



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

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

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université  
en Biologie Forestière

par **Didier DOILLON**

# *Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes*

Soutenue publiquement le 10 décembre 2010

**Directeur de thèse :** Pr Michel CHALOT

**Co-directeur :** Dr Damien BLAUDEZ

### Membres du jury :

|                     |                                       |            |
|---------------------|---------------------------------------|------------|
| M. Roland MARMEISSE | CNRS, Université de Lyon1             | Rapporteur |
| Mme Silvia PEROTTO  | Université de Turin, Italie           | Rapporteur |
| M. Patrick BILLARD  | Nancy-Université                      | Examineur  |
| M. Damien BLAUDEZ   | Nancy-Université                      | Examineur  |
| M. Michel CHALOT    | Nancy-Université                      | Examineur  |
| Melle Elise DAVID   | Université de Reims Champagne-Ardenne | Examineur  |



# **Remerciements :**

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements, peut-être les lignes de cette thèse les plus difficiles à écrire. Non qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront.

De plus, chaque personne qui y est citée mérite la plus belle phrase, ce qui nécessite des réels talents littéraires...que je n'ai pas forcément. Ainsi comme tout un chacun, je vais essayer de faire au mieux et que tous les gens qui me liront sachent que ces quelques lignes ont été écrites avec tout mon cœur.

Tout d'abord mes remerciements s'adressent aux personnes qui m'ont proposé le sujet de thèse et qui m'ont encadré tout au long de ces années d'étude : MM. Michel CHALOT et Damien BLAUDEZ. Je salue la souplesse et l'ouverture d'esprit de mes directeurs de thèse qui ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Vos conseils ont toujours été avisés, j'ai apprécié travailler avec vous durant ces trois années. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant à la confiance dont ils ont fait preuve à mon égard.

Et plus particulièrement, je salue Damien, qui a su me donner toute la latitude nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, pour intervenir avec un œil avisé et critique, parfois un peu trop...pour la phase de correction. Nul doute que ces corrections ont amélioré significativement la qualité de ce mémoire. Merci.

Ensuite je tiens à exprimer mes remerciements envers M. Roland MARMEISSE et envers Mme Silvia PEROTTO d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et d'évaluer mon travail de thèse.

Merci également à M. Patrick BILLARD, M. Damien BLAUDEZ, M. Michel CHALOT et Melle Elise DAVID pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

J'aimerais remercier l'équipe Symbiose Mycorhizienne de l'Université de Lyon 1 pour m'avoir accueilli, ainsi que Frédéric (un hôtel que je recommande, ma chambre est haut perchée mais la vue à la sortie est terrible !) et Elise, pour leur sympathie et le partage des informations. Un merci tout particulier à Elise et Marie-Christine pour une très bonne initiation au meilleur « bouchon »...

Je tiens à remercier particulièrement Jan Colpaert pour son accueil et sa disponibilité lors de nos déplacements en Belgique, ainsi que Simone Othonello, autre acteur du Projet EUMETATOX.

Pour l'ambiance chaleureuse et amicale du « 4 » qu'ils contribuent à maintenir au sein du département, je tiens à remercier en particulier :

- Annick et Claire, pour leur accueil, leur patience et leur disponibilité
- Mon « collègue de bureau » Bernard Botton, pour sa gentillesse, son accessibilité et nos longues discussions sur l'origine des champignons !
- Chantal pour sa gentillesse et son humanité
- Maman Eva et ses sublimes gâteaux aussi beaux à regarder qu'à manger !
- Laurence pour sa gentille, son aide précieuse et les discussions non moins précieuses autour de notre passion commune des trolls ...
- Aude : les micro-organismes c'est l'avenir ! ...



- Loïc : toujours prêt à aider, un vrai Mac Gyver ... (n'oublies pas Wegan Rules)
- Jérémy et Carine pour nos discussions et votre sympathie
- Frédéric : pour toute l'aide que tu m'as apporté lors des looooongues manips mais toujours égayées d'humour
- Valérie Legué : pour tous ses conseils avisés et précieux en microscopie

Merci aux directeurs de l'unité UMR1136 : Francis Martin et Jean-Pierre Jacquot, puis Pascale Frey-Klett et Eric Gelhaye, et à tous mes collègues de l'unité, il serait long de tous vous citer mais je vous dis à tous un grand MERCI.

Je me dois bien sûr de remercier aussi, la région Lorraine pour avoir subventionné ce travail.

Au-delà des murs du laboratoire et du carcan dans lequel s'enferme tout thésard, il existe une vie dans laquelle j'ai pu compter sur J.P., Raoul, Michaël, Guillaume, Fred. Leur amitié a été le meilleur des réconforts et exutoire lorsque j'avais besoin de me changer les idées.

*A ce titre j'en profite pour remercier chaudement le Docteur Martin Cooper, directeur de la recherche et du développement chez Motorola, inventeur du téléphone cellulaire en avril 1973, sans lui, et loin de mes amis et de ma famille, je n'aurai pas pu garder le contact aussi facilement !!*

Cela va de soi, je remercie de tout mon cœur ma famille pour son soutien sans faille, sans eux rien n'aurait été possible... Merci Valérie et Marie pour ce soutien sans faille durant ces trois années ...

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse à ma Maman, elle nous a quittés cet été, trop tôt, et je sais qu'elle aurait été fière de me voir arriver au bout de ce long parcours.



*« [...] Pour moi, la science est une aspiration de l'esprit humain qui cherche l'unité sous le chaos de la nature, comme un écrivain la cherche dans la variété de la nature humaine.[...] Il est important que les étudiants portent un regard neuf et irrévérencieux sur leurs études; il ne doivent pas vénérer le savoir mais le remettre en question. »*

Jacob Bronowski (1908-1974)

Science and Human Values" (1956)

## **Liste des abréviations :**

|        |                                                 |
|--------|-------------------------------------------------|
| AA     | Acides aminés                                   |
| ADN    | Acide désoxyribonucléique                       |
| ADNc   | ADN complémentaire                              |
| ADNr   | ADN ribosomique                                 |
| ARN    | Acide ribonucléique                             |
| ARNm   | ARN messenger                                   |
| ARNr   | ARN ribosomique                                 |
| Cd     | Cadmium                                         |
| CDF    | Cation Diffusion Facilitator                    |
| Co     | Cobalt                                          |
| Cu     | Cuivre                                          |
| DNase  | Désoxyribonucléase                              |
| dNTP   | 2'-déoxynucléoside 5'-trisphosphate             |
| EDTA   | Acide Ethylènediamine tétraacétique             |
| EST    | Expressed Sequence Tag                          |
| Fe     | Fer                                             |
| FOA    | acide 5-fluoro-orotique                         |
| FPGN   | Fond Pédo-Géochimique Naturel                   |
| IRT    | Iron-Regulated Transporter                      |
| kb     | kilobase                                        |
| Mn     | Manganèse                                       |
| Ni     | Nickel                                          |
| pb     | paire de base                                   |
| PCR    | Réaction de Polymérisation en Chaîne            |
| rpm    | rotation par minute                             |
| RT     | Réverse Transcription                           |
| RT-PCR | Réverse Transcription de l'ARN suivie d'une PCR |
| ZIP    | ZRT-IRT-like proteins                           |
| Zn     | zinc                                            |
| ZRT    | zinc-regulated transporter                      |



# Sommaire

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Introduction.....                                                         | 1  |
| Chapitre I : Synthèse bibliographique.....                                | 5  |
| I.1. Les éléments traces :                                                | 7  |
| I.1.1. Généralités :                                                      | 7  |
| I.1.2. La notion de « métal lourd » :                                     | 9  |
| I.1.3. Notion d'élément essentiel :                                       | 11 |
| I.1.4. Origines dans le sol et pollution environnementale :               | 11 |
| I.1.4.1. Origines naturelles des métaux lourds :                          | 13 |
| I.1.4.2. Origines anthropiques des métaux lourds :                        | 15 |
| I.1.4.2.1. Le zinc :                                                      | 15 |
| I.1.4.2.2. Le cadmium :                                                   | 16 |
| I.1.5. Absorption des métaux par les organismes terrestres :              | 17 |
| I.1.5.1. Définition de la biodisponibilité des métaux :                   | 17 |
| I.1.5.2. Mécanismes d'absorption des métaux :                             | 17 |
| I.1.6. Toxicité du zinc :                                                 | 20 |
| I.1.6.1. Toxicité du zinc au niveau des organismes :                      | 20 |
| I.1.6.1.1. La toxicité chez les animaux et les humains :                  | 20 |
| I.1.6.1.2. Phytotoxicité :                                                | 22 |
| I.1.6.1.3. Toxicité pour les micro-organismes du sol :                    | 22 |
| I.1.6.2. Toxicité des métaux lourds au niveau cellulaire :                | 23 |
| I.1.6.2.1. Altération des membranes cellulaires :                         | 23 |
| I.1.6.2.2. Inhibition d'enzymes :                                         | 25 |
| I.1.6.2.3 Interaction avec les acides nucléiques :                        | 26 |
| I.1.7. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds :                        | 28 |
| I.1.7.1. Complexation et précipitation extracellulaire :                  | 28 |
| I.1.7.2. Fixation aux parois cellulaires :                                | 30 |
| I.1.7.3. Séquestration intracellulaire et efflux de métaux:               | 32 |
| I.1.7.4. Chélation intracellulaire des métaux :                           | 34 |
| I.1.7.5. Compartimentation vacuolaire:                                    | 35 |
| I.1.7.6. Transformation des métaux :                                      | 35 |
| I.1.7.7. Système de détoxification anti-oxydatif :                        | 37 |
| I.1.7.8. Autre mécanismes :                                               | 37 |
| I.2. <i>Laccaria bicolor</i> et la symbiose mycorrhizienne :              | 39 |
| I.2.1. La symbiose mycorrhizienne :                                       | 39 |
| I.2.1.1. Ectomycorhizes :                                                 | 39 |
| I.2.1.2. Endomycorhize à arbuscules :                                     | 39 |
| I.2.1.3. Autres type de mycorhizes :                                      | 40 |
| I.2.2. Rôle des ectomycorhizes dans l'écosystème :                        | 40 |
| I.2.2.1. Echanges trophiques :                                            | 42 |
| I.2.2.1.1. Bénéfices pour la plante :                                     | 42 |
| I.2.2.1.2. Bénéfices trophiques pour le champignon :                      | 42 |
| I.2.2.2. Protection de la plante :                                        | 44 |
| I.2.2.2.1. Protection contre les pathogènes :                             | 44 |
| I.2.2.2.2. Protection contre les xénobiotiques :                          | 46 |
| I.2.2.2.2.1. Généralités :                                                | 46 |
| I.2.2.2.2.2. Protection contre les effets toxiques des<br>métaux lourds : | 46 |
| I.2.3. <i>Laccaria bicolor</i> :                                          | 49 |
| I.2.3.1. Généralités :                                                    | 49 |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.2.3.2. Origine de la souche utilisée :.....                                                         | 49 |
| I.2.3.3. Le cycle de vie de <i>Laccaria bicolor</i> :.....                                            | 51 |
| I.3. De la génétique « classique » à la métatranscriptomique des<br>microorganismes eucaryotes :..... | 51 |
| I.3.1. Les microorganismes eucaryotes :.....                                                          | 51 |
| I.3.1.1. Les Unicotes :.....                                                                          | 51 |
| I.3.1.2. Les Bicotes :.....                                                                           | 53 |
| I.3.2. De la génétique à la génomique :.....                                                          | 56 |
| I.3.3. à la métagénomique :.....                                                                      | 57 |
| I.3.3.1. Analyse des séquences du métagénome :.....                                                   | 58 |
| I.3.3.2. Analyse des fonctions du métagénome : .....                                                  | 58 |
| I.3.3.2.1. La taille du génome eucaryote :.....                                                       | 59 |
| I.3.3.2.2. La présence fréquente d'introns :.....                                                     | 59 |
| I.3.3.2.3. Des problèmes techniques :.....                                                            | 60 |
| I.3.4. ... à la métatranscriptomique :.....                                                           | 60 |
| I.3.4.1. Généralités :.....                                                                           | 60 |
| I.3.4.2. Le projet EUMETATOX :.....                                                                   | 60 |
| Chapitre II : Matériels et Méthodes.....                                                              | 63 |
| II.1 Les sites d'étude :.....                                                                         | 65 |
| II.2. Matériels biologiques :.....                                                                    | 67 |
| II.2.1. Isolats fongiques et conditions de culture :.....                                             | 67 |
| II.2.2. Souche bactérienne d' <i>Escherichia coli</i> et conditions de culture :.....                 | 69 |
| II.2.3. Souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et conditions de culture :.....                    | 69 |
| II.2.4. Plasmides utilisés :.....                                                                     | 69 |
| II.2.4.1. Plasmide d' <i>E.coli</i> :.....                                                            | 69 |
| II.2.4.2. Plasmides navettes <i>S.cerevisiae</i> - <i>E.coli</i> :.....                               | 72 |
| II.2.4.2.1. pFL61 :.....                                                                              | 72 |
| II.2.4.2.2. pYES2 : .....                                                                             | 72 |
| II.2.4.3. Plasmide de la banque de métatranscriptomique :.....                                        | 72 |
| II.3. Méthodes :.....                                                                                 | 73 |
| II.3.1. Technique d'extraction et d'analyse des acides nucléiques :.....                              | 73 |
| II.3.1.1. Extraction de l'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> :.....                                    | 73 |
| II.3.1.2. Extraction des ARN totaux de matériels fongiques :.....                                     | 73 |
| II.3.1.3. Extraction d'ARN de sol :.....                                                              | 74 |
| II.3.1.4. Analyse des taux de transcrits par RT-PCR :.....                                            | 75 |
| II.3.1.5. Analyses du taux d'expression sur une lame génome entier :.....                             | 75 |
| II.3.2. Techniques d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain<br>Reaction) :.....               | 77 |
| II.3.2.1. Généralités :.....                                                                          | 77 |
| II.3.2.2. Les amorces nucléotidiques : .....                                                          | 77 |
| II.3.2.3. Composition de la réaction :.....                                                           | 80 |
| II.3.2.4. Conditions d'amplification :.....                                                           | 80 |
| II.3.3. Technique de clonage :.....                                                                   | 80 |
| II.3.3.1 Préparation du vecteur :.....                                                                | 80 |
| II.3.3.2. Préparation du fragment à cloner :.....                                                     | 82 |
| II.3.3.3. Ligation :.....                                                                             | 82 |
| II.3.3.4. Transformation des bactéries :.....                                                         | 82 |
| II.3.3.4.1. Préparation de bactéries compétentes : .....                                              | 82 |
| II.3.3.4.2. Transformation par choc thermique :.....                                                  | 82 |
| II.3.4. Expression hétérologue dans <i>S. cerevisiae</i> :.....                                       | 83 |
| II.3.4.1. Transformation de <i>S. cerevisiae</i> :.....                                               | 83 |

|                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| II.3.4.1.1. Transformation des levures par choc thermique<br>à partir de la banque :.....                                   | 83  |
| II.3.4.1.2. Transformation des levures par choc thermique<br>à partir de minipréparation de plasmides :.....                | 84  |
| II.3.4.2. Tests de complémentation :.....                                                                                   | 84  |
| II.3.4.2.1. Test de complémentation « classique » :.....                                                                    | 84  |
| II.3.4.2.2. Test de complémentation lors des<br>expérimentations de métatranscriptomique :.....                             | 86  |
| II.3.4.2.3. Mise en évidence de l'importance du plasmide :.....                                                             | 86  |
| II.3.5 Localisation subcellulaire de protéines par fusion GFP :.....                                                        | 88  |
| II.3.6. Dosage des éléments minéraux :.....                                                                                 | 89  |
| II.3.6.1. Prélèvement :.....                                                                                                | 89  |
| II.3.6.2. Dosage des métaux totaux (dans le sol, les aiguilles<br>de pin et les carpophores) :.....                         | 90  |
| II.3.6.3 Dosage des éléments échangeables du sol :.....                                                                     | 90  |
| II.3.7. Analyses bioinformatiques :.....                                                                                    | 90  |
| II.3.8. Analyses statistiques :.....                                                                                        | 91  |
| Chapitre III : Le métatranscriptome de microorganismes eucaryotes du sol soumis<br>à une pollution aux métaux lourds :..... | 93  |
| III.1. Caractéristiques des sites étudiés :.....                                                                            | 94  |
| III.1.1. Caractéristiques des sols d'intérêt :.....                                                                         | 94  |
| III.1.2. Teneur en zinc dans les sols : figure 28.....                                                                      | 96  |
| III.1.3. Teneur en zinc dans les aiguilles de pins :.....                                                                   | 96  |
| III.2. Etude de la diversité taxinomique :.....                                                                             | 98  |
| III.2.1. Diversité macroscopique :.....                                                                                     | 98  |
| III.2.2. Etude des banques d'acides nucléiques ribosomiques 18S .....                                                       | 98  |
| III.3. Etude de la diversité fonctionnelle :.....                                                                           | 100 |
| III.3.1. Construction des banques d'ADNc :.....                                                                             | 100 |
| III.3.1.1. Prélèvements :.....                                                                                              | 100 |
| III.3.1.2. Extraction des acides nucléiques :.....                                                                          | 100 |
| III.3.1.3. Purification des ARNm, synthèse des ADNc et clonage :.....                                                       | 101 |
| III.3.2. Criblage des banques d'ADNc par expression hétérologue dans la<br>levure :.....                                    | 101 |
| III.3.2.1. Complémentation fonctionnelle du mutant $\Delta Zrc1$ :.....                                                     | 101 |
| III.3.2.1.1. Test de résistance au zinc :.....                                                                              | 101 |
| III.3.2.1.2. Transformation : .....                                                                                         | 103 |
| III.3.2.1.3. Sélection des clones d'intérêt :.....                                                                          | 103 |
| III.3.2.2. Analyse des séquences d'ADNc restaurant le phénotype<br>$\Delta Zrc1$ :.....                                     | 107 |
| III.3.3. Tests phénotypiques de spécificité métallique :.....                                                               | 112 |
| III.3.4 Analyse des banques d'ADNc par séquençage massif :.....                                                             | 115 |
| III.4. Discussion.....                                                                                                      | 116 |
| III.4.1. L'échantillonnage :.....                                                                                           | 116 |
| III.4.2. L'extraction d'acides nucléiques :.....                                                                            | 117 |
| III.4.3. Etude de la diversité fonctionnelle de métacommunautés d'intérêt :.....                                            | 117 |
| III.4.3.1. La protéine similaire au cytochrome b5 :.....                                                                    | 118 |
| III.4.3.2. Les saccharopines déshydrogenases :.....                                                                         | 120 |
| III.4.3.3. Les protéines BolA :.....                                                                                        | 122 |
| III.4.3.4. Les Skp1 / Ubiquitine :.....                                                                                     | 124 |
| III.4.3.4.1. Le complexe Rave :.....                                                                                        | 124 |
| III.4.3.4.2. Le complexe SCF :.....                                                                                         | 125 |
| III.4.4. Conclusions :.....                                                                                                 | 126 |

|                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Chapitre IV : Homéostasie au zinc chez le champignon ectomycorhizien <i>Laccaria</i><br><i>bicolor</i> : | 129 |
| IV.1. Tolérance au zinc de <i>Laccaria bicolor</i> médiée par les protéines CDF :                        | 131 |
| IV.1.1. Analyse phylogénétique des protéines fongiques de la famille CDF:                                | 131 |
| IV.1.1.1. Sous-famille I : Transporteurs de zinc :                                                       | 133 |
| IV.1.1.2. Sous-famille II : Transporteurs de manganèse :                                                 | 137 |
| IV.1.1.3. Sous-famille III : Transporteurs de fer et de zinc :                                           | 137 |
| IV.1.1.4. Sous-famille IV : Cluster incluant ScZRG17 :                                                   | 139 |
| IV.1.2. Etude de quelques gènes CDFs de <i>Laccaria bicolor</i> :                                        | 139 |
| IV.1.2.1. Etude de l'organisation des gènes d'intérêt :                                                  | 139 |
| IV.1.2.2. Etude de la topologie des gènes d'intérêt :                                                    | 141 |
| IV.1.2.3. Clonage des ADNc des protéines d'intérêt :                                                     | 141 |
| IV.1.2.4. Expressions des gènes de la famille CDF :                                                      | 141 |
| IV.1.2.4.1. Analyse des ESTs des gènes CDFs<br>de <i>Laccaria bicolor</i> :                              | 143 |
| IV.1.2.4.2. Niveau d'expression des gènes dans le<br>mycélium soumis à un stress métallique :            | 143 |
| IV.1.2.4.3. Niveau d'expressions des gènes au sein des<br>différents tissus de <i>Laccaria bicolor</i> : | 145 |
| IV.1.2.5. Caractérisation fonctionnelle de quelques transporteurs<br>de la famille CDF :                 | 145 |
| IV.1.2.5.1. Tests de résistance au zinc:                                                                 | 145 |
| IV.1.2.5.2. Tests de résistances à d'autres métaux :                                                     | 147 |
| IV.1.2.6. Localisation des transporteurs de la famille CDF :                                             | 153 |
| V.1.3. Discussion:                                                                                       | 155 |
| IV.2. Analyse des transporteurs de la famille ZIP de <i>Laccaria bicolor</i> :                           | 161 |
| IV.2.1. Analyse phylogénétique des transporteurs de la famille ZIP :                                     | 161 |
| IV.2.1.1. Sous-famille I : Localisation putative sur la membrane<br>plasmique :                          | 161 |
| IV.2.1.2. Sous-famille II : Localisation putative sur les<br>membranes internes de la cellule :          | 163 |
| IV.2.1.3. Sous-famille III : Localisation putative sur la membrane<br>vacuolaire :                       | 163 |
| IV.2.2. Etude de quelques gènes ZIPs de <i>Laccaria bicolor</i> :                                        | 165 |
| IV.2.2.1. Etude de l'organisation des gènes d'intérêt :                                                  | 165 |
| IV.2.2.2. Etude de la topologie des gènes:                                                               | 165 |
| IV.2.2.3. clonage des ADNc des gènes d'intérêt :                                                         | 165 |
| IV.2.2.4. Niveau d'expression des ZIP :                                                                  | 167 |
| IV.2.2.4.1. Expressions des gènes en condition de carence en<br>zinc:                                    | 167 |
| IV.2.2.4.2. Analyse des ESTs des ZIPs de <i>Laccaria bicolor</i> :                                       | 167 |
| IV.2.2.5. Caractérisation :                                                                              | 169 |
| IV.2.2.6. Localisation des transporteurs de la famille ZIP :                                             | 171 |
| IV.2.3 Discussions :                                                                                     | 172 |
| Conclusions générales et perspectives.....                                                               | 175 |
| Références bibliographiques.....                                                                         | 183 |
| Annexes.....                                                                                             | 203 |

## Résumé

La pollution par les métaux lourds entraîne des conséquences néfastes pour les sols et pour les communautés qui les colonisent. Afin d'étudier la diversité des mécanismes moléculaires mis en jeu par ces organismes en réponse au stress métallique, deux approches différentes ont été menées.

Premièrement, une approche ciblée de caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans l'homéostasie et la tolérance au zinc a été menée chez *Laccaria bicolor*, un champignon ectomycorhizien modèle à forte valeur économique ajoutée. L'homéostasie et la tolérance au zinc sont essentiellement liées à l'activité des transporteurs des familles ZIP (Zrt-, Irt- related Protein) et CDF (Cation Diffusion Facilitator). Une étude phylogénétique a permis de mettre en évidence une expansion du nombre de gènes appartenant à ces deux familles dans le génome de *L. bicolor*, comparé à celui de *S. cerevisiae*. Le niveau d'expression de ces différents gènes a ensuite été étudié dans différents tissus fongiques ou en présence de différentes concentrations en zinc. L'étude s'est poursuivie par la caractérisation fonctionnelle et la localisation subcellulaire de plusieurs membres CDF et ZIP. L'ensemble de ces analyses ont permis d'affiner fortement les connaissances dans le domaine de l'homéostasie et de la tolérance au zinc chez les champignons ectomycorhiziens.

Enfin, une approche expérimentale innovante de métatranscriptomique a également été utilisée. Cette étude du métatranscriptome a permis la comparaison de fonctions exprimées au sein de communautés de microorganismes eucaryotes colonisant des sols d'intérêt (contaminé, anciennement contaminé et non contaminé par des métaux lourds). Des banques environnementales d'ADNc construites à partir des ARN messagers extraits directement de ces sols ont été criblées par complémentation fonctionnelle de mutants de levures sensibles au zinc. Cette étude a permis l'identification de nouveaux gènes et de nouveaux mécanismes impliqués dans la résistance au zinc. La mise au point de cette approche ouvre de nouvelles perspectives intéressantes au niveau de la recherche fondamentale mais aussi de la recherche appliquée en permettant la détection de gènes d'intérêt, que l'organisme soit cultivable ou non.

**Mots-clés :** diversité moléculaire, métatranscriptome, métaux lourds, homéostasie, *Laccaria bicolor*, tolérance au zinc.

## Abstract

Heavy metal pollution leads to harmful impacts on lands and their associated communities. In order to study the diversity of the molecular determinants involved in metal tolerance by these organisms, two different strategies were employed.

First, the mechanisms involved in zinc homeostasis and tolerance were studied by functional characterization of selected genes in *Laccaria bicolor*, an ectomycorrhizal model fungus with high economic value. Zinc homeostasis and tolerance mechanisms are mainly achieved through the intracellular traffic of zinc mediated by transporters belonging to the ZIP (Zrt-, Irt- related Protein) and CDF (Cation Diffusion Facilitator) families. Phylogenetic analyses revealed an expansion of both CDF and ZIP gene numbers in the genome of *L. bicolor*, when compared to that of *S. cerevisiae*. Gene expression was also studied in different fungal tissues or under different zinc concentrations in the culture medium. Moreover, the functional characterization of several CDF and ZIP members was performed, as well as their subcellular localization. These data allowed us to refine the knowledge on the molecular mechanisms involved in both zinc homeostasis and tolerance in ectomycorrhizal fungi.

Finally, an innovative experimental approach of metatranscriptomics was used. The study of the soil metatranscriptome from eukaryotes allows the comparison of functions expressed in eukaryotic communities colonizing different types of soil (contaminated, formerly contaminated, or non-contaminated by heavy metals). Environmental cDNA libraries constructed from mRNA extracted directly from these soils were screened by functional complementation of yeast mutants sensitive to zinc. This study allowed the identification of new genes and new mechanisms involved in zinc resistance. The development of this approach opens new insights into both fundamental and applied research for the detection of genes of interest, whatever the organism is cultivable or not.

**Keywords:** molecular diversity, metatranscriptome, heavy metal, homeostasis, *Laccaria bicolor*, zinc tolerance.





# *Introduction*

---

De nos jours, les écosystèmes subissent de plus en plus de pressions anthropiques qui bouleversent drastiquement leur fonctionnement. L'urbanisation ainsi que l'industrialisation à outrance sont le fer de lance de ces pressions et, de fait, il est intéressant d'analyser une résultante de ceci, la pollution des sols aux métaux lourds. L'accumulation de ceux-ci va en effet perturber et modifier l'environnement et ses habitats écologiques (Barba-Brioso et al., 2010; Ernest et al., 2008; Serhal et al., 2009; Zheng et al., 2008). A long terme, une pollution va modifier l'écosystème et donc la dominance des espèces en son sein (Blaudez et al., 2000; Colpaert et al., 2005). En terme de population, on observe des disparitions, des diminutions voire même des apparitions de certaines espèces (Amaral Zettler et al., 2002)

Lors de cette thèse, nous nous sommes consacrés à un métal lourd particulier, le zinc. Nous avons étudié les réponses adaptatives de microorganismes eucaryotes de sols soumis ou non à une pollution par ce métal.

Les microorganismes eucaryotes sont essentiels à ces sols. Les champignons, par exemple, sont importants tant du point de vue de leur capacité de décomposition de la matière organique qu'à celui de leur interactions positives (symbioses mycorhiziennes) ou négative (pathogènes) avec les autres organismes terrestres. Les progrès en écologie moléculaire microbienne ont conduit à identifier de nombreuses nouvelles espèces de microorganismes dont les conditions correctes de culture n'ont pas encore été découvertes (Hugenholtz et Pace, 1996). Parmi ces microorganismes, on retrouve des eucaryotes (Amaral Zettler et al., 2002) qui peuvent parfois constituer une fraction très importante de la biomasse microbienne des sols (Högberg et Högberg, 2002).

Pour réaliser notre objectif d'étude de l'adaptation de microorganismes eucaryotes à une pollution métallique donnée, nous avons choisi une approche innovante, la métatranscriptomique. Ainsi nous ne limitons pas notre étude à une ou plusieurs espèces modèles mais nous englobons l'ensemble des microorganismes eucaryotes des sols choisis, que ces organismes soient connus ou inconnus, cultivables ou non. Ce type d'approche, déjà utilisée avec succès pour l'étude de microorganismes procaryotes de l'environnement terrestre (Leininger et al., 2006; Urich et al., 2008) ou marins (Frias-Lopez et al., 2008; Gilbert et al., 2008; Poretsky et al., 2009a et b), semble peu appropriées à l'étude des eucaryotes. Néanmoins notre laboratoire partenaire lors de cette thèse (équipe symbiose mycorhizienne dirigée par Roland Marmeisse, UMR 5557 CNRS-Université Lyon 1) a mis au point un

éventail de techniques pour l'étude d'une communauté de microorganismes eucaryotes telluriques (Bailly et al., 2007). Les objectifs spécifiques du projet de thèse sont décrits ci-dessous.

### 1) Métatranscriptomique :

Le premier objectif de cette thèse fut d'étudier l'adaptation de microorganismes eucaryotes à une pollution métallique des sols, et plus particulièrement une pollution au zinc. Trois sols furent utilisés : un sol pollué, un sol anciennement pollué et un sol non pollué par le zinc.

Pour réaliser cet objectif, une approche innovante, la métatranscriptomique (approche dite « globale »), a été utilisée. Pour chaque sol, et donc chaque communauté de microorganismes eucaryotes qui en est issue, une banque d'ADNc a été construite. Ces banques ont été criblées pour des gènes conférant une résistance au stress métallique par complémentation fonctionnelle de mutants de levure sensibles au zinc. Les résultats de cette étude valident la méthode qui ouvre une nouvelle voie de recherche de nouvelles biomolécules intervenant dans l'adaptation à des conditions environnementales définies.

### 2) Etude phylogénétique et caractérisation fonctionnelle de transporteurs de zinc des familles ZIP et CDF chez *Laccaria bicolor* :

Le deuxième objectif de cette thèse fut une approche « ciblée » qui nous a conduits à étudier l'homéostasie et la tolérance au zinc chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. Ce dernier est un organisme d'intérêt économique important, car utilisé en pépinière pour inoculer les pins Douglas, et est un modèle de choix au sein de l'unité UMR1136 où la thèse a eut lieu. De plus, *Laccaria bicolor* est le premier champignon mycorhizien dont le génome a été séquencé (Martin et al., 2008)

Dans un premier temps, nous avons étudié le potentiel génétique de *Laccaria bicolor*.

En se basant à la fois sur l'annotation des modèles de gènes identifiés après le séquençage du génome de *Laccaria bicolor* et sur l'appartenance de ces gènes de transporteurs aux familles ZIP et CDF (regroupant les principaux transporteurs de zinc chez les cellules eucaryotes), des gènes codant des transporteurs d'intérêt ont été clonés. Leur expression, en fonction de la concentration de zinc dans le milieu et/ou du tissu fongique ciblé, ainsi que leur potentialité à compléter une souche mutante de levure, ont été étudiées en vue de leur caractérisation

fonctionnelle. Cette dernière fut complétée par la localisation de ces transporteurs par fusion GFP dans un organisme hétérologue, la levure.

Avant de présenter les résultats des expériences correspondant à ces deux objectifs, un bilan de nos connaissances concernant les différentes facettes de cette thèse est présenté.

Ainsi, dans un premier temps nous aborderons le thème des métaux lourds, évoquant leur origine, leur toxicité et les moyens mis en œuvre par les organismes pour la contrer. Une deuxième partie traitera de la symbiose mycorhizienne, de ses apports aux deux partenaires et de l'organisme « modèle » *Laccaria bicolor*. Enfin, nous finirons cette synthèse bibliographique par une introduction à cette approche innovante qu'est la métatranscriptomique.

Chapitre I :

# Synthèse bibliographique

---

| IA                          |                              |                              |                              |                             |                               |                              |                              |                               |                              |                               |                               |                                 |                             |                             |                            | 0                          |                             |                            |                              |                          |                             |                          |     |  |      |  |  |  |  |  |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----|--|------|--|--|--|--|--|
| 1 1.0079<br>H<br>HYDROGEN   |                              |                              |                              |                             |                               |                              |                              |                               |                              |                               |                               |                                 |                             |                             |                            | 2 4.0026<br>He<br>HELIUM   |                             |                            |                              |                          |                             |                          |     |  |      |  |  |  |  |  |
| IIA                         |                              |                              |                              |                             |                               |                              |                              |                               |                              |                               |                               |                                 |                             |                             |                            | IIIA                       |                             |                            |                              | IVA                      | VA                          |                          | VIA |  | VIIA |  |  |  |  |  |
| 3 6.941<br>Li<br>LITHIUM    | 4 9.0122<br>Be<br>BERYLLIUM  |                              |                              |                             |                               |                              |                              |                               |                              |                               |                               |                                 |                             |                             |                            |                            | 5 10.811<br>B<br>BORON      | 6 12.011<br>C<br>CARBON    | 7 14.007<br>N<br>NITROGEN    | 8 15.999<br>O<br>OXYGEN  | 9 18.998<br>F<br>FLUORINE   | 10 20.180<br>Ne<br>NEON  |     |  |      |  |  |  |  |  |
| 11 22.990<br>Na<br>SODIUM   | 12 24.305<br>Mg<br>MAGNESIUM |                              |                              |                             |                               |                              |                              |                               |                              |                               |                               |                                 |                             |                             |                            |                            | 13 26.982<br>Al<br>ALUMINUM | 14 28.086<br>Si<br>SILICON | 15 30.974<br>P<br>PHOSPHORUS | 16 32.065<br>S<br>SULFUR | 17 35.453<br>Cl<br>CHLORINE | 18 39.948<br>Ar<br>ARGON |     |  |      |  |  |  |  |  |
|                             |                              | IIIB                         | IVB                          |                             | VB                            | VIB                          |                              | VII B                         | —— VIIIB ——                  |                               | IB                            | II B                            |                             |                             |                            |                            |                             |                            |                              |                          |                             |                          |     |  |      |  |  |  |  |  |
| 19 39.098<br>K<br>POTASSIUM | 20 40.078<br>Ca<br>CALCIUM   | Sc<br>SCANDIUM               | 22 47.867<br>Ti<br>TITANIUM  | 23 50.942<br>V<br>VANADIUM  | 24 51.996<br>Cr<br>CHROME     | 25 54.938<br>Mn<br>MANGANESE | 26 55.845<br>Fe<br>IRON      | 27 58.933<br>Co<br>COBALT     | 28 58.933<br>Ni<br>NICKEL    | 29 63.546<br>Cu<br>COPPER     | 30 65.39<br>Zn<br>ZINC        | 31 69.723<br>Ga<br>GALLIUM      | 32 72.64<br>Ge<br>GERMANIUM | 33 74.922<br>As<br>ARSENIC  | 34 78.96<br>Se<br>SELENIUM | 35 79.904<br>Br<br>BROMINE | 36 83.80<br>Kr<br>KRYPTON   |                            |                              |                          |                             |                          |     |  |      |  |  |  |  |  |
| 37 85.468<br>Rb<br>RUBIDIUM | 38 87.62<br>Sr<br>STRONTIUM  | Y<br>YTIUM                   | 40 91.224<br>Zr<br>ZIRCONIUM | 41 92.906<br>Nb<br>NIOBIUM  | 42 95.94<br>Mo<br>MOLYBDENE   | 43 (92)<br>Tc<br>TECHNETIUM  | 44 101.07<br>Ru<br>RUTHENIUM | 45 102.91<br>Rh<br>RHODIUM    | 46 106.42<br>Pd<br>PALLADIUM | 47 107.87<br>Ag<br>SILVER     | 48 112.41<br>Cd<br>CADMIUM    | 49 114.82<br>In<br>INDIUM       | 50 118.71<br>Sn<br>TIN      | 51 121.76<br>Sb<br>ANTIMONY | 52 127.60<br>Te<br>TELUR   | 53 126.90<br>I<br>IODINE   | 54 131.29<br>Xe<br>XENON    |                            |                              |                          |                             |                          |     |  |      |  |  |  |  |  |
| 55 132.91<br>Cs<br>CESIUM   | 56 137.33<br>Ba<br>BARIUM    | La-Lu<br>LANTHANIDES         | 72 178.49<br>Hf<br>HAFNIUM   | 73 180.95<br>Ta<br>TANTALUM | 74 183.84<br>W<br>TUNGSTEN    | 75 186.21<br>Re<br>RHENIUM   | 76 186.21<br>Os<br>OSMIUM    | 77 192.22<br>Ir<br>IRIDIUM    | 78 195.08<br>Pt<br>PLATINUM  | 79 196.97<br>Au<br>GOLD       | 80 200.59<br>Hg<br>MERCURY    | 81 204.38<br>Tl<br>THALLIUM     | 82 207.2<br>Pb<br>LEAD      | 83 208.98<br>Bi<br>BISMUTH  | 84 (209)<br>Po<br>POLONIUM | 85 (210)<br>At<br>ASTATINE | 86 (222)<br>Rn<br>RADON     |                            |                              |                          |                             |                          |     |  |      |  |  |  |  |  |
| 87 (223)<br>Fr<br>FRANCIUM  | 88 (226)<br>Ra<br>RADIUM     | 89-103<br>Ac-Lr<br>ACTINIDES | 104 (261)<br>Rf<br>RUTHENIUM | 105 (262)<br>Db<br>DUBNIUM  | 106 (263)<br>Sg<br>SEABORGIUM | 107 (264)<br>Bh<br>BOHR      | 108 (277)<br>Hs<br>HASSEIUM  | 109 (269)<br>Mt<br>MEITNERIUM | 110 (281)<br>Uun<br>UNUNBIUM | 111 (272)<br>Uuu<br>UNUNTRIUM | 112 (285)<br>Uub<br>UNUNBIVUM | 114 (289)<br>Uuq<br>UNUNQUADIUM |                             |                             |                            |                            |                             |                            |                              |                          |                             |                          |     |  |      |  |  |  |  |  |

**Figure 1 :** Tableau périodique des éléments de Mendeleïev

Les lignes violettes délimitent les métaux des métalloïdes et non-métaux. Les métaux avec un fond turquoise sont souvent des polluants des écosystèmes et peuvent être toxiques pour l'homme et son environnement.

## I.1. Les éléments traces :

### I.1.1. Généralités :

La classification des périodiques des éléments chimiques selon Mendeleïev regroupe des métaux et des non métaux. Ces deux groupes présentent des propriétés physiques et chimiques différentes.

Les métaux sont d'excellents conducteurs électriques et participent aux réactions sous forme de cations. Parmi les 112 éléments du tableau périodique de Mendeleïev (figure 1), 88 sont considérés comme des métaux. On les retrouve dans 4 groupes dans la table périodique des éléments :

- Les métaux alcalins (la première colonne excepté l'hydrogène) : Les métaux alcalins sont des métaux mous, à bas point de fusion et de faible densité. Leur configuration électronique est caractérisée par la présence d'un électron unique ( $ns^1$ ) facilement perdu pour retrouver la configuration du gaz noble de la période précédente : les métaux alcalins forment donc très facilement des cations. Ils forment principalement des liaisons ioniques.
- Les alcalino-terreux (deuxième colonne) : ils présentent des caractères identiques aux métaux alcalins, bien que de manière plus atténuée. Les éléments de cette série possèdent deux électrons dans leur couche de valence, et leur configuration électronique la plus stable s'obtient par la perte de ces deux électrons pour former un cation divalent.
- Les métaux de transition (éléments des colonnes IIIa à IIb) : Contrairement aux deux groupes ci-dessus, les métaux de transition peuvent former des ions avec une grande variété d'états d'oxydation. Les métaux de transition ont en général une densité ainsi qu'une température de fusion élevée (sauf exception, notamment le mercure qui est liquide au-dessus de  $-38,8^\circ\text{C}$ ). Ces propriétés proviennent de la capacité des électrons de la sous-couche  $d$  à se délocaliser dans le réseau métallique. Dans les substances métalliques, plus le nombre d'électrons partagés entre les noyaux est grand, plus grande est la cohésion du métal.
- Les « métaux pauvres » ou métaux du bloc « p » : il s'agit des éléments suivants : Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, Bi. Hormis l'aluminium, ils sont plutôt mous, avec une température



**Tableau I :** Nombre de publications recensées sur la base de données SCOPUS (<http://www.scopus.com/scopus/home.url>) lors de recherches par année avec les mots clés « Heavy Metal » ou « Trace Element ».

| Année de publication | Nombre de publications |               |
|----------------------|------------------------|---------------|
|                      | Heavy Metal            | Trace Element |
| 2000                 | 286                    | 160           |
| 2001                 | 303                    | 160           |
| 2002                 | 261                    | 143           |
| 2003                 | 299                    | 139           |
| 2004                 | 294                    | 180           |
| 2005                 | 384                    | 163           |
| 2006                 | 392                    | 157           |
| 2007                 | 465                    | 170           |
| 2008                 | 514                    | 203           |
| 2009                 | 546                    | 215           |
| juil-10              | 295                    | 143           |
| Total                | 4039                   | 1833          |

de fusion inférieure à celle des métaux de transition ainsi qu'une électronégativité plus élevée.

### I.1.2. La notion de « métal lourd » :

L'appellation « métal lourd » est souvent décriée. Ainsi, pour Hodson (2004), c'est un terme imprécis utilisé pour désigner des éléments métalliques ayant un effet néfaste sur l'environnement. Ce terme est souvent mal défini, en effet on peut trouver une multitude de définitions souvent contradictoires basées sur la densité, le poids atomique, le numéro atomique ou d'autres propriétés des éléments ou leurs composés (Hodson, 2004).

L'appellation « métal lourd » est fréquemment utilisée dans la désignation de micropolluants minéraux dont la masse atomique élevée ( $> 100$ ) (figure 1) ou de masse volumique supérieure à 5g/ml et pouvant former des précipités insolubles avec les sulfures (Wang et Chen, 2006).

Cette dénomination a été très souvent décriée. En effet, celle-ci peut apparaître mal appropriée car elle fait souvent référence indistinctement à des métaux n'ayant pas nécessairement ces propriétés qu'à des éléments non métalliques (As, Se, ...). De plus, certains éléments concernés par ce terme sont des oligo-éléments (Cu, Zn, Ni, Co, ...) essentiels à la vie en faible teneur mais devenant toxiques à plus forte concentration. Les oligo-éléments rendent le terme polluant non convenable. Certains métaux, comme le mercure, n'ont, même à faible teneur, aucune fonction biologique connue à ce jour (Sinicropi et al., 2010).

Certains auteurs ont proposé le terme « élément trace », afin de regrouper les vrais métaux lourds et les éléments qui s'en rapprochent physiquement et chimiquement. Néanmoins, selon les disciplines scientifiques concernées, ce terme a une signification différente. Ainsi, en biologie, un élément est dit « trace » lorsque sa concentration est inférieure à 0.1‰ dans les êtres vivants. L'azote et le carbone sont donc des éléments majeurs chez les animaux et les plantes, et, l'aluminium, le manganèse et le fer y sont des éléments traces. Mais, en pédologie, un élément est dit « trace » lorsque sa concentration est inférieure à 1‰ en moyenne dans la croûte terrestre, inversant les qualificatifs majeurs et mineurs pour les éléments cités ci-dessus.

Comme illustré dans le tableau I, le terme de « métal lourd » est fortement établi dans la littérature en biologie et regroupe à la fois les vrais métaux lourds, les métaux de faible masse

**Tableau II :** Classification des oligo-éléments et des contaminants stricts chez l'homme et chez les plantes supérieures (modifié d'après Bargagli, 1998).

**Pour l'homme**

|                                           |                    |
|-------------------------------------------|--------------------|
| Oligo-éléments à risque élevé de carence  | Cu, Zn, Se, Cr, Mo |
| Oligo-éléments à faible risque de carence | Ni, Co, As         |
| Contaminants stricts                      | Pb, Cd, Hg, Tl     |

**Pour les plantes supérieures (Bargagli, 1998)**

|                      |                                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| Eléments essentiels  | B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn                       |
| Eléments bénéfiques  | Cl, Cr, F, I, Li, Na, Ni, Rb, Se, Si, Sr, Ti, V |
| Contaminants stricts | Br, Cd, Pb, Hg                                  |

atomique (Cr, Co, Ni, Cu) ainsi que certains métalloïdes (Se, As). Nous l'utiliserons donc dans la suite de ce mémoire.

### I.1.3. Notion d'élément essentiel :

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

- un autre élément ne peut remplacer sa fonction
- en son absence, un organisme donné ne peut réaliser son cycle de vie
- il est impliqué directement dans le métabolisme de l'organisme, en tant que cofacteur d'enzymes par exemple, ou bien nécessaire dans une réaction enzymatique.

Ainsi, des éléments minéraux qui contrebalanceraient les effets toxiques d'autres éléments ou qui tout simplement remplaceraient des éléments essentiels dans certaines de leurs fonctions sont considérés comme des éléments « bénéfiques », et non « essentiels » (Sinicropi et al., 2010). Un élément, essentiel ou non, peut devenir toxique dès que sa concentration dépasse, dans l'organisme, une valeur seuil (Rusyniak et al., 2010). Cette valeur varie notamment en fonction de l'organisme, du tissu et de la nature de l'élément. Selon l'importance de l'élément dans les besoins de la croissance de l'organisme considéré, on distingue le terme de macro-éléments et de celui de micro-éléments. Chez les animaux, les éléments essentiels sont : As, Cl, Cu, Co, Cr, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se, Sn, V et Zn. En ce qui concerne les hommes et les plantes supérieures, ces éléments sont regroupés dans le tableau II. L'importance d'un élément considéré varie donc suivant l'espèce étudiée. Les progrès croissant de la chimie analytique, et en particulier dans la purification des composés chimiques, ont permis de dresser une première liste d'éléments essentiels qui évoluent depuis le milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, et qui devra inclure d'ici quelques années des éléments qui ne sont essentiels qu'à de très faibles concentrations.

### I.1.4. Origines dans le sol et pollution environnementale :

Les métaux lourds dans les sols proviennent en partie de l'allocation de la roche mère mais aussi de sources externes au sol : dépôts atmosphériques, épandages d'engrais et autres activités humaines (agricoles, domestiques et industrielles).

**Tableau III :** Teneur totales (en mg kg MS<sup>-1</sup> ou g kg MS<sup>-1</sup> pour le fer) en métaux lourds dans des sols français. Population générale est de 815 échantillons ; horizons notoirement contaminés exclus. a : ce seuil, proposé par Godin en 1984 pour le cobalt, n'a pas été retenu dans la norme française. (modifié d'après Baize, 2000)

|                                                                           | Cd    | Co  | Cr  | Cu  | Ni  | Pb   | Zn   | Mn    | Fe   |
|---------------------------------------------------------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|------|------|-------|------|
| Nombre de valeurs                                                         | 768   | 695 | 791 | 787 | 797 | 790  | 804  | 735   | 767  |
| minimum                                                                   | <0,02 | <1  | <2  | <2  | <2  | 2,2  | <5   | <10   | 0,05 |
| médiane                                                                   | 0,16  | 14  | 66  | 13  | 31  | 34,1 | 80   | 754   | 3,24 |
| moyenne                                                                   | 0,42  | 17  | 75  | 15  | 41  | 64,8 | 149  | 1585  | 3,65 |
| maximum                                                                   | 6,99  | 148 | 691 | 107 | 478 | 3088 | 3820 | 24975 | 19,2 |
| seuils de l'arrêté du 8 janvier 1998 sur l'épandage des boues d'épuration | 2     | 30a | 150 | 100 | 50  | 100  | 300  |       |      |
| nombre de valeurs supérieures au seuil                                    | 26    | 82  | 39  | 1   | 186 | 76   | 71   |       |      |

Les métaux lourds issus de l'altération des minéraux primaires sont redistribués sur et dans les minéraux secondaires, sur la matière organique des sols et dans la solution du sol. Ces éléments traces métalliques peuvent aussi être prélevés par les plantes ou percoler vers les nappes phréatiques (Baize, 2002). Les sols ne sont pas des milieux homogènes. Ils se différencient en plusieurs horizons ayant des caractéristiques physiques et chimiques et biologiques propres. Ces caractéristiques ont des conséquences sur la rétention de métaux dans les horizons du sol, leur mobilité et leur biodisponibilité. Les sols constituent donc un compartiment clé du cycle biogéochimique des métaux dans les écosystèmes. Les sols sont des lieux d'échanges, via la solution du sol, avec les eaux de surface et de profondeur ou avec la biosphère.

Afin d'estimer les effets des métaux lourds d'origine anthropique sur le fonctionnement biologique ou chimique du sol, il est nécessaire de distinguer les apports anthropiques des éléments issus du fonds géochimique naturel. Une approche quantitative basée sur des estimations de stocks et de fluxes des métaux lourds dans les sols, peut être utilisée pour l'évaluation des parts géogènes et anthropogènes.

#### I.1.4.1. Origines naturelles des métaux lourds :

La connaissance du fond pédo-géochimique naturel (FPGN), c'est-à-dire de la teneur originelle, est un préalable indispensable pour l'évaluation de la contamination d'un sol par un élément métallique. Ce fond dépend principalement de la nature du matériau parental et de la pédogénèse. Il varie donc d'un type de sol à l'autre et, à l'intérieur d'un même type de sol, d'un horizon à l'autre (Baize, 1997). En conséquence, les teneurs naturelles en ETM peuvent varier fortement d'une région à l'autre, ainsi observe-t-on une forte variabilité en considérant les teneurs mesurées sur plus de 800 échantillons de sols français considérés comme non contaminés (tableau III). La constitution du FPGN est dépendante aussi du cycle biogéochimique des sols et de son lien avec les plantes. Les éléments absorbés par les racines des plantes sont transloqués vers les organes aériens de celles-ci. En fin de cycle, les éléments retournent dans le sol par décomposition. Ce cycle peut être brisé par l'exportation des récoltes. Un autre phénomène intervenant dans la constitution du FPGN concerne les transferts pédologiques verticaux et latéraux. En France, les précipitations annuelles sont en général supérieures à l'évapotranspiration végétale. De nombreux sols sont alors lessivés, les

**Tableau IV :** Classification des pollutions anthropiques (modifié d'après Bourrelier & Berthelin, 1998)

| <i>Origine</i>      | <i>Type</i>                      | <i>Pollution localisée</i>           | <i>Pollution de proximité</i>                | <i>Pollution à grande distance</i> |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Industries</b>   | sites anciens                    | déchets                              | voie atmosphérique et aquatique              |                                    |
|                     | sites actuels                    | exceptionnel : déchets               | voie atmosphérique, exceptionnel : aquatique |                                    |
| <b>Consommation</b> | transport, vie urbaine, tourisme | déchets                              | voie atmosphérique et aquatique              | voie atmosphérique (transport)     |
|                     |                                  | déchets et voie aquatique            |                                              |                                    |
| <b>Mines</b>        |                                  | déchets et voie aquatique            |                                              |                                    |
| <b>Agriculture</b>  |                                  | épandage, intrants et voie aquatique |                                              |                                    |

métaux lourds y migrent vers les horizons profonds. C'est ainsi que les formes solubles des métaux lourds peuvent atteindre les nappes phréatiques.

On compte aussi des apports diffus aériens d'origines lointaines : poussières libérées par l'activité volcanique, embruns maritimes, vent lointain...

#### I.1.4.2. Origines anthropiques des métaux lourds :

Les métaux sont énormément utilisés dans l'économie mondiale. Ainsi, l'extraction et l'utilisation de matières premières, comme les combustibles fossiles par exemple, sont des sources de contamination communes.

De nos jours, plusieurs activités humaines ont conduit à une augmentation de la pollution par les métaux lourds. Ainsi les domaines les plus polluants sont :

- **L'agriculture** et de l'utilisation massive des engrais (avec leur impuretés), des pesticides, de l'épandage de boues d'épuration, des lisiers (Franklin et al., 2005), ...
- **L'industrie** et ses rejets de poussières contenues dans les fumées émises, ou ses rejets d'effluents gazeux ou liquides, ...
- **L'urbanisation** et ses décharges de déchets urbains, l'augmentation de la circulation automobile (Sezgin et al., 2004) et de la combustion de sources d'énergie fossile, ...

Les principales sources de pollution anthropique sont récapitulées dans le tableau IV.

Nous nous contenterons de détailler les principaux polluants métalliques que nous avons étudié par la suite, à savoir le zinc et le cadmium.

##### I.1.4.2.1. Le zinc :

Le zinc est un métal de couleur bleu-gris. Son état d'oxydation le plus commun est +II. Ses apports anthropiques peuvent se diviser en trois groupes d'activités majeures (Baize, 1997) :

- l'agriculture et ses épandages où le zinc est retrouvé en abondance dans les lisiers car il est fait partie de l'alimentation porcine.
- L'urbanisation et le trafic routier relâchent du zinc dans l'environnement (incinération des déchets domestiques, usure des pneus de véhicules motorisés, toitures, ...)



- Les sources industrielles et/ou minières, principales sources de pollution, notamment due au traitement du minerai, un raffinage, galvanisation du fer, fabrication de piles électriques, ...

Le minerai le plus utilisé est le sulphure de zinc, appelé aussi blende ou sphalérite (ZnS).

La consommation mondiale de zinc en 2009 a été de l'ordre de 10 millions de tonnes. (International Lead and Zinc Study Group: <http://www.ilzsg.org/static/statistics.aspx?from=1>). Le zinc a tendance à s'accumuler dans les horizons de surface (Baize, 1997). La teneur en zinc total est fortement influencée par la teneur en argile du sol.

#### I.1.4.2.2. Le cadmium :

Anciennement appelé Carbonate de Zinc, le cadmium est un métal blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celle du zinc. Il fond à 320,9 °C et bout à 767 °C. Lors de l'ébullition du cadmium, il se dégage des vapeurs jaunes toxiques (Sinicropi et al., 2010). Sa masse spécifique est de 8 650 kg/m<sup>3</sup>. Il est ductile (capacité à l'étirement), malléable (capacité à la mise en forme) et résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un revêtement de protection pour les métaux ferreux. Environ 10 à 15% de la production mondiale du cadmium se fait à partir de matériaux recyclés. Le cadmium n'existe pas à l'état natif. Cependant, il est présent dans presque tous les minerais de zinc, de plomb et de cuivre ainsi que dans les phosphates naturels. Sa mobilité dans les sols dépend fortement du pH. Les trois mêmes groupes d'activités sont également responsables des apports anthropiques pour le cadmium :

- les sources industrielles où l'on retrouve notamment le cadmium en tant que sous-produit du raffinage du zinc.
- les épandages agricoles : le cadmium peut être assez abondant dans certains engrais phosphatés (Loganathan et al., 2008) ou déposés lors de l'épandage de déchets d'élevage ou lors du chaulage.
- L'urbanisation et le trafic routier: incinération de déchets domestiques, piles électriques, usure des pneus de véhicules motorisés, ...

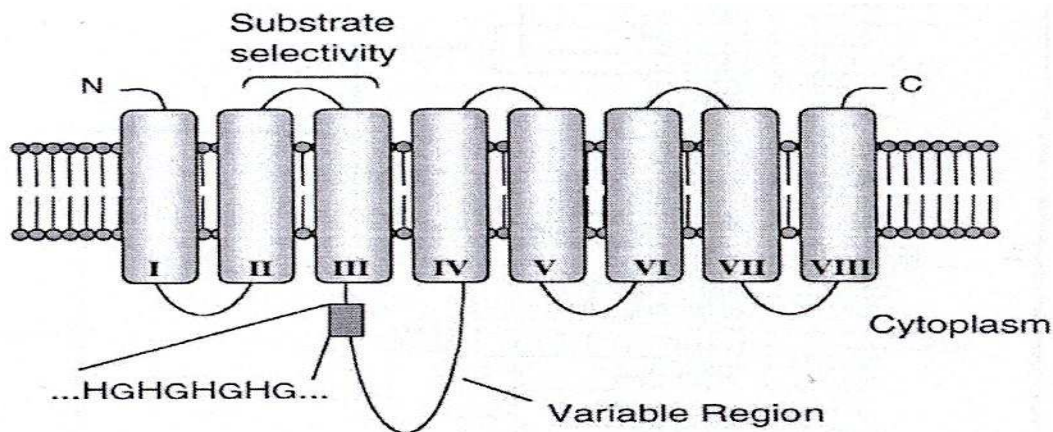
### I.1.5. Absorption des métaux par les organismes terrestres :

#### I.1.5.1. Définition de la biodisponibilité des métaux :

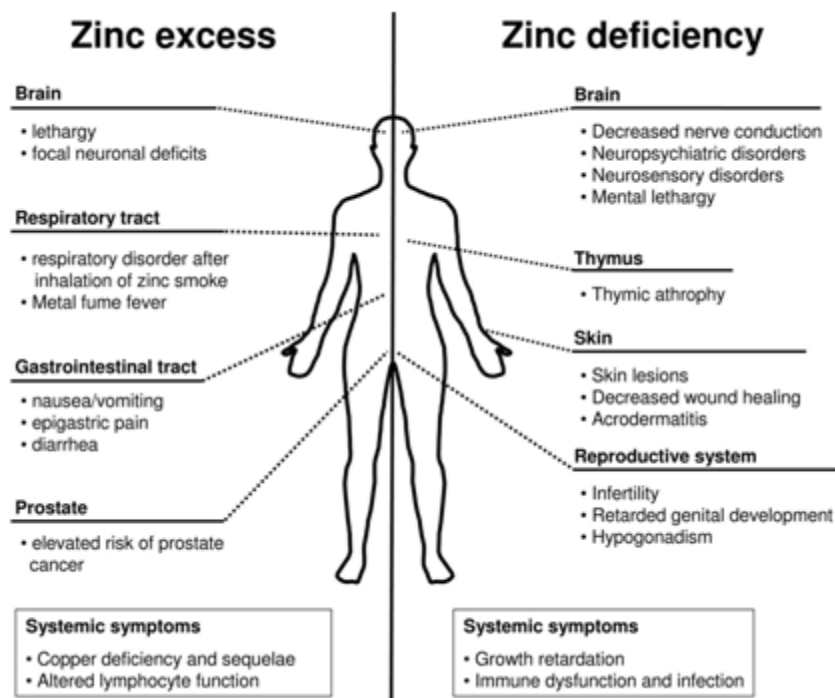
Les risques associés aux sols pollués, à la toxicité et la contamination de la chaîne alimentaire, sont étroitement liés à la biodisponibilité des métaux lourds. Celle-ci peut être définie comme l'aptitude d'un élément à être transféré du sol vers un organisme vivant. Dans un sol, la quantité biodisponible d'un métal donné n'est pas la quantité totale de l'élément mais une sous-fraction composée d'un ensemble d'ions ayant la capacité de s'échanger avec ceux en solution (Kalis, 2007 ; Morel, 1997).

#### I.1.5.2. Mécanismes d'absorption des métaux :

La connaissance des mécanismes d'absorption des métaux (essentiels ou non) a énormément progressé ces dernières années, notamment grâce à la complémentation fonctionnelle de souche de levures déficientes. Ainsi de nombreux transporteurs de métaux ont peut-être clonés et caractérisés notamment chez la levure (Eide, 2006; Gaither et Eide, 2001a et b; MacDiarmid et al., 2000) ou chez les plantes comme par exemple *Arabidopsis thaliana* (Eng et al., 1998), *Medicago truncatula* (Lopez-Millan et al, 2004) ou *Oryza sativa* (Wu et al., 2010). C'est essentiellement la famille ZIP (Zrt,IRT related Protein) qui participe à l'absorption du zinc chez les cellules eucaryotes (Eide, 2006). Le nom de cette famille de transporteurs provient des premières caractérisations fonctionnelles réalisées : Irt1 pour le transport du fer chez *Arabidopsis thaliana* et Zrt1 pour le transport du zinc chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, le premier transporteur identifié est IRT1 d'*A. thaliana* (Eide et al., 1996). En condition de carence en fer des racines, sa transcription est induite. D'autres études ont démontré sa capacité à transporter de nombreux cations parmi lesquels  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et probablement  $Cd^{2+}$  (Korshunova et al., 1999). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les homologies de séquences ont permis l'identification de ZRT1 et ZRT2. Ces deux protéines sont des transporteurs de zinc à forte et faible affinités, respectivement (Zhao et Eide, 1996a, b). Ces deux transporteurs étant isolés chez la levure, des souches doubles mutantes pour ces deux gènes ont été générées, ce qui a permis le clonage par complémentation fonctionnelle de transporteurs de zinc de plantes. Lors d'une carence en zinc, le gène zrt1 est fortement activé (jusqu'à 1000 fois) par le facteur de transcription ZAP1, ce qui permet l'amplification de l'absorption de zinc par les cellules (Eide, 2006). Un transporteur ZRT3 a aussi été identifié. Ce dernier a une localisation vacuolaire, ce qui



**Figure 2 :** Structure schématique d'un transporteur ZIP. I à VIII : domaine transmembranaire, ...HGHHGHG... : domaine riche en histidine (H). C et N : extrémités de la protéine. Substrate selectivity : zone de sélectivité des ions. La région variable est différente entre les diverses protéines mais possède toujours la région riche en histidine. Le passage de  $Zn^{2+}$  se fait vers le cytoplasme. La région riche en histidine permettrait le transport du Zn. D'après Gaither *et Eide*, 2001.



**Figure 3 :** Comparaison des effets d'un excès et d'une carence en zinc chez l'humain. L'intoxication est due à une exposition excessive ou l'apport de zinc (partie de gauche), alors que la carence de zinc est due à la malnutrition ou la maladie (à droite). Les deux états ont des effets néfastes sur les différents systèmes d'organes. Les effets ne pouvant être attribués à un système particulier ou affectant plusieurs organes sont décrits comme des symptômes systémiques.

permet, grâce à sa surexpression lors d'une carence en zinc, de remobiliser ce métal stocké dans la vacuole vers le cytoplasme (MacDiarmid et al., 2000). On retrouve deux autres protéines ZIP sur les membranes internes de la cellule : ATX2 au niveau de l'appareil de Golgi (Lin et Culotta, 1996) et YKE4 au niveau du reticulum endoplasmique (Kumanovics et al., 2006). Ces deux transporteurs permettent eux aussi la remobilisation du zinc depuis ces organites. La plupart des protéines ZIP prédite présente huit domaines transmembranaires et les extrémités de la protéine sont extracytoplasmiques, une région riche en histidine est localisée sur une boucle cytoplasmique et serait impliqué dans la régulation du transporteur (figure 2) (Eide, 2006 ; Gaither *et al.*, 2001 ; Guerinot, 2000)

À ce jour, le fonctionnement des protéines ZIP n'a été entièrement élucidé que chez la levure (Gaither et Eide, 2001). Toutefois plusieurs autres protéines de cette famille ont été étudiées chez de champignons.

Ainsi Tzn1 et Tzn2 de *Neurospora crassa* (Kiranmayi et al., 2009) semblent être les orthologues de Zrt1 et Zrt2 de *S. cerevisiae*, respectivement. Tzn1 semble être strictement spécifique au zinc, alors que Tzn2 semble transporter aussi bien le zinc que le cadmium. **L'étude des** expressions de *Tzn1* et de *Tzn2* dans des conditions de carence ou d'excès en zinc révèle que l'expression de *Tzn1* est activée dans des conditions de carence en zinc alors qu'elle est réprimée dans des conditions d'excès en zinc. L'expression de *tzn2* est quantitativement beaucoup plus faible de *Tzn1* mais est régulée de la même manière.

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, Zhf1 semble être l'orthologue de lu transporteur de zinc de haute affinité Zrt1 de *S. cerevisiae* (Dainty et al., 2008). Son expression est similaire à celle de *Tzn1*, le transporteur de zinc de *Neurospora crassa*.

Les protéines ZrfA et ZrfB d'*Aspergillus fumigatus* sont structurellement similaire à des protéines et Zrt1p Zrt2p, respectivement, de *S. cerevisiae* (Vicente-franqueira et al., 2005). *ZrfA* et *ZrfB* sont régulés de manière différente, ainsi, La transcription de *ZrfB* est totalement réprimée à une concentration de zinc dans le milieu 50 fois supérieure à celle requise pour *ZrfA*. En vertu du large éventail de concentrations de zinc qu'il semble gérer, ZrfB pourrait être le système principal d'acquisition de zinc chez *A. fumigatus*.

### I.1.6. Toxicité du zinc :

#### I.1.6.1. Toxicité du zinc au niveau des organismes :

##### I.1.6.1.1. La toxicité chez les animaux et les humains :

Les connaissances sur les risques potentiels pour l'homme lié à la pollution des sols par les métaux lourds sont encore fragmentaires, mais sont mises à l'honneur ces dernières années (Bhavana et al., 2009; Chen et al., 2010; Liu et al., 2010; Singh et al., 2010)

Selon le métal considéré, la toxicité peut porter sur différents organes, sur la reproduction ou être cancérogène. Bien sûr, ces effets toxiques dépendent des voies et niveaux d'exposition, ainsi que de l'espèce considérée.

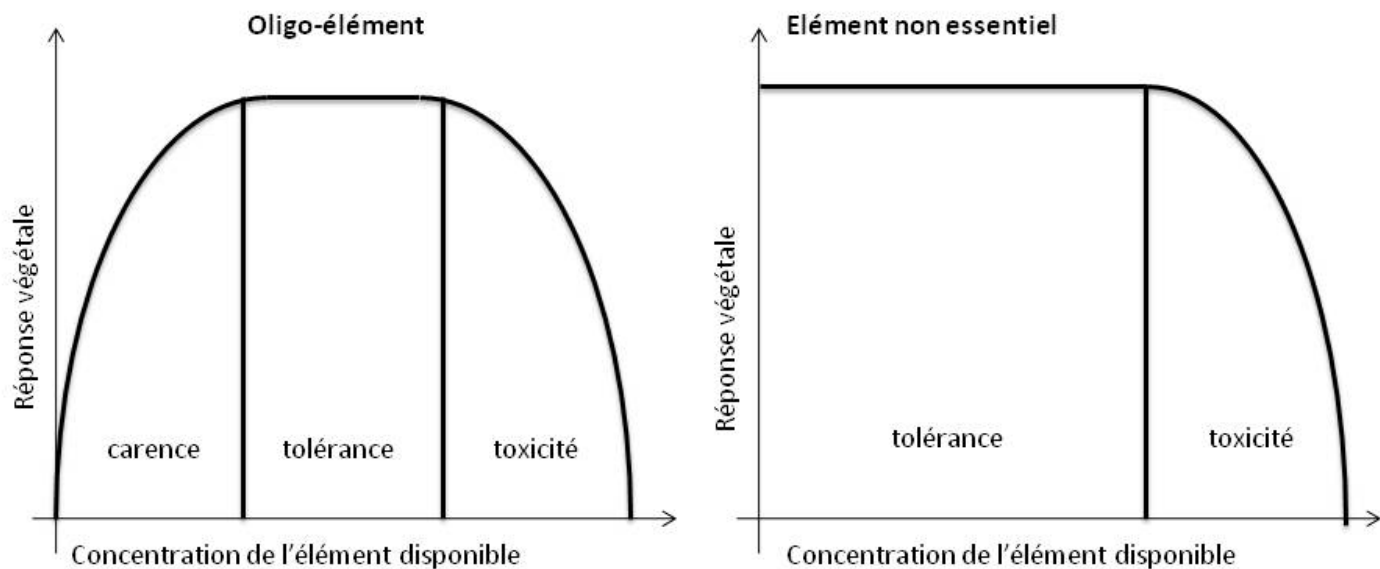
Les principaux effets d'une intoxication au zinc chez l'homme sont présentés sur la figure 3.

Concernant le zinc, trois voies d'entrée dans le corps humain sont à considérer (Plum et al., 2010) :

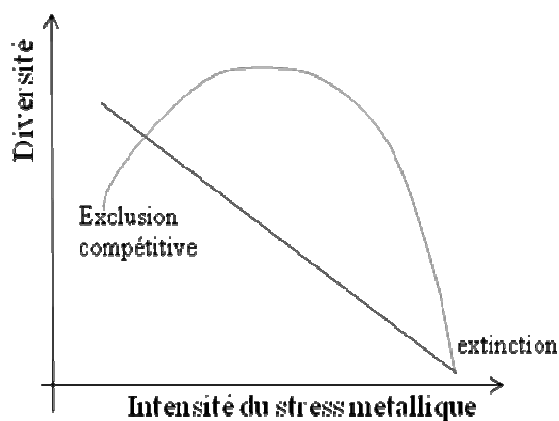
- l'inhalation. L'inhalation de poussières contenant du zinc est généralement due aux industries et touche principalement les ouvriers. La conséquence la plus fréquente de cette inhalation est une maladie aiguë présentant divers symptômes: fièvre, douleurs musculaires, nausées, fatigue, et des troubles respiratoires. En général, les effets respiratoires disparaissent en un à quatre jours.
- le contact cutané. L'effet observé est une irritation qui dépend du type de zinc incriminé. Ainsi, le chlorure de zinc est clairement l'espèce de zinc la plus irritante, puis vient l'acétate de zinc et le sulfate de zinc. L'oxyde de zinc n'a, à priori pas d'effet irritant sur la peau.

Contrairement à l'effet potentiellement nocif du zinc sur la peau décrit ci-dessus, il convient de noter que le zinc est un complément bien connu pour le traitement topique de plaies et de plusieurs affections dermatologiques.

- l'ingestion. En raison de sa nature comme un oligo-élément essentiel, l'absorption orale de petites quantités de zinc est essentielle pour la survie. L'apport nutritionnel recommandé (ANR) pour le zinc est de 11 mg par jour pour les hommes et 8 mg par jour pour les femmes. Ces valeurs sont nettement inférieures à la valeur DL50 (Dose Létale 50 : cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (souris ou des rats)) qui a été estimée à 27g de zinc par jour. En général, l'absorption d'une telle quantité est peu probable, car environ cela correspond à une absorption de 225 à 400 mg de zinc. Les symptômes immédiats



**Figure 4 :** courbes de réponse « dose - effet biologique » illustrant les effets du changement des concentrations disponibles des éléments dans le sol sur la vitalité de la plante.



**Figure 5 :** Modèles hypothétiques des effets d'un stress métallique sur la diversité d'une communauté microbienne (modifié d'après Giller et al., 1998). La droite montre une diminution de la diversité en fonction du stress. La courbe montre un écosystème où le stress favorise une minorité d'espèces bien adaptées à des conditions modérées.

après l'absorption de quantités toxiques de zinc sont des douleurs abdominales, des nausées et des vomissements. On peut aussi observer de l'anémie et des vertiges.

#### I.1.6.1.2. Phytotoxicité :

Les courbes dose/réponse des plantes aux métaux lourds sont de deux types (figure 4). Pour les éléments essentiels, la forme classique en « cloche » présente trois domaines de concentration dans les tissus : carence, tolérance et toxicité. Pour les métaux n'ayant aucune fonction physiologique, seule la tolérance et la toxicité sont observées. Leur présence est donc tolérée tant que le seuil de toxicité n'est pas atteint.

Lorsque la concentration d'un métal lourd considéré atteint le seuil de toxicité dans les tissus, les fonctions physiologiques de la plante sont perturbées. La croissance peut être ralentie. La nécrose et la chlorose sont les principaux symptômes d'une toxicité due au métal. Elles sont dues le plus souvent à une carence en fer causée par l'excès d'un autre métal.

#### I.1.6.1.3. Toxicité pour les micro-organismes du sol :

Pour appréhender l'effet toxique du zinc sur les microorganismes du sol, trois paramètres sont à prendre en compte :

- le risque direct pour les organismes du sol
- la diminution de la biodiversité des organismes du sol
- le risque de transfert dans la chaîne alimentaire naturelle (oiseaux, rongeurs, ...)

Les champignons des principaux groupes taxonomiques sont retrouvés sur des sites pollués, capables d'y croître normalement (Muller et al., 2007; Zarei et al., 2010). En règle générale, les pollutions métalliques réduisent la diversité et l'abondance des espèces fongiques, notamment en exerçant une pression de sélection favorisant les populations tolérantes. (Colpaert et al., 2004; Del Val et al., 1999)

On peut modéliser la relation entre la diversité des micro-organismes et un stress métallique par deux modèles (figure 5) :

- les effets d'un stress de plus en plus intense conduit à une diminution de la diversité microbienne (courbe noire sur la figure).

- Un stress modéré permet une domination des espèces bien adaptées, et donc une faible diversité. L'augmentation de l'intensité du stress peut défavoriser ces espèces et permettre à d'autres de proliférer. Au-delà d'un seuil, l'intensité du stress est trop importante, cela conduit à l'extinction des organismes et une diminution de la diversité.

#### I.1.6.2. Toxicité des métaux lourds au niveau cellulaire :

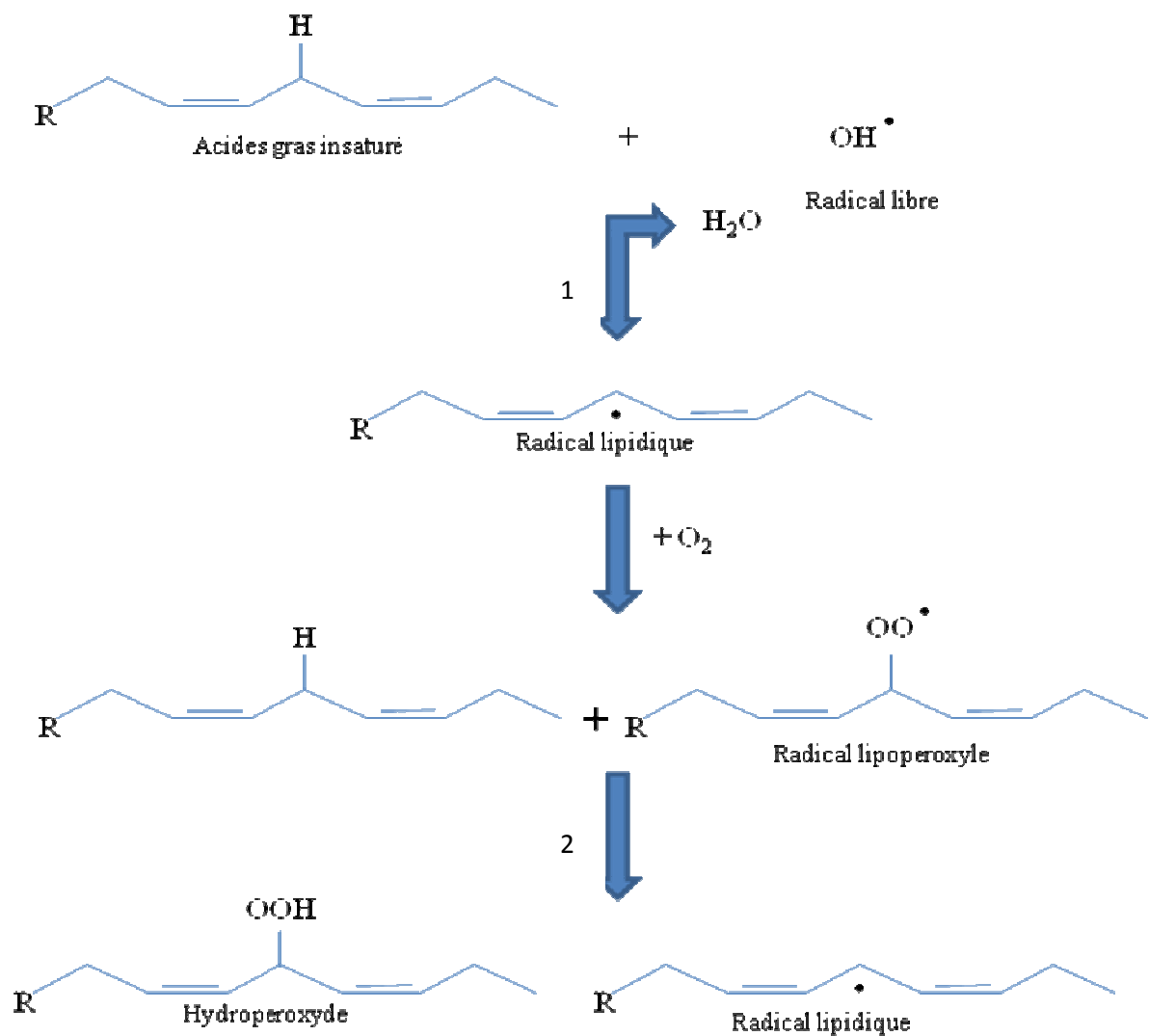
Les métaux toxiques peuvent avoir des effets néfastes à bien des égards mais principalement en raison de leur forte capacité de coordination. Les effets toxiques comprennent le blocage de groupes fonctionnels de molécules à fonctions biologiquement importantes (par exemple: les enzymes et les systèmes de transports de nutriments essentiels et d'ions), le déplacement et/ou la substitution des ions métalliques essentiels dans des biomolécules, les modifications conformationnelles, les perturbations de membranes cellulaires (Appenroth, 2010).

##### I.1.6.2.1. Altération des membranes cellulaires :

Une condition préalable à la toxicité métallique est le contact direct avec les composantes cellulaires (Gadd, 1993). Ainsi, un des effets les plus importants des métaux toxiques au niveau cellulaire est l'altération de la perméabilité membranaire (Belagyi *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2009; Valko *et al.*, 2005), causant souvent un efflux d'ions. Ceci entraînant souvent une dépolarisation de la membrane plasmique (Gurer et Ercal, 2000 ; Llamas *et al.*, 2000). Un des mécanismes indirects de la toxicité des métaux implique la production de radicaux libres. Ce sont des espèces possédant un ou plusieurs électrons non-appariés, ils peuvent être petits et diffusibles (radicaux « libres ») ou gros et immobiles dans les constituants cellulaires comme par exemple dans les membranes.

Les chaînes d'acides gras de la membrane cellulaire constituent une cible majeure pour les radicaux libres (Blokina *et al.*, 2003). L'attaque radicalaire déclenche une réaction en chaîne appelée lipoperoxydation membranaire (figure 6). Lors de la phase d'initiation (1), un acide gras insaturé est attaqué par un radical libre. Il en résulte un radical lipidique qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde. Ce dernier réagit avec un acide gras

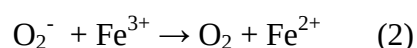
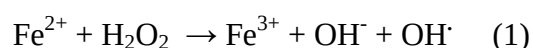




**Figure 6 :** Peroxydation des lipides membranaires. L'attaque du radical libre OH<sup>•</sup> entraîne une réaction en chaîne, la lipoperoxydation. Après la phase d'initiation (1) ou un acide gras insaturé est transformé en radical lipidique, on a formation un radical peroxyde. Ensuite intervient la phase de propagation (2), avec production d'un hydroperoxyde et d'un nouveau radical peroxyde. (d'après Blokina et al., 2003)

adjacent, lors de la phase de propagation, pour former un hydroperoxyde et un nouveau radical peroxyde (Blokina et al., 2003). Au niveau des membranes biologiques, la peroxydation des lipides est une réaction très destructrice car elle provoque des brèches dans la phase lipidique et augmente ainsi la perméabilité membranaire, ceci résultant en une désorganisation cellulaire.

Dans des conditions de stress oxydatif, induites par les métaux, des complexes liposolubles d'éléments de transition tel le Fe (II) peuvent faire l'objet de la réaction de Fenton (1 et 2 ci-dessous) avec les hydroperoxydes et accélérer ce processus.



Les ions, complexés et libres, de ces cations peuvent également subir cette réaction en solution aqueuse (Gadd, 1993). Les ions métalliques ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , ...) peuvent induire cet effet (radicaux libres) en raison de leurs interactions avec des groupements thiols ou des enzymes qui sont normalement protégés contre ces espèces réactives (Valko et al., 2005). Les effets indirects des dommages aux membranes proviennent très souvent de l'interaction des métaux avec les réactions redox. De fait, la toxicité de ces métaux peut être attribuée à une production accrue de radicaux libres dans les cellules induisant alors un stress oxydatif (Leonard et al., 2004a et b; Liu et al., 2009).

La destruction des membranes biologiques par peroxydation des lipides n'est pas spécifique de la toxicité des métaux mais c'est un processus plus général pouvant être la conséquence d'autres facteurs de stress. Cependant, cette destruction est considérée comme le premier effet toxique des métaux au niveau cellulaire.

#### I.1.6.2.2. Inhibition d'enzymes :

Les deux principaux mécanismes d'inhibition des enzymes par les métaux toxiques sont :

- l'induction d'une carence en métaux nécessaires aux métallo enzymes et la substitution d'un métal nécessaire par le métal toxique au niveau du complexe enzymatique.
- l'interaction des métaux toxiques avec les groupes fonctionnels des enzymes, par exemple avec les groupements thiols des enzymes.

L'interaction entre les métaux et les enzymes, *in vivo*, est dépendant de plusieurs conditions (Flora et al., 2008; Hasan et al., 2009) :

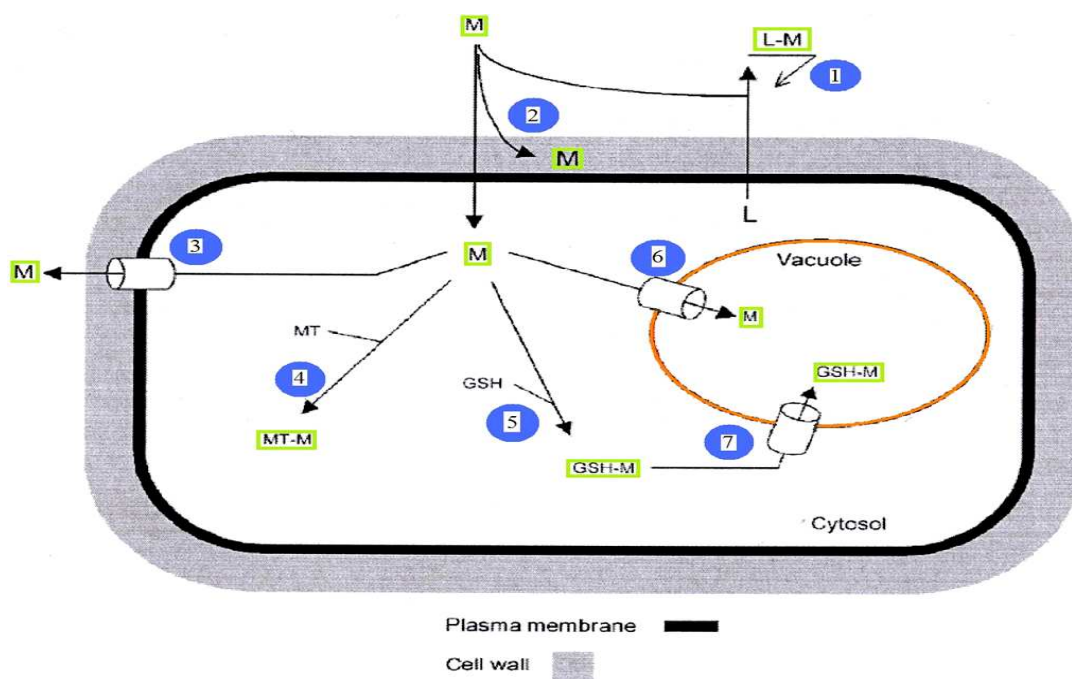
- l'affinité du métal toxique pour les groupements thiols doit être forte, notamment en cas de mécanisme d'inhibition.
- le métal doit pouvoir s'accumuler sous forme active (capable d'interagir avec les enzymes) et à une concentration suffisamment inhibitrice dans le même compartiment cellulaire que l'enzyme.
- la concentration en métal doit être comparable à celle du métal actif lorsque l'inhibition de l'enzyme est due à une compétition où une substitution pour le même site de fixation.

Les interactions des métaux avec les enzymes peuvent concerner la presque totalité des enzymes. Comme exemples nous pouvons citer : l'inhibition de l'ascorbate oxydase apoplastique par l'aluminium dans les racines d'orge (Tamás *et al.*, 2006). l'inhibition de l'adénosine deaminase par le mercure chez *Danio rerio* (Senger et al., 2010), celle de la créatine kinase et de la pyruvate kinase par le plomb chez le rat (Lepper et al., 2010) ou encore celle de la manganèse peroxydase par différents métaux lourds (Cd, Cu, Zn et Pb) chