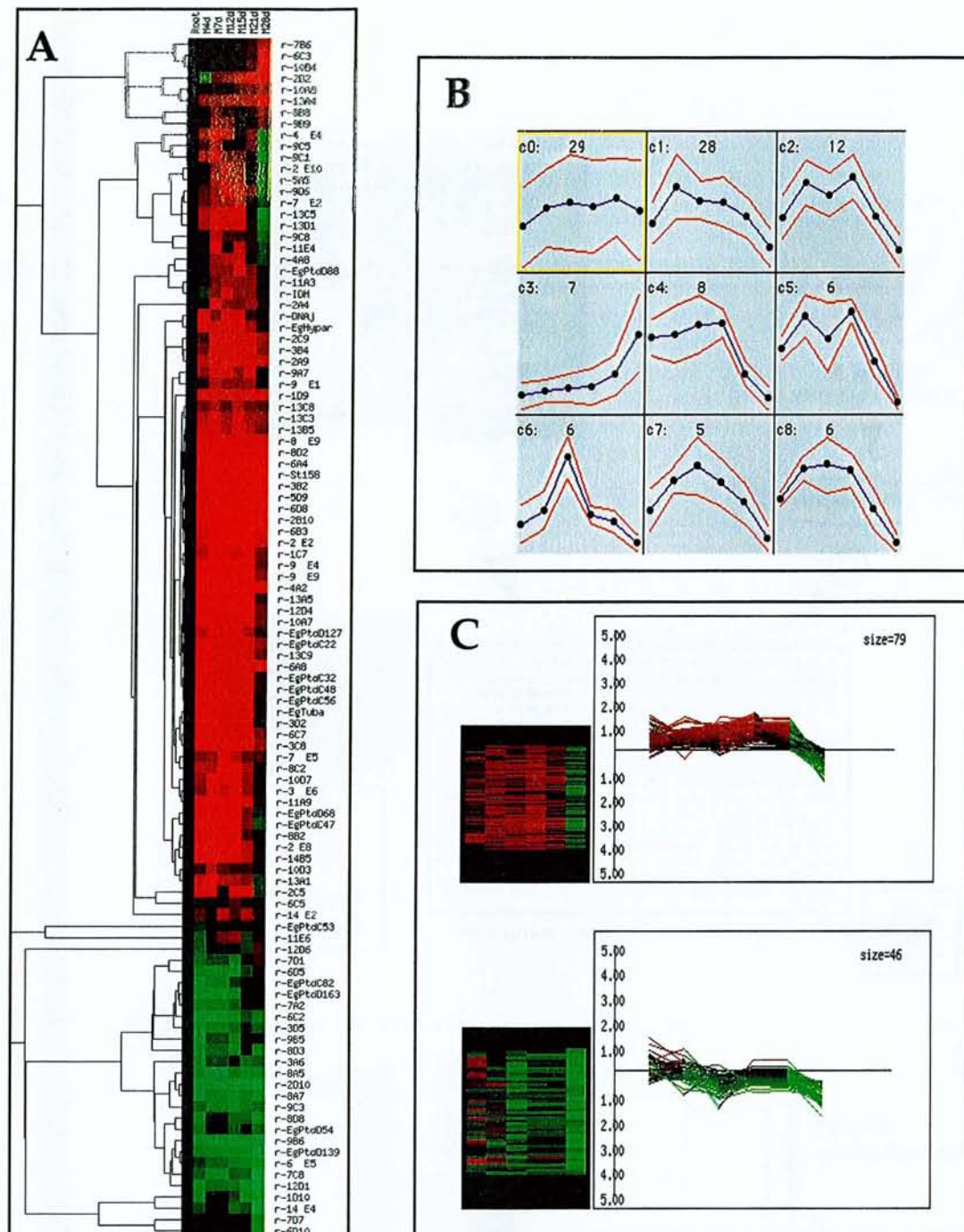


Figure 8 : Recherche des patrons d'expression génique à l'aide des méthodes statistiques de regroupement par profil de régulation. (A) Un exemple de regroupement hiérarchisé réalisé avec le logiciel Cluster (logiciels Cluster & Treeview, <http://rana.lbl.gov>) à partir des valeurs de régulation* des gènes racinaires. (B) Exemples de profils de régulation générés à l'aide des Self Organizing Maps (logiciel GENECLUSTER, <http://www.genome.wi.mit.edu/>). Les gènes sont placés dans des sous-ensembles dont les moyennes et les écart-types sont présentés (ici, 9 sous-ensembles, c0 à c8, comprenant de 6 à 29 gènes, générés à partir des données d'expression des gènes racinaires). (C) Exemple de profils de régulation obtenus à l'aide des k-means (logiciel EPCLUST sur <http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST>) à partir de valeurs de régulation des gènes fongiques. Le logiciel génère un listing (non montré) et une représentation graphique des rapports d'expression des gènes pour chaque regroupement effectué. En exemple, les représentations graphiques pour deux regroupements de gènes (46 et 79 gènes fongiques) stimulés lors des premiers stades de mycorhization (le temps de développement est placé en abscisse et le niveau de régulation en mode logarithmique, est donné en ordonnées).

* rapport [transcrits ectomycorhize]/[transcrits racine non associée]

Différentes approches d'analyses statistiques ont été utilisées ou développées au sein de plusieurs laboratoires (Eisen *et al.*, 1998 ; Tamayo *et al.*, 1999). Ces analyses statistiques permettent de dégager, à partir des données d'expression, des groupes de gènes partageant un mode de régulation identique ou similaire dans différents traitements ("synexpression"). Parmi ces analyses, on distingue généralement celles qui se basent sur un tri hiérarchisé (les données sont ordonnées au sein d'un même groupe) et celles qui procèdent à une classification non hiérarchisée (les données sont triées sous la forme de sous-ensembles distincts). Nous avons utilisé plusieurs logiciels, permettant de réaliser ces deux types d'analyses, afin de tirer le maximum d'informations de nos données d'expression, mais aussi pour corrélérer ces informations entre elles et rendre nos analyses plus fiables. En effet, aucun consensus n'existe quant à l'emploi de ces méthodes statistiques. Ces dernières sont réalisées sur des matrices, de distances euclidiennes ou de corrélations de Pearson, calculées à partir des rapports d'expression géniques obtenus dans les différents traitements. Ces matrices nécessitent une transformation préalable des données (normalisation) dans un mode adéquat aux calculs statistiques (mode logarithmique). Avant de procéder à ces analyses, nous avons réalisé une analyse de la variance (ANOVA) sur l'ensemble des données. Cette analyse préalable permet de vérifier que les gènes s'expriment bien d'une manière significativement différente au cours du développement de l'ectomycorhize.

Les logiciels Cluster et Treeview, développés par M. Eisen (Eisen *et al.*, 1998), ont été utilisés afin de distinguer les patrons de modulations temporelles de l'expression génique. Ces logiciels permettent de réaliser des analyses de distance sur matrice euclidienne et ainsi, facilitent le regroupement cladistique des gènes présentant un comportement d'expression similaire ("guilt-per-association"). La représentation par cladogrammes et matrices colorées des ensembles de gènes et des niveaux de régulation permet d'acquérir à la fois une vision globale sur l'ensemble des gènes et plus ciblée sur un gène ou une catégorie cellulaire (**Figure 7**). Cette visualisation permet à l'expérimentateur de conserver une partie intuitive dans l'analyse en aval du tri statistique réalisé par le logiciel (Brown & Botstein, 1999). Si cette approche par tri hiérarchisé permet dans sa représentation d'avoir une vision simultanée de l'ensemble des données, elle tient compte dans son algorithme de l'amplitude des régulations de l'expression dans chacun des traitements. Nous avons donc procédé à des tris non hiérarchisés afin de distinguer des groupes de gènes qui pourraient avoir des profils de régulation identiques quelque soit leur niveau de régulation.

Nous avons réalisé ces tris à l'aide de deux approches statistiques différentes, les SOMs (pour Self Organizing Maps) et les *k*-means (**figure 8**), qui sont les principaux modes d'analyse qui aient été appliquées jusqu'à présent lors d'études de transcriptomes (Tamayo *et al.*, 1999). Les algorithmes sur lesquels reposent ces analyses diffèrent dans le mode de regroupement, mais ils se basent sur une même représentation vectorielle où 'n' gènes sont représentés dans un espace à 'k' dimensions, 'k' étant le nombre de traitements de l'expérience. Ainsi, dans le cadre de notre étude, nous avons 715 gènes/vecteurs, dans un espace à 6 dimensions qui correspondaient aux différents temps de la cinétique de mycorhization. Ces analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels Cluster et Genecluster pour les SOMs et avec EPCLUST, utilisé en ligne sur le site web de l'Institut Européen de Bioinformatique EBI (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST>) pour les *k*-means (**figure 8**).

Tableau 1. Nombre et pourcentage de gènes-SR mis en évidence lors du développement de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius*

Rapport d'expression ^a	4d ^b	7d	12d	15d	21d	28d
≥ 2	126 (17.5%) ^c	102 (14.5%)	164 (23%)	162 (23%)	79 (11%)	112 (15.5%)
≥ 4	27 (3.5%)	23 (3%)	30 (4%)	19 (2.5%)	12 (1.5%)	10 (1.5%)
≥ 10	3 (0.5%)	3 (0.5%)	4 (0.5%)	3 (0.5%)	1 (<0.5%)	2 (<0.5%)
ESTs d' <i>E. globulus</i> ≥ 2	50 (46.5%) ^d	55 (51.5%)	54 (50.5%)	59 (55%)	43 (40%)	38 (35.5%)
ESTs de <i>P. tinctorius</i> ≥ 2	76 (12.5%) ^e	47 (8%)	110 (18%)	103 (17%)	36 (6%)	80 (13%)

^a Rapports des concentrations de transcrits : Mycorhize/Partenaires non associés. Les gènes de ces catégories présentent un rapport supérieur ou égal à la valeur donnée. ^b stade de développement de l'ectomycorhize (de 4 à 28 jours). ^c Pourcentage calculé sur 715 ESTs. ^d Pourcentage calculé sur 107 ESTs. ^e Pourcentage calculé sur 608 ESTs.

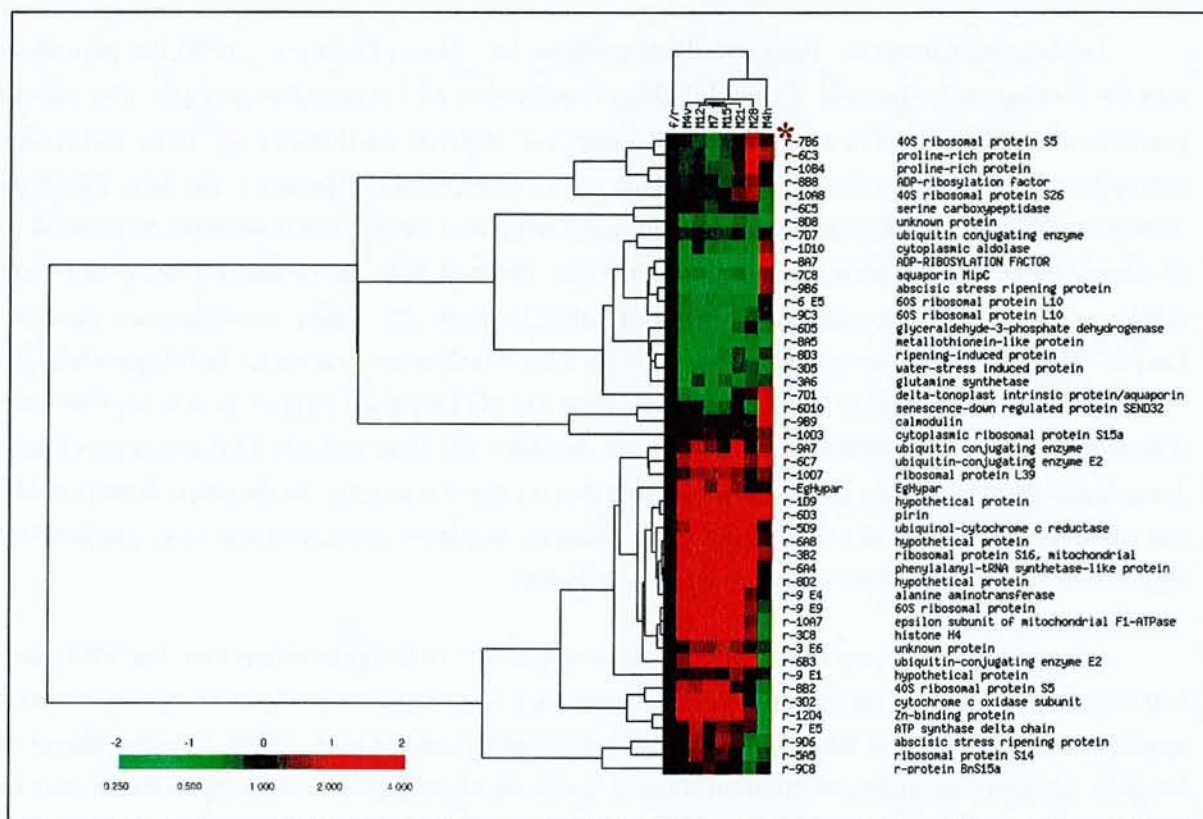


Figure 9 : Comparaison des profils d'expression de 48 ESTs racinaires communes aux deux études du transcriptome de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius*. Mycorhizes du modèle 1 (figure 1) : M4h, Voiblet *et al.* (2001). Mycorhizes du modèle 2 (figure 3) : M4v, M7, M12, M15, M21, M28, Duplessis & Martin, 2001. Les fonctions correspondant aux ESTs apparaissent à droite du profil, et les clades regroupant les groupes de gènes sont placés sur la gauche. Le cladogramme exprimant les relations entre les expériences est placé au dessus de la matrice. Le clade correspondant à l'expérience effectuée sur les racines plagiotropes mycorhizées (4 jours post-contact) est marqué d'un astérisque *.

Nous avons appliqué ces analyses statistiques aux données obtenues lors de l'expression génique dans la mycorhize en formation. Elles nous ont permis d'obtenir, pour la première fois, une vision globale des modifications géniques établies *au cours du développement symbiotique*. On observe une chronoséquence dans l'expression des groupes de gènes dans la racine et dans le champignon. Les ensembles de gènes (clusters) présentant des profils de régulations similaires (régulons potentiels) au cours du développement de la mycorhize regroupent à la fois des gènes aux fonctions connues, mais aussi de nombreux gènes sans fonction connue. L'appartenance à un même cluster, d'un groupe de gènes de fonction connue et d'un gène codant une protéine hypothétique permet de supposer qu'ils jouent un rôle voisin ou qu'ils sont régulés d'une manière similaire (régulon).

En fonction du stade de développement symbiotique considéré, 11 à 24% des gènes sont régulés (niveau de régulation ≥ 2). La majorité des gènes racinaires présente une régulation plus marquée au cours du processus de développement que les gènes fongiques (Tableau 1).

La comparaison des niveaux de régulation de 250 ESTs communes aux deux études du transcriptome présentées dans ce mémoire (Chapitre 2, Voiblet *et al.*, 2001 ; Duplessis & Martin, 2001) montre un profil général qualitativement identique avec toutefois des différences quantitatives marquées. La Figure 9 présente le résultat de cette comparaison pour 48 ESTs de la racine d'*E. globulus*. L'analyse cladistique simultanée des deux expériences, avec les logiciels Cluster et Treeview, place le profil d'expression génique de la racine plagiotope mycorhizée (Voiblet *et al.*, 2001) en dehors de la cinétique de formation de la mycorhize en système vertical (Duplessis & Martin, 2001 ; Chapitre 2). D'autre part, cette analyse regroupe bien de proche en proche les différents stades étudiés au cours du développement (de 4 à 28 jours). Le même type d'analyse a été réalisée sur les 202 ESTs fongiques communes aux deux études du transcriptome d'*E. globulus*-*P. tinctorius* et le même type d'observations a pu être réalisé. Cette analyse comparative ne permet donc pas de regrouper les données acquises sur la formation des mycorhizes en système horizontal avec celles obtenues sur la cinétique d'expression génique de la mycorhize en cours de développement. Ces observations confirment ainsi l'importance du choix du modèle de production des mycorhizes *in vitro*. Parmi les gènes qui présentent des profils d'expression très différents, dans les deux expériences, se trouvent quelques gènes racinaires, codant notamment des protéines impliquées dans le métabolisme hydrique (aquaporines ; Figure 9).

L'analyse ciblée d'un groupe de gènes d'une même classe cellulaire permet de décrire les principales fonctions régulées au cours de la cinétique de mycorhization. Le profil général des gènes codant les protéines de structure (parois, membranes, cytosquelette...) du champignon *Pisolithus tinctorius* qui est retrouvé à la fois par l'analyse cladistique hiérarchisée et par les SOMs, est présenté sur la Figure 7. On retrouve au sein de ce cluster, les ESTs codant les protéines pariétales SRAP32 et les hydrophobines. Les gènes codant les hydrophobines sont fortement exprimés après 4 et 7 jours de contact, puis la concentration de ces transcrits chute plus ou moins rapidement pour revenir au niveau du mycélium non symbiotique après 21 jours. D'autre part, les gènes codant les protéines pariétales fongiques SRAP17 et SRAP32 (symbiosis-regulated acidic polypeptides de 17 et 32 kDa) présentent quant à eux un taux de stimulation plus élevé au cours du développement symbiotique, avant de

revenir à un niveau d'expression proche de celui du mycélium non symbiotique, dans les dernières étapes du développement symbiotique (21 et 28 jours). Cette chronoséquence de l'expression génique est très informative et confirme des analyses antérieures obtenues par Northern blot sur HydPt-2 et SRAP32-I (Martin *et al.*, 1999). Elle indique que les gènes codant les protéines les plus abondantes du manteau fongique et de l'interface plante-champignon présentent deux modes de régulation temporelle. D'autres gènes codant des protéines de structure, comme la protéine BAP31 riche en proline ou la β -tubuline, présentent un patron de stimulation proche de celui des protéines pariétales, alors que certains gènes gardent un niveau de transcrit plutôt stable tout au long du processus symbiotique (*Fun34*). Il est intéressant de noter que l'analyse par regroupement hiérarchisé place les gènes codant les hydrophobines et les SRAP sur deux clades de la même manière que les SOMs ou les k-means les regroupent dans deux sous-ensembles distincts (HYDPt et SRAP17 d'une part, et les SRAP32 d'autre part). L'obtention de tels résultats à travers deux approches différentes renforce l'idée d'un même mode de régulation pour ces gènes codant des protéines pariétales fongiques. Le fait qu'ils soient régulés lors de la formation du manteau (hydrophobines) ou dans la mise en place du réseau de Hartig (SRAP32) indique que ces protéines joueraient des rôles différents dans la construction et l'organisation de la paroi fongique et de l'interface symbiotique.

Une autre classe de protéines fongiques présente des vagues d'expression au cours de la mycorhization ; il s'agit des métallothionéines et d'autres protéines fixant les métaux (metal-binding cystein-rich proteins). Ces protéines sont vraisemblablement impliquées dans l'adaptation des hyphes, progressant dans la racine, aux contraintes imposées par les réactions de défense de la plante (radicaux libres,...) ou dans le transport des métaux entre compartiments fongiques. L'analyse des multiples ESTs de ces gènes a révélé l'existence de trois groupes de transcrits distincts : deux sont réprimés durant le développement symbiotique (groupes a et b, p.51) , alors que le troisième groupe (groupe c, p.51) présente une stimulation de plus en plus marquée au cours de la formation de l'ectomycorhize. Ces protéines pourraient être impliquées dans des fonctions différentes ou alors, elles pourraient être exprimées dans différents tissus de l'ectomycorhize.

L'amplitude des taux de régulation, observés chez la plante, est très marquée et on distingue trois groupes principaux de gènes : des gènes stimulés sur l'ensemble du processus symbiotique, des gènes marqués par une répression continue et un dernier ensemble moins important de gènes non affectés par la symbiose (Figure 10). Un tel résultat démontre qu'il existe une réponse forte et pléiotropique des tissus racinaires au cours de la construction de l'organe mixte. Ce résultat est en accord avec les profils de biosynthèse protéique décrits par ailleurs pour différentes espèces du genre *Eucalyptus* au cours de la formation de la mycorhize (Hilbert et Martin, 1988 ; Hilbert *et al.*, 1991 ; Burgess *et al.*, 1995). Nos résultats montrent que les régulations concernent des gènes SR (symbiosis-regulated), déjà identifiés par ailleurs dans les racines d'*Eucalyptus* par des approches ciblées. Par exemple, la stimulation de l'expression des gènes *EgTubA1* (Carnero-diaz *et al.*, 1996), *EgHypar* (Nehls *et al.*, 1998) et *EgIcDH* (Boiffin *et al.*, 1998) est soutenue tout au long du processus symbiotique. La plupart des gènes-SR (*Pirin*, *OMT*...) identifiés dans la racine mycorhisée lors de la formation du manteau (Voiblet *et al.*, 2001) ont eux aussi une expression stimulée tout au long du développement symbiotique. La stimulation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse de protéines (polyA binding protein, Dnaj, ARNt synthétases, protéines ribosomiques)

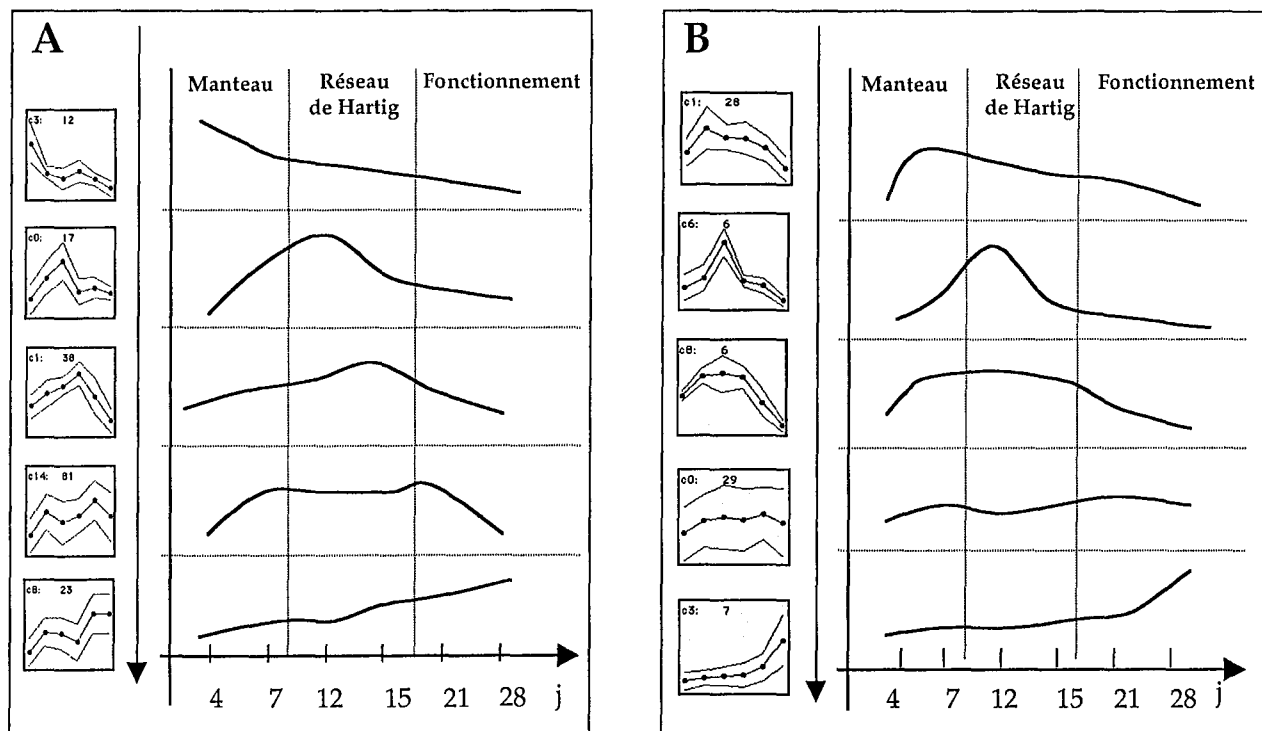


Figure 11 : Recherche des principaux patrons d'expression des gènes régulés par le développement symbiotique par regroupements non hiérarchisés. **(A)** Patrons de régulation identifiés au sein des 608 gènes fongiques. Les SOMs obtenues avec le logiciel GENECLUSTER sont données en ordonnées (moyenne et écart-types de chaque sous-ensemble). Les résultats sont concordants avec ceux obtenus à l'aide des *k*-means et distinguent trois classes principales de gènes stimulés aux trois étapes principales de formation de l'ectomycorhize : formation du manteau, mise en place du réseau de Hartig et fonctionnement de l'organe mature. **(B)** Patrons de régulation identifiés au sein des 107 gènes racinaires identifiés à partir des SOMs et des *k*-means. A nouveau, trois principaux profils de régulation sont observés en concordance avec les différentes étapes de formation de l'ectomycorhize.

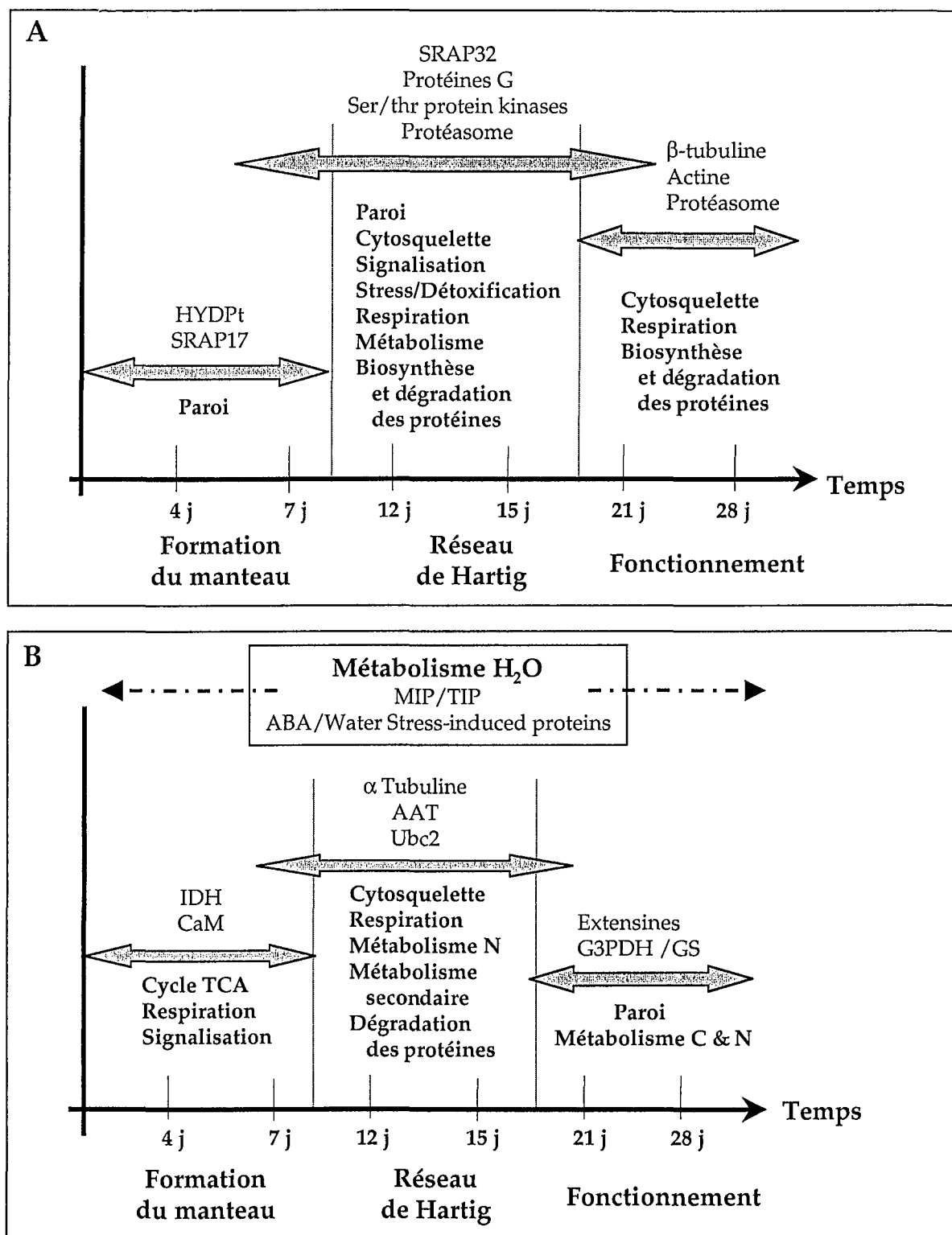


Figure 12. Principales fonctions stimulées aux différents stades de développement de l'ectomycorhize (formation du manteau, mise en place du réseau de Hartig, ectomycorhize mature) chez *Pisolithus tinctorius* (A) et chez *Eucalyptus globulus* (B). Les fonctions indiquées (en gras) correspondent à des groupes de gènes identifiés par analyse statistique (SOMs et *k*-means). Des exemples de gènes sont donnés pour chaque stade de développement. En (B), les gènes codant les protéines du «métabolisme hydrique» sont réprimés tout au long du développement de l'organe mixte.

pourrait s'expliquer par la forte rhizogénèse induite chez l'Eucalyptus par la présence du mycélium (Burgess *et al.*, 1995 ; Carnero-Diaz *et al.*, 1996). Cette forte synthèse de protéines est accompagnée d'une stimulation de l'activité respiratoire racinaire (EgIcDH, ubiquinol-cytochrome c reductase, F(1)-F(0)ATP Synthase) confirmant des résultats déjà anciens (Marshall & Perry, 1987). Au contraire, la diminution de la concentration des transcrits des gènes codant la G3PDH et une aldolase cytoplasmique suggère une activité glycolytique plus faible. Ce découplage entre glycolyse et respiration mitochondriale est inattendu et pose le problème de l'origine du carbone utilisé par la respiration des tissus symbiotiques. Une analyse plus fine des interactions C et N est donc requise. Elle nécessite le clonage des ADNc codant les enzymes de la voie des pentoses phosphates et de la dégradation des lipides.

Les gènes réprimés codent des protéines impliquées dans les réactions de stress hydrique (water- and abscissic-stress induced proteins) et l'absorption d'eau (aquaporines, TIP et MIP) indiquant que le statut hydrique de la plante serait améliorée au cours du développement de l'ectomycorhize dans ce système *in vitro*.

Les résultats des analyses réalisées à l'aide des SOMs et des *k*-means nous ont permis de distinguer des ensembles de gènes partageant des profils de régulation au cours du développement. Ainsi, nous avons pu identifier quatre groupes principaux de régulation similaire pour les gènes fongiques (Figure 11A). On note : (1) un ensemble de gènes stimulés lors de la formation du manteau, (2) un ensemble de gènes stimulés dans l'ectomycorhize mature, (3) un ensemble de gènes stimulés lors de la formation du réseau de Hartig (pic de stimulation à 12 jours ou à 15 jours après contact) ou (4) présentant une stimulation continue durant cette phase médiane du développement de l'organe symbiotique. Nous avons pu mettre en évidence des patrons similaires pour les gènes racinaires (Figure 11B). Les informations apportées par ces analyses confirment et complètent les données obtenues par les regroupements hiérarchisés. Elles permettent surtout d'identifier les fonctions clés exprimées chez la plante et chez le champignon, aux différentes étapes de formation de l'ectomycorhize, révélant ainsi des régulons potentiels (Figure 12).

La mise en place et la maîtrise d'outils performants d'analyse du transcriptome (dépôt d'ADNc assisté par robotique, hybridation de sondes complexes, logiciels d'acquisition et d'analyse statistique des niveaux d'expression) ont donc permis d'étudier simultanément l'expression de plus de 700 gènes au cours du développement de la symbiose Eucalyptus-Pisolithus. Les deux études du transcriptome réalisées sur deux systèmes expérimentaux in vitro démontrent l'intérêt d'une telle approche pour appréhender pleinement la biologie du développement de l'organe mycorhizien. Elles ont mis en évidence l'existence de groupes de gènes présentant le même patron d'expression (régulons). Ces études permettent d'entrevoir, à court terme, l'étude de l'expression de la totalité des gènes exprimés dans ces symbioses. Au delà de l'analyse globale du transcriptome, ces études génomiques permettent de cibler des gènes potentiellement importants lors la mise en place de l'organe symbiotique. Ils peuvent ainsi servir à mettre à jour des fonctions clés sur lesquelles des études moléculaires plus poussées pourront être menées afin de démontrer leur activité biologique dans les processus étudiés.

A

	5	15	25	35	45
HydPt-3	MFSRV - - - - F	AVASLAALAL	AGPLSVR - - -	- - - - -	- - D - - - -
HydPt-2	EIVSLSLSL	. . VP . VV . VI	 N . . G - -	- - - - - GT	PSQ - - - - -
HydPt-1	. KFAAVVV . A	. A . AA . SAET	NAQRMA . . LP	PKAP IRRH . .	. A . TEKRSH
	55	65	75	85	95
HydPt-3	- - - - - QCNT	GT I QCCQVQ	QASY YQSAFQ	E I GLGELLAG	VTGQ IGTQCS
HydPt-2	- - - - -	. . P	. T . DL . QFRS	SF . VDA . . .	ASALV . AN . N
HydPt-1	SSTGGG	. P NT . A	TSGSQSGVDE	LLT . LG . SVP	. GT S . .
	105	115	125	135	
HydPt-3	P I SVVGASNG	AQCNAQTVCC	TNTQFNGL I N	I GCMP I NVNA	
HydPt-2	. V . . L . TG . .	 T . P . . .	. SN . ML . AV .	M L	
HydPt-1	. . . A . . . S .	. . . SG	EQ . EW	 L . . .	

B

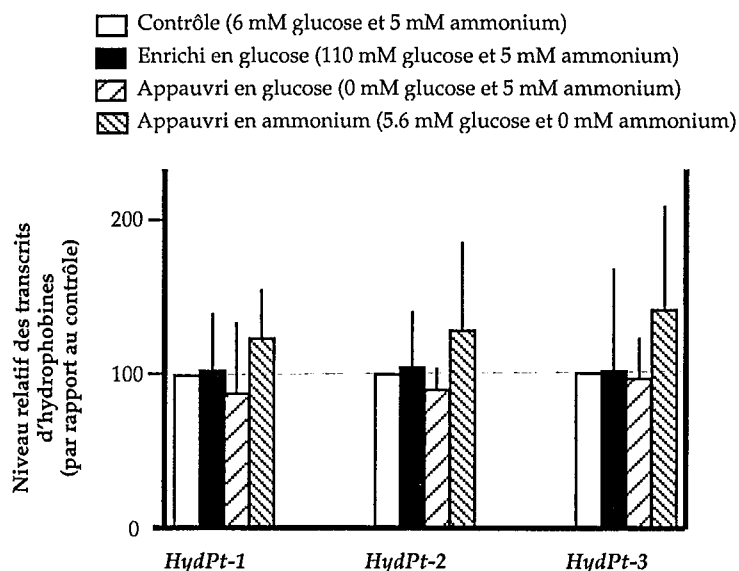


Figure 13 : A. Comparaison des séquences polypeptidiques codées par les ADNc d'hydrophobines de *Pisolithus tinctorius* (HydPt-1, U29605 ; HydPt-2, U29606 ; HydPt-3, AF097516). La séquence HydPt-3 correspond au contig 8C4 (Voiblet *et al.*, 2001) qui comprend les ESTs 8C4, 5C4 et 5D4. Les alignements multiples ont été réalisés avec le programme SeqApp. Les points indiquent des acides aminés identiques et les tirets indiquent des interruptions. Les huit cystéines conservées sont en caractères gras. **B.** Niveaux de régulation des transcrits HydPt-1, HydPt-2 et HydPt-3 dans le mycelium de *P. tinctorius* ayant été cultivé sur un milieu de culture de Pachlewski standard, ou appauvri en azote et enrichi ou appauvri en glucose. Les niveaux d'expression sont exprimés par rapport à ceux obtenus pour le *Pisolithus* cultivé en condition standard (valeur 100, ligne pointillée). Un test ANOVA à une variable a été appliqué sur les données d'expression pour 3 répétitions et aucune différence significative n'a pu être observée ($P < 0.05$).

Caractérisation et étude de l'expression du gène *HydPt-3* chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*.

De l'analyse du transcriptome ectomycorhizien décrite précédemment, il apparaît que l'expression de certains membres d'une famille multigénique codant des protéines morphogènes pariétales fongiques, les hydrophobines, est particulièrement stimulée au cours des premières étapes du développement de la mycorhize. Lors du séquençage d'ESTs des tissus symbiotiques, nous avons identifié 22 ADNc d'hydrophobines. Ce sont des protéines de petite taille, pariétales ou excrétées, caractérisées par la présence de 8 cystéines en des positions conservées dans leurs séquences (Wessels, 1997). Elles jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes d'adhérence des hyphes impliquées dans la morphogénèse (formation du sporocarpe) ou la pathogénicité (Kershaw & Talbot 1998). Les propriétés d'agrégation et de fixation à une surface de ces protéines amphiphiles sont probablement fondamentales lors de la formation de la symbiose mycorhizienne. Tagu *et al.* (1996) avaient identifié et caractérisé deux ADNc de *Pisolithus tinctorius* correspondant à des hydrophobines. Ces deux séquences *hydPt-1* et *hydPt-2* sont abondamment transcrites dans les hyphes aériens de *Pisolithus*, et leur accumulation est fortement stimulée lors des premiers stades de formation de l'ectomycorhize (Tagu *et al.*, 1996 ; Voïblet *et al.*, 2001).

Nous avons identifié et caractérisé une autre séquence d'hydrophobine : *hydPt-3*. Les séquences des ADNc des trois hydrophobines du *Pisolithus* ne présentent que 40% de similitude, indiquant qu'il s'agit d'ARNm provenant de gènes différents (Figure 13A). L'analyse d'empreintes électrophorétiques selon Southern réalisée sur de l'ADN génomique de *Pisolithus* indique que *hydPt-1*, *hydPt-2* et *hydPt-3* sont codés par un petit nombre de gènes. La quantification des transcrits *HydPt-3* par northern blot (Chapitre 3, p. 67, Fig. 3) montre que le gène *hydPt-3* est stimulé lors des étapes précoces de mycorhization de la racine d'*Eucalyptus*. Cependant, l'analyse par filtres d'ADNc n'a pas permis de confirmer cette stimulation (Chapitre 2, p. 51, Fig. 3A). La bonne concordance entre les données obtenues par northern blot et filtres d'ADNc pour les autres hydrophobines (*HydPt-1*, *HydPt-2*), les SRAPs et d'autres gènes SR (*EgTubA1*, *EgHypar*, *EgICDH*, ...) élimine la possibilité d'un problème lié aux filtres d'ADNc. Cette différence pourrait être due à une dilution des transcrits fongiques dans le cas du système de mycorhization de la racine orthotrope, par rapport au système de production de pivot racinaire plagiotrope. Le premier stade de développement étudié au cours de la cinétique de formation de la mycorhize étant 4 jours post-contact, le pic de stimulation de *HydPt-3* était peut-être déjà passé.

Si des modulations dans les niveaux de transcrit d'hydrophobines fongiques ont pu être observées, les facteurs responsables de ces régulations géniques ne sont pas identifiés. Lorsque les hyphes d'un champignon ectomycorhizien s'approchent de la rhizosphère, il est probable qu'ils perçoivent une modification de la composition en carbone et en azote de leur environnement. Chez certains champignons filamenteux, les gènes d'hydrophobines sont régulés par les carences azotées ou carbonées (Segers *et al.*, 1999). Nous avons émis l'hypothèse que ces gènes SR fongiques étaient régulés par la disponibilité en carbone et en azote du milieu. Les résultats obtenus indiquent que, dans nos conditions expérimentales, les gènes *hydPt-1*, *hydPt-2* et *hydPt-3* du *Pisolithus* ne sont pas régulés par la teneur en ammonium ou en glucose dans le milieu de culture (Figure 13B). Ainsi il est probable

que d'autres facteurs - médiateurs symbiotiques spécifiques, exsudats racinaires, pH du milieu, contacts physiques entre biopolymères pariétaux - interviennent dans la stimulation de l'expression des gènes d'hydrophobines et d'autres gènes régulés par la symbiose.

*Cette étude a donc permis de caractériser le gène hydPt-3 codant une hydrophobine du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*, à partir du contig 8C4 identifiée lors de l'analyse du transcriptome de l'ectomycorhize Eucalyptus-Pisolithus. Ce gène est différent des gènes hydPt-1 et hydPt-2 déjà caractérisés chez ce basidiomycète. Le niveau des transcrits est modifié au cours des stades précoces de mycorhization et la disponibilité en carbone et en azote n'affecte pas l'expression de ce gène.*

Caractérisation et étude de l'expression de gènes des voies de transduction chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*.

Les protéines des voies de transduction de signaux, conservées, à quelques exceptions près, chez tous les organismes, sont étudiées pour leur rôle clef dans les processus de prolifération cellulaire, de différenciation, ou encore de réponse rapide d'acclimatation des cellules face aux variations de leur environnement (Gadd, 1994). Cette transduction intracellulaire consiste en des réseaux complexes de médiateurs protéiques (protéines kinases, protéines phosphatases, etc...). Elles permettent de faire parvenir une information extérieure depuis les membranes jusqu'au noyau où l'expression de gènes cibles est modifiée. Ces voies de transduction ont particulièrement bien été décrites dans le cadre des relations plantes/champignons phytopathogènes, notamment chez certains champignons filamenteux comme *Magnaporthe grisea* ou *Ustilago maydis*. Ainsi, le rôle de plusieurs protéine kinases (PKA, MAPKinases), de l'adénylate cyclase et de protéines G hétérotrimériques dans les processus d'infection a pu être démontré chez ces champignons par l'inactivation expérimentale des gènes qui les codent. Ces inactivations ont permis de montrer le rôle clef des voies de transduction dans la formation des appressoria qui sont les structures pathogènes développées par le champignon au contact des feuilles (Regenfelder *et al.*, 1997, Kasahara & Nuss, 1997, Truesdell *et al.*, 2000 ; Coca *et al.*, 2000).

La ressemblance des processus de colonisation de la surface de l'hôte, de la pénétration de ses tissus et de la formation des interfaces biotrophes symbiotiques et pathogènes suggère que les protéines des voies de transduction sont susceptibles de jouer un rôle clef dans le déterminisme du développement de l'ectomycorhize. Afin de vérifier le rôle de telles protéines, nous avons cloné et caractérisé plusieurs gènes clefs des voies de transduction chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* en vue d'une inactivation ultérieure par transgénése.

Dans le catalogue d'EST disponibles, nous avons sélectionné six séquences d'origine fongique, codant des protéines G monomériques (*ras*) et hétérotrimériques (*Gpα*, sous-unité α de protéine G), une protéine $G\beta$ à motifs répétés WD (*cpc2-1* et *cpc2-2*), une sérine/thréonine protéine kinase (*stk*) et une sous-unité régulatrice d'une protéine phosphatase, la calcineurine (*CnB*). Les ADNc

correspondant à ces ESTs ont été séquencés et la conservation des sites fonctionnels et structuraux, dans les séquences polypeptidiques déduites, a été vérifiée. La banque d'ADNc ayant été construite à partir d'un matériel mycorhizien mixte, l'origine fongique de ces gènes, à l'aide d'empreintes électrophorétiques selon Southern, a aussi été vérifiée. Nous avons ainsi montré que ces gènes étaient présents dans le génome du champignon en une, ou un très faible nombre, de copies (Chapitre 4).

L'expression basale de ces gènes étant détectable à un niveau suffisant chez le champignon en culture pure, l'étude de leur expression a pu être envisagée dans différentes conditions expérimentales. Comme pour les gènes codant les hydrophobines, nous avons suivi l'expression des gènes *ras*, *Gpα*, *cpc2*, *stk* et *CnB* du champignon cultivé sur un milieu de Pachlewski standard, puis transféré sur le même milieu, enrichi en glucose (110 mM versus 5 mM) ou ne contenant pas d'azote (0 mM versus 5 mM NH_4^+). Ces conditions étaient définies afin de mimer le passage du mycélium de la rhizosphère et de la surface racinaire (relativement pauvres en azote et en carbone) au milieu intraradiculaire (riche en acides aminés et en glucides). Les modifications de la concentration des transcrits des gènes étudiés sont de très faible ampleur (Figure 8, p. 76, Verso). Nous avons aussi montré que l'expression des gènes *ras*, *Gpα* et *stk* du *Pisolithus* est modifiée lorsque le champignon est cultivé sur un milieu contenant des exsudats racinaires (Lagrange *et al.*, 2001) d'*E. globulus* ou une cytokinine de ces exsudats, la zéatine (Figure 10, p. 77, Verso).

Cette étude a donc permis de caractériser, pour la première fois, la structure et l'expression des gènes codant une protéine G monomérique Ras, une sous-unité α de protéine G hétérotrimérique, une protéine Gβ à motifs WD répétés, une sérine/thréonine protéine kinase et une sous-unité régulatrice de la calcineurine du champignon ectomycorhizien Pisolithus tinctorius. Nous avons montré que ces gènes étaient très proches de ceux caractérisés chez différents champignons pathogènes et qu'ils existaient en un faible nombre de copie dans le génome du Pisolithus. Certains de ces gènes sont régulés dans l'ectomycorhize (Gpα, ras). Nous avons cherché si ces modifications résultaient des changements importants de la concentration en glucose et NH_4^+ dans le milieu. Ces changements trophiques n'affectent pas l'expression de ces gènes suggérant une régulation par des signaux symbiotiques ou des modifications post-traductionnelles. Nous avons ainsi montré que les exsudats racinaires d'E. globulus entraînaient une stimulation de l'expression de certains gènes des voies de transduction (ras, Gpα, stk). La navette entre l'analyse massive du transcriptome permettant d'identifier des groupes de gènes régulés et l'étude fine de ces gènes est donc particulièrement fructueuse.

Mise en perspectives.

Au cours de ces dernières années, la biologie végétale aura été marquée par le développement considérable des études de génomique fonctionnelle. Ainsi en Décembre 2000, The Arabidopsis Genome Initiative publiait la séquence du génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Nature, n° 408). Cette séquence annotée sera dans les années à venir une source importante de renseignements pour l'ensemble de la communauté scientifique. L'accès à la séquence de son génome et aux nombreuses ESTs disponibles par ailleurs, ont déjà permis d'étudier le transcriptome de cette plante dans de nombreuses conditions. De telles études ont permis de mettre en évidence de nombreux gènes régulés par le cycle circadien (Schaffer *et al.*, 2001), par la modification d'un élément du substrat (induction de gènes par le nitrate, Wang *et al.*, 2000), par le stress hydrique et le froid (Seki *et al.*, 2001) ou encore au cours du développement des graines (Girke *et al.*, 2000) chez cette plante. S'il est regrettable qu'*A. thaliana* n'établisse pas de relations symbiotiques avec des champignons mycorhiziens, l'étude des interactions de cette plante avec des micro-organismes phytopathogènes est et sera fortement informative pour la communauté des mycorhizologues (Reymond *et al.*, 2000 ; Schenk *et al.*, 2000 ; Maleck *et al.*, 2000). La multiplication de tels travaux, à la fois chez les plantes et chez les champignons pathogènes et mutualistes, devrait permettre à terme d'identifier les déterminants de ces relations plantes/champignons biotrophes. La mise en place de catalogues exhaustifs des régulations intervenant dans ces interactions devrait ainsi permettre de comprendre le fonctionnement et les mécanismes communs mis en jeu lors des interactions entre les plantes et les micro-organismes.

Ces analyses génomiques montrent aussi qu'il existe encore au sein des génomes une part très importante de gènes de fonctions inconnues. Dans notre cas, il s'agit de la majorité des ESTs de l'ectomycorhize *Eucalyptus-Pisolithus* (parmi lesquelles un grand nombre est régulé). La génomique couplée aux études du transcriptome et du protéome devrait permettre de déterminer, par association avec des gènes de fonctions connues, le rôle de ces nouvelles protéines dans les processus étudiés. Les études d'expression génique en masse ne nous permettent cependant que de proposer des corrélations entre des niveaux d'expression génique et un phénotype particulier. Aussi, est-il particulièrement important de démontrer l'activité biologique des protéines codées par ces gènes régulés. Cette démonstration repose, par exemple, sur l'inactivation de gènes.

La transformation génétique de *Pisolithus tinctorius* est une technique indispensable pour une telle démonstration. Comme l'obtention de protoplastes viables de cette espèce est pour le moment impossible, nous avons testé la technique de transfert d'ADN recombinant par biolistique sur des colonies mycéliennes intactes (Duplessis & Podila, résultats non publiés). Cependant, aucun transformant n'a pu être obtenu. Cet échec démontre la difficulté de la transgénèse du Pisolithus et d'autres approches alternatives (transformation par *Agrobacterium*) sont actuellement en cours de développement (Sorin, 2000).

Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse concernent l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant et accompagnant l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius*. Ils s'inscrivent dans un programme plus vaste d'étude des interactions plantes/champignons biotrophes. Ce travail n'est qu'une étape dans les études visant à rechercher et à caractériser les déterminants de ces interactions et les mécanismes communs mis en jeu. Néanmoins, il aura permis la mise en place de bases solides pour mener à bien ces études.

Le développement d'outils de génomique fonctionnelle nous a permis d'étudier près d'un millier de séquences exprimées de l'ectomycorhize *Eucalyptus-Pisolithus* et de suivre la régulation de leur expression au cours du développement de l'organe symbiotique.

Parmi les fonctions identifiées dans l'ectomycorhize, les mécanismes impliqués dans la synthèse des ARNm et des protéines sont fortement exprimées, soulignant ainsi la forte activité mitotique des tissus fongiques et végétaux dans l'organe mixte en construction. La forte activité respiratoire pourrait s'expliquer également par cette intense prolifération cellulaire et tissulaire. De nombreux transcrits codant des protéines de structure et des protéines des voies de signalisation intracellulaires sont aussi détectés. Les protéines de structure interviennent manifestement dans la constitution du manteau et du réseau de Hartig. Les composantes des voies de transduction pourraient être impliquées quant à elle dans le dialogue moléculaire entre la plante et le champignon, ainsi que dans la coordination des différentes fonctions au sein de l'organe en fonctionnement. Il est important de souligner que la majorité des séquences ne code aucune fonction connue et correspondent à de nouveaux gènes. C'est le cas des transcrits les plus abondants dans le Pisolithus (clones ADNc 5C6, 7B9, 10A4, ...). Ces gènes, qui ne sont pas présents dans les bases de données, pourraient être spécifiques de l'*Eucalyptus* et du *Pisolithus* ou encore des organismes symbiotiques. Ce qui expliquerait qu'ils n'aient pas été identifiés dans le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, celui d'*Arabidopsis thaliana* et des organismes dont les séquences alimentent les bases de données.

Afin d'apprécier l'expression et la régulation des gènes fongiques et racinaires dans l'ectomycorhize, nous avons développé des techniques permettant de réaliser une étude en masse de l'expression génique. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à l'expression d'une fraction des ESTs disponibles, à partir de filtres à faible densité en ADNc (Voiblet *et al.*, 2001). Cette analyse de l'expression de 400 ESTs, nous a permis de montrer que 17% des gènes étaient régulés au cours de la formation du manteau ectomycorhizien. Nous avons aussi observé que les gènes des deux partenaires étaient affectés dans leur expression. Toutefois, nous n'avons pas pu détecter de gènes

spécifiques de la symbiose. Cela indique que nous avons à faire à une réorganisation des patrons d'expression chez la plante et son partenaire fongique, plutôt qu'à l'expression de programmes génétiques spécifiques lors de la mise en place de la mycorhize. Cependant, on ne peut exclure l'existence de gènes spécifiques codant des facteurs de régulation transcriptionnelle (gènes maîtres) présents à quelques copies par cellule et de ce fait, indétectables par les techniques de mesure utilisées. Seule une approche de mutagenèse, suivie de complémentation de gènes, pourraient identifier ces déterminants symbiotiques.

Au cours de ces travaux, nous avons fait évoluer la technique initialement utilisée (filtres à faible densité d'ADNc) vers un système permettant de suivre l'expression simultanée de 2000 à 6000 gènes. La maîtrise de ces techniques permet désormais d'envisager l'étude du transcriptome de l'ectomycorhize à une plus vaste échelle. Notamment, elle nous a permis de suivre à partir de filtres portant près de 2000 ADNc, les profils d'expression de 715 gènes au cours du développement de la symbiose, depuis les premiers contacts, jusqu'à la mycorhize en fonctionnement. Cette étude du développement de l'organe mixte comprend l'étape de colonisation par le mycélium, la formation du manteau fongique autour de la racine, la mise en place du réseau de Hartig au sein du rhizoderme et le fonctionnement de la mycorhize mature. Nous avons également développé l'utilisation d'outils informatiques et statistiques qui permettent de visualiser l'ensemble des régulations affectant l'expression des gènes au cours du développement symbiotique.

Ainsi, nous avons montré que l'expression génique des tissus racinaires était fortement affectée par le processus symbiotique, et ce dès les premiers contacts avec le champignon. Les régulations principales mises en évidence lors de la première étude du transcriptome (Voiblet *et al.*, 2001) ont été confirmées (Chapitre 2). De plus, nous avons mis en évidence chez le mycélium de *Pisolithus*, plusieurs chronoséquences dans l'expression génique concernant des protéines de structure et des protéines de stress. Ce sont essentiellement des gènes codant les SRAPs (Laurent *et al.*, 1999) et les hydrophobines (Tagu *et al.*, 1996) qui sont les protéines les plus abondantes du manteau fongique et de l'interface plante-champignon, mais aussi des protéines qui possèdent des motifs de fixation aux métaux (méthallothionéines). En ce qui concerne les gènes racinaires, nous avons pu confirmer l'existence d'une régulation forte de l'expression de plusieurs gènes-SR. Nous montrons surtout que cette régulation est continue durant le développement de l'organe mixte (gènes codant les protéines EgTubA1, EgIcDH, EgHypar,...). Les analyses statistiques nous ont permis de dégager de nombreuses informations supplémentaires quant aux classes cellulaires principalement exprimées, aux différents stades de développement, dans les tissus mycorhiziens. Ceci souligne les avantages liés à une telle approche, qui aurait nécessité avec des techniques plus traditionnelles, une masse de travail beaucoup plus conséquente (plusieurs centaines de Northern blots). Il est ici important de souligner qu'il est nécessaire de coupler l'analyse du transcriptome par filtres à haute densité en ADNc, avec les méthodes statistiques, pour pouvoir dégager l'information parmi les données générées. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des vagues d'expression chez les deux partenaires de la symbiose, mais aussi montrer qu'il existait parfois des découplages dans certaines voies métaboliques. Par exemple chez la plante, nous avons pu noter un découplage entre glycolyse (dont les composantes sont réprimées) et respiration (dont les gènes codant des enzymes essentielles sont stimulés), ou encore un

découplage dans l'expression des gènes codant la glutamine synthétase (repression) et l'alanine amino transférase (stimulation).

Au cours de cette analyse portant sur un nombre plus élevé de gènes, nous n'avons toujours pas mis en évidence de gènes spécifiques de la symbiose. Cette absence pourrait être liée au stade de développement de l'ectomycorhize choisi pour construire la banque d'ADNc ayant servi à produire les ESTs (4 jours post-contact, formation du manteau). Il est vraisemblable qu'en se plaçant à un stade plus précoce (lors de l'échange de médiateurs chimiques rhizosphériques) nous pourrions identifier des déterminants de la réponse primaire aux signaux émis et perçus par chacun des symbiotes.

Ces études nous ont permis d'identifier et de caractériser des gènes-SR (*HydPt-3*), ou des gènes d'intérêt (voies de transduction) susceptibles de coder des fonctions essentielles à la mycorhization. Nous avons notamment pu montrer que les gènes de *P. tinctorius* codant des protéines G (*Gpa* et *ras*) et une sérine/thréonine protéine kinase (*stk*) étaient régulés par les exsudats racinaires d'*E. globulus*. Le gène *Gpa* est particulièrement intéressant car son rôle-clef dans la virulence de champignons phytopathogènes a été démontré.

Ces différents résultats confirment et complètent nos connaissances des fonctions régulées par la symbiose qui accompagnent les modifications morphologiques observées chez les deux symbiotes. Nous montrons aussi que ces changements dans les profils d'expression sont précoces et ont lieu bien avant l'existence d'une ectomycorhize fonctionnelle. L'apparition de vagues d'expression de gènes, au cours du développement de l'organe mixte, implique un rôle majeur des fonctions concernées. Il sera indispensable de démontrer leur activité biologique dans les processus symbiotiques. Cette démonstration passe par l'inactivation totale (recombinaison homologue) ou partielle (stratégie antisens) de l'expression des gènes cibles. Nous nous focaliserons sur les gènes caractérisés par ailleurs dans cette thèse (hydrophobines, voies de transduction de signaux) qui sont des gènes-SR candidats particulièrement intéressants pour leur mode de régulation ou leur fonction.

Nous disposons désormais de techniques indispensables à une étude massive de l'expression génique. Il s'agira désormais de compléter le catalogue des gènes déjà disponibles par plusieurs milliers d'autres ESTs d'ectomycorhize. Des banques d'ADNc correspondant aux différents stades de formation de l'organe mixte ont été construites (Tagu & Martin, non publié). Ainsi, les différentes fonctions mises en évidence au stade intermédiaire de 4 jours seront éventuellement enrichies de fonctions exprimées à d'autres phases du développement. L'expression génique des symbiotes sous l'influence des molécules émises lors des stades de préinfection (exsudats racinaires et hypaphorine fongique) est également en cours d'analyse.

Ce projet s'inscrit dans le cadre plus large de l'analyse comparative avec les autres champignons symbiotiques (champignons endomycorhiziens et ectomycorhiziens) ou pathogènes interagissant avec les plantes. Une telle analyse est déjà envisagée au sein du laboratoire à travers différents couples

plantes/champignons (*Eucalyptus-Pisolithus*, *Populus-Pisolithus*, *Populus-Melampsora larici populina*, la rouille foliaire du Peuplier). Ces études devraient permettre de mieux comprendre les bases moléculaires de ces interactions et d'en découvrir les déterminants. Elles peuvent être décomposées en trois parties : la création d'un index élargi de gènes (10 000 à 20 000), la réalisation des profils d'expression et l'étude de ces profils et une analyse des séquences afin d'identifier des groupes de gènes dont l'expression dépend de régulateurs communs.

Les différentes actions en cours ou à envisager à moyen terme peuvent se résumer comme suit :

Index de gènes

- (1) 10 000 ESTs de *Pisolithus*
- (2) 1000 à 2000 ESTs d'*Eucalyptus* en collaboration avec J. Grima-Pettanati (Université de Toulouse)
- (3) 1000 ESTs d'ectomycorhizes d'*E. globulus-P. tinctorius* à partir de banques d'ectomycorhizes de 4, 12 et 21 jours
- (4) 20 000 ESTs de racines de *Populus x interamericana* (action transversale INRA "LIGNOME")

Profils d'expression

- (1) racines d'*Eucalyptus* et mycélium de *Pisolithus* sous différentes conditions de culture afin de déterminer quels sont les facteurs (symbiotiques, trophiques et morphogènes) qui expliquent la régulation des gènes dans les tissus symbiotiques
- (2) analyse de l'expression de plusieurs dizaines de milliers de gènes au cours du développement de la mycorhize *E. globulus-P. tinctorius*
- (3) analyse de l'expression de plusieurs dizaines de milliers de gènes au cours du développement de la mycorhize Peuplier/*Pisolithus*
- (4) Analyse comparative des profils d'expression obtenus sur différentes mycorhizes : recherche des groupes de gènes différents ou co-régulés

Enfin, lorsque les analyses du transcriptome seront réalisées sur d'autres interactions (peuplier/endomycorhize ; peuplier/rouille ; peuplier/insectes ; peuplier/nématodes), nous rechercherons d'éventuels groupes de gènes communs à ces interactions pour analyser leurs séquences au niveau génomique (gènes candidats, promoteurs)

Analyse de séquences

- (1) recherche de promoteurs communs aux gènes co-régulés (régulons potentiels)
- (2) recherche de séquences régulatrices communes au sein des promoteurs (régulons vrais)

Références bibliographiques

Les références bibliographiques rapportées dans cette partie correspondent aux références citées dans l'introduction et la discussion générales.

- Adams MD, Kerlavage AR, Fleischmann RD, Fuldner RA, Bult CJ, Lee NH, Kirkness EF, Weinstock KG, Gocayne JD, White O, Sutton G, Blake JA, Brandon RG, Chiu MW, Clayton RA, Cline RT, Cotton MD, Earle Hughes J, Fine LD, Fitzgerald LM, Fitzhugh WM, Fritchman JL, Geoghagen NSM, Glodek A, Gnehm CL, Hanna MC, Hedblom E, Hinkle PS, Kelley JM, Klimek KM, Kelley JC, Liu LI, Marmaros SM, Merrick JM, Morenopalantes RF, McDonald LA, Nguyen DT, Pellegrino SM, Phillips CA, Ryder SE, Scott JL, Saudek DM, Shirley R, Small KV, Spriggs TA, Utterback TR, Weldman JF, Li Y, Barthlow R, Bednarik DP, Cao L, Cepeda MA, Coleman TA, Collins EJ, Dimke D, Feng P, Ferrie A, Fischer C, Hastings GA, He WW, Hu JS, Huddleston KA, Greene JM, Gruber J, Hudson P, Kim A, Kozak DL, Kunsch C, Ji H, Li H, Meissner PS, Olsen H, Raymond L, Wei YF, Wing J, Xu C, Yu GL, Ruben SM, Dillon PJ, Fannon MR, Rosen CA, Haseltine WA, Fields C, Fraser CM, Venter JC. 1995. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377:Suppl., 3-174.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res* 25:3398-3402.
- Béguiristain T, Côté R, Rubini P, Jay-Allemand C, Lapeyrie F. 1995. Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Phytochem* 40:1089-1091.
- Béguiristain T, Lapeyrie F. 1997. Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytol.* 136: 525-532.
- Boiffin V. 1997. Contribution à l'étude de la régulation du métabolisme carboné de l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius*. Thèse de Doctorat, Université Paris XI.
- Boiffin V, Hodges M, Galvez S, Balestrini R, Bonfante P, Gadal P, Martin F. 1998. Eucalypt NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. cDNA cloning and expression in ectomycorrhizae. *Plant Physiol* 117: 939-948.
- Botton B, Chalot M. 1999. Nitrogen assimilation: Enzymology in ectomycorrhizas. Pages 325-364 in: *Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function*. A.K. Varma, and B. Hock eds. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Bowtell D D L. 1999. Options available—from start to finish—for obtaining expression data microarray. *Nature Genet. Supplement* 21: 25-32.
- Brown P O, Botstein D. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genet. Supplement* 21: 33-37.
- Burgess T, Laurent P, Dell B, Malajczuk N, Martin F. 1995. Effect of the fungal isolate infectivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhiza. *Planta* 195: 408-417.
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N. 1996. *In vitro* synthesis of *Pisolithus* - *Eucalyptus* ectomycorrhiza: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza* 6:189-196.
- Carnero Diaz ME. 1996. Contribution à l'étude des gènes régulés par la symbiose chez l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius*. Etude de l'expression des gènes codant pour les α -tubulines au cours de la morphogenèse de l'ectomycorhize. Thèse de Doctorat, Université de Paris XI.

- Carnero Diaz E, Martin F, Tagu D. 1996. Eucalypt α -tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. *Plant Mol. Biol.* 31: 905-910.
- Chalot M, Brun A. 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol Rev* 22: 21-44.
- Chambers SM, Cairney JW. 1999. *Pisolithus*. In *Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile* (J. W. G. Cairney & S. M. Chambers, ed): 1-31. Springer, Berlin.
- Danell E, Camacho FJ. 1997. Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385:303.
- Desprez T, Amselem J, Caboche M, Hofte H. 1998. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.* 14:643-652.
- Dexheimer J, Gérard J, Genet P. 1994. Study of transformations of the root system of *Eucalyptus globulus* associated with *Pisolithus tinctorius*. I. Aptitude to mycorrhization of different kinds of roots. *Phytomorphology* 44:235-245.
- Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6025-6030.
- Ditengou FA, Béguiristain T, Lapeyrie F. 2000. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by IAA. *Planta* 211:722-728.
- Ditengou FA, Lapeyrie F. 2000. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in Eucalypt seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 151-158.
- Duplessis S., Tagu D. & Martin F. 2001a Living together underground : a molecular glimpse of the ectomycorrhizal symbiosis In *Molecular biology of fungal development* (Osiewacz, ed.). Mycology Series, Dekker & Dekker, New York, sous presse.
- Duplessis S, Sorin C, Voiblet C, Palin P, Martin F, Tagu D. 2001b. Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. *Curr. Genet.*, sous presse.
- Duplessis S, Martin F. 2001. cDNA array analysis of ectomycorrhiza development. *Manuscrit en préparation pour Plant Physiol.*
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D 1998 Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14863-14868.
- Encelot N. 2000. Caractérisation du transcriptome chez les arbres forestiers : étude de l'expression génique de l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius*, des racines et des feuilles de *Populus x interamericana*. Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Forestière, Université Henri Poincaré - Nancy I.
- Gadd GM. 1994. Signal transduction in fungi. In *The Growing Fungus*, (Eds, Gow N.A.R., Gadd G.M). Chapman & Hall, London, pp 183-210.
- Girke T, Todd J, White J, Benning C, Ohlrogge J. 2000. Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* 124:1570-1581.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274:546-567.
- Grove TS, LeTacon F. 1993. Mycorrhiza in plantation forestry. *Adv. Plant Pathol.*, Academic Press, London, San Diego, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, Vol. 9, 191-227.

- Guérin-Laguet A, Plassard C, Mousain D. 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can. J. Microbiol.* 46:790-799.
- Györgyey J, Vaubert D, Jiménez-Zurdo J I, Charon C, Troussard L, Kondorosi A, Kondorosi E. 2000. Analysis of *Medicago trunculata* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 62-71.
- Hampp R, Schaeffer C. 1999. Mycorrhiza - Carbohydrates and energy metabolism. Pages 267-296 in: *Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function*. A.K. Varma, and B. Hock eds. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Hilbert JL, Martin F. 1988. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. *New Phytol.* 110:339-346.
- Hilbert JL, Costa G, Martin F. 1991. Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiol.* 97:977-984.
- Höfte H, Desprez T, Amselem J, Chiapello H, Caboche M, Moisan A, Jourjon MF, Charpentieu JL, Berthomieu P, Guerrier D, Giraudat J, Quigley F, Thomas F, Yu DY, Mache R, Raynal M, Cooke R, Grellet F, Delseny M, Parmentier Y, De Marcillac G, Gigot C, Fleck J, Phillips G, Axelos M, Bardet C, Trémousaygue D, Lescure B. 1993. An inventory of 1152 Expressed Sequence Tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4 :1051-1061.
- Kasahara S, Nuss DL. 1997. Targeted disruption of a fungal G-protein β subunit gene results in increased vegetative growth but reduced virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:984-993.
- Kershaw KJ, Talbot NJ. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 23:18-33.
- Kim SJ, Bernreuther D, Thumm M, Podila GK. 1999. *LB-AUT7*, a novel symbiosis-regulated gene from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis. *J. Bacteriol.* 181:1963-1967.
- Lagrange H, Jay-Allemand C, Lapeyrie F. 2001. Rutin, the phenolglycoside from *eucalyptus* root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytol.* 149: 349-355.
- Laurent P, Voiblet C, Tagu D, de Carvalho D, Nehls U, De Bellis R, Balestrini R, Bauw G, Bonfante P, Martin F. 1999. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 862-871.
- LePage BA, Currah RS, Stockey RA, Rothwell GW. 1997. Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. *Am. J. Bot.* 84: 410-412.
- Lorillou S. 1995. Contribution à l'étude de la régulation de la glutamate déshydrogénase à NADP chez le basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy I.
- Malajczuk N, Lapeyrie F, Garbaye J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *New Phytol.* 114: 627-631.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics.* 26: 403-410.
- Marshall JD, Perry DA. 1987. Basal and maintenance respiration of mycorrhizal and nonmycorrhizal root systems of conifers. *Can. J. Bot. Res.* 17: 872-877.

- Martin F, Lapeyrie F, Tagu D. 1997. Altered gene expression during ectomycorrhizal development. *The Mycota*, Vol. V, Part A, Plant Relationships, G Caroll, P Tudzynski (eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 223-242.
- Martin F, Voiblet C. 1998. Large-scale sequencing of anonymous ectomycorrhiza cDNA clones. In "Mycorrhiza Manual", Varma A, ed., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 475-493.
- Martin F, Boiffin V, Pfeffer PE. 1998. Carbohydrate and amino acid metabolism in the *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza during glucose utilization. *Plant Physiol.* 118:627-635.
- Martin F, Laurent P, de Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, Bonfante P, Tagu D. 1999. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genet. Biol.* 27:161-174.
- Martin F, Tagu D. 1999. Developmental biology of a plant-fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. *Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function* 2nd Edition (A. K. Varma and B. Hock, eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, pp. 51-73.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes, *New Phytol.*, sous presse.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA and Melville LH. 1990. Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis* - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* 68:579-593.
- Mourer M. 1998. Modification de la biosynthèse des protéines lors du développement de l'ectomycorhize *Eucalyptus globulus bicostata* - *Pisolithus tinctorius*. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré - Nancy I.
- Nehls U, Kleber R, Wiese J, Hampp R. 1999. Isolation and characterization of a general amino acid permease from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytol.* 144:343-349.
- Nehls U, Béguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F, Martin F. 1998. The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophane betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta* 207: 296-302.
- Nelson MA, Kang SC, Braun EL, Crawford ME, Dolan PL, Leonard PM, Mitchell J, Armijo AM, Bean L, Blueyes E, Cushing T, Errett A, Fleharty M, Gorman M, Judson K, Miller R, Ortega J, Pavlova I, Perea J, Todisco S, Trujillo R, Valentine J, Wells A, Werner-Washburne M, Yazzie S, Natvig DO. 1997. Expressed sequences from conidial, mycelial, and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 21:348-363.
- Newman T, De Bruijn FJ, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohlrogge J, Raikhel N, Somerville S, Thomashow M, Retzel E and Somerville C. 1994. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* 106:1241-1255.
- Nguyen C, Rocha D, Grandjeaud S, Baldit M, Bernard K, Naquet P, Jordan B R. 1995 Differential expression in the Murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clone. *Genomics* 29, 207-216.
- Ospina-Giraldo MD, Collopy PD, Romaine CP, Royse DJ. 2000. Classification of sequences expressed during the primordial and basidiome stages of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Fungal Genet. and Biol.* 29:81-94.
- Pietu G, Alibert O, Guichard V, Lamy B, Bois F, Leroy E, Mariage-Sampson R, Houlgate R, Soularue P, Auffrey C. 1996. Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high cDNA array. *Genome Res.* 6: 492-503.
- Qutob D, Hrabert PT, Sobral BWS, Gijzen M. 2000. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol.* 123:243-253.

- Rabbani S, Chalot M, Botton B and Martin F. 1992. Utilisation de l'alanine par les plantules d'*Eucalyptus* associées au champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. Bulletin des Académie et Société Lorraines des Sciences 31:131-139.
- Regenfelder E, Spellig T, Hartmann A, Lauenstein S, Bolker M, Kahmann R. 1997. G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? EMBO J. 16:1934-1942.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer E E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. Plant Cell 12: 707-719.
- Richmond C S, Glasner J D, Mau R, Jin H, Blattner F R. 1999. Genome wide expression profiling in *Escherichia coli*. Nucl. Acids Res. 27:3821-3835.
- Rosado SCS, Kropp BR and Piché Y. 1994a. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. I. Host plant variability and heritability of ectomycorrhizal and root traits. New Phytol. 126:105-110.
- Rosado SCS, Kropp BR and Piché Y. 1994b. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. II. Fungal variability and heritability of ectomycorrhizal traits. New Phytol. 126:111-117.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Ford N, Nolan C, Fergusson M, Eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sasaki N, Nagaoka S, Itoh M, Izawa M, Konno H, Carninci P, Yoshiki A, Kusakabe M, Moriuchi T, Muramatsu M, Okazaki Y, Hayashizaki Y. 1998. Characterization of gene expression in mouse blastocyst using single-pass sequencing of 3995 clones. Genomics 49:167-179.
- Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E. 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis. Plant Cell 13: 113-123.
- Schenk P M, Kazan K, Wilson I, Anderson J P, Richmond T, Somerville S C, Manners J M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 11655-11660.
- Segers GC, Hamada W, Oliver RP, Spanu PD. 1999. Isolation and characterization of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. Mol. Gen. Genet. 261:644-652.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. Plant Cell 13: 61-72.
- Smith SE, Read DJ. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed. London : Academic Press.
- Sorin C. 2000. Contribution à la caractérisation des rôles de protéines acides pariétales fongiques dans la formation de l'ectomycorhize. Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie, diversité et adaptation des plantes cultivées, option phytopathologie. Université Paris XI.
- Tagu D, Python M, Crépin C, Martin F. 1993. Cloning symbiosis-related cDNAs from eucalypt ectomycorrhiza by PCR-assisted differential screening. New Phytol. 125:339-343.
- Tagu D, Martin F. 1995. Expressed sequence tags of randomly selected cDNA clones from *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:781-783.
- Tagu D, Martin F. 1996. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhizal development. New Phytol. 133:73-85.
- Tagu D, Nasse B, Martin F. 1996. Cloning and characterization of hydrophobin-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Gene 168:93-97.
- Tagu D, Faivre-Rampant P, Lapeyrie F, Frey-Klett P, Vion P, Villar M. 2001. Variations in the ability to form ectomycorrhizas in F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus* spp.) cross. Mycorrhiza, sous presse.

- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR 1999 Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 16:2907-12.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Truesdell G M, Yang Z, Dickman M B. 2000 A G α subunit gene from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum trifolii* is required for conidial germination. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56, 131-140.
- Voiblet C, Martin F. 1999. Identifying symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza using suppression subtractive hybridization and cDNA arrays. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 9th International Congress, Amsterdam July 25-30, PJGM de Wit, T Bisseling and WJ Stiekema Eds, pp. 208-213.
- Voiblet C. 1999. Etude des modifications du transcriptome d'*Eucalyptus globulus* et *Pisolithus tinctorius* au cours du développement de la symbiose ectomycorhizienne. Thèse de Doctorat, Université Paris XI.
- Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F. 2001. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant J.* 25: 181-191.
- Wang R, Guegler K, LaBrie S T, Crawford N M. 2000. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* 12: 1491-1509.
- Wessels JGH. 1997. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microb. Physiol.* 38:1-45.
- White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, Martinez de Ilàrduya O, Jaworski JG, Ohlrogge JB, Benning C. 2000. A new set of *Arabidopsis* expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol.* 124:1582-1594.
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. 1999. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucl. Acids Res.* 27:1517-1523.

Caractérisation par ingénierie génomique des profils d'expression génique de *Pisolithus tinctorius* et d'*Eucalyptus globulus* au cours du développement de la symbiose ectomycorhizienne

Résumé

Les ectomycorhizes sont des associations symbiotiques établies entre les racines des arbres et certains champignons du sol. Ces relations mutualistes, dont les bénéfices sont avant tout trophiques, entraînent des modifications morphologiques et métaboliques importantes chez les deux partenaires. La formation de l'ectomycorhize *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius*, s'accompagne également d'un changement du protéome et de l'expression génique des racines et du champignon. Afin d'acquérir une vision globale des gènes exprimés et régulés au cours de la formation de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius*, nous avons développé une analyse de l'expression génique dans l'organe symbiotique via l'analyse du transcriptome. Une première étude, nous a permis d'obtenir les profils d'expression de 400 ESTs (Expressed Sequence Tags) dans une ectomycorhize en formation. Nous avons ainsi pu identifier 17% des ESTs qui sont régulés par la symbiose. Nous avons poursuivi notre analyse sur plus de 700 ESTs au cours du développement de l'organe symbiotique, depuis les premiers contacts entre les symbiotes jusqu'à la mise en place de l'ectomycorhize fonctionnelle. L'analyse statistique des profils d'expression nous a permis de mettre en évidence (i) des ensembles de gènes co-régulés (régulons) et (ii) une chronoséquence dans l'expression génique. Parmi les gènes fortement régulés, nous avons identifié : ceux codant les protéines pariétales fongiques (hydrophobines et SRAP32), plusieurs familles de métallothionéines, des protéines de signalisation, des protéines de stress hydrique et des enzymes de la respiration mitochondriale. Parmi ces gènes régulés, nous avons caractérisé en détail, un gène codant une nouvelle hydrophobine, *HydPt-3*, et plusieurs gènes de communication fongiques (*ras*, *raf*, *calcineurine*)

Mots-clefs : Ectomycorhize - *Eucalyptus* - Expressed Sequence Tags - Filtres d'ADNc - Hydrophobine - *Pisolithus* - Régulons - Signalisation.

Monitoring *Pisolithus tinctorius* and *Eucalyptus globulus* gene expression during the ectomycorrhizal symbiosis development using cDNA arrays and cluster analysis

Summary

Ectomycorrhiza formation and function alter both fungal and plant gene expression. The identification of a large number of novel genes expressed exclusively or predominantly in the symbiosis will contribute greatly to the understanding of the function of the ectomycorrhizal association. We have constructed a cDNA library of 4-day-old *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by random cloning and through suppression subtractive hybridization. We screened 715 arrayed cDNAs to identify symbiosis-regulated genes by using differential hybridization. Gene expression profiles obtained from free-living *Pisolithus tinctorius*, non-inoculated roots and ectomycorrhizas at various developmental stages, from the earliest contacts (4 days) to the functioning symbiotic organ (28 days) were analyzed. Comparisons of free-living partners and symbiotic tissues revealed significant changes in the expression levels (differential expression ratio > 2.0) for 11 to 23% of the genes analyzed at the different stages of mycorrhiza formation. No ectomycorrhiza-specific gene was detected. We derived groups of coordinately expressed genes (i.e. regulons) using hierarchical clustering and Self Organizing Maps. At least a dozen of distinct temporal patterns of induction/repression were observed. The main fungal regulons contained genes coding for cell-wall and membrane proteins, communication genes, and metallothionein-related proteins. In the host root, a major down-regulated regulon comprised genes involved in water transport and stress suggesting that mycorrhiza development improves water uptake. We have furthermore characterized cDNA clones corresponding to *Pisolithus* signalling genes (*ras*, *raf* and *calcineurine*) and to a new hydrophobin gene (*HydPt-3*).

Key words: cDNA-arrays - Ectomycorrhiza - Expressed Sequence Tags - Hydrophobin - Regulon - Signalling - Symbiosis-Regulated Genes .

Monsieur DUPLESSIS Sébastien

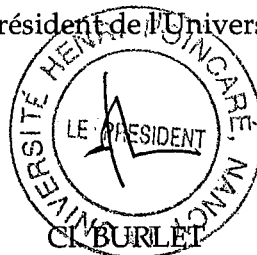
DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I

en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 27 avril 2001 n° 513

Le Président de l'Université



Caractérisation par ingénierie génomique des profils d'expression génique de *Pisolithus tinctorius* et d'*Eucalyptus globulus* au cours du développement de la symbiose ectomycorhizienne

Résumé

Les ectomycorhizes sont des associations symbiotiques établies entre les racines des arbres et certains champignons du sol. Ces relations mutualistes, dont les bénéfices sont avant tout trophiques, entraînent des modifications morphologiques et métaboliques importantes chez les deux partenaires. La formation de l'ectomycorhize *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius*, s'accompagne également d'un changement du protéome et de l'expression génique des racines et du champignon. Afin d'acquérir une vision globale des gènes exprimés et régulés au cours de la formation de l'ectomycorhize *E. globulus*-*P. tinctorius*, nous avons développé une analyse de l'expression génique dans l'organe symbiotique via l'analyse du transcriptome. Une première étude, nous a permis d'obtenir les profils d'expression de 400 ESTs (Expressed Sequence Tags) dans une ectomycorhize en formation. Nous avons ainsi pu identifier 17% des ESTs qui sont régulés par la symbiose. Nous avons poursuivi notre analyse sur plus de 700 ESTs au cours du développement de l'organe symbiotique, depuis les premiers contacts entre les symbiotes jusqu'à la mise en place de l'ectomycorhize fonctionnelle. L'analyse statistique des profils d'expression nous a permis de mettre en évidence (i) des ensembles de gènes co-régulés (régulons) et (ii) une chronoséquence dans l'expression génique. Parmi les gènes fortement régulés, nous avons identifié : ceux codant les protéines pariétales fongiques (hydrophobines et SRAP32), plusieurs familles de métallothionéines, des protéines de signalisation, des protéines de stress hydrique et des enzymes de la respiration mitochondriale. Parmi ces gènes régulés, nous avons caractérisé en détail, un gène codant une nouvelle hydrophobine, *HydPt-3*, et plusieurs gènes de communication fongiques (*ras*, *raf*, *calcineurine*)

Mots-clefs : Ectomycorhize - *Eucalyptus* - Expressed Sequence Tags - Filtres d'ADNc - Hydrophobine - *Pisolithus* - Régulons - Signalisation.

Monitoring *Pisolithus tinctorius* and *Eucalyptus globulus* gene expression during the ectomycorrhizal symbiosis development using cDNA arrays and cluster analysis,

Summary

Ectomycorrhiza formation and function alter both fungal and plant gene expression. The identification of a large number of novel genes expressed exclusively or predominantly in the symbiosis will contribute greatly to the understanding of the function of the ectomycorrhizal association. We have constructed a cDNA library of 4-day-old *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by random cloning and through suppression subtractive hybridization. We screened 715 arrayed cDNAs to identify symbiosis-regulated genes by using differential hybridization. Gene expression profiles obtained from free-living *Pisolithus tinctorius*, non-inoculated roots and ectomycorrhizas at various developmental stages, from the earliest contacts (4 days) to the functioning symbiotic organ (28 days) were analyzed. Comparisons of free-living partners and symbiotic tissues revealed significant changes in the expression levels (differential expression ratio > 2.0) for 11 to 23% of the genes analyzed at the different stages of mycorrhiza formation. No ectomycorrhiza-specific gene was detected. We derived groups of coordinately expressed genes (i.e. regulons) using hierarchical clustering and Self Organizing Maps. At least a dozen of distinct temporal patterns of induction/repression were observed. The main fungal regulons contained genes coding for cell-wall and membrane proteins, communication genes, and metallothionein-related proteins. In the host root, a major down-regulated regulon comprised genes involved in water transport and stress suggesting that mycorrhiza development improves water uptake. We have furthermore characterized cDNA clones corresponding to *Pisolithus* signalling genes (*ras*, *raf* and *calcineurine*) and to a new hydrophobin gene (*HydPt-3*).

Key words: cDNA-arrays - Ectomycorrhiza - Expressed Sequence Tags - Hydrophobin - Regulon - Signalling - Symbiosis-Regulated Genes.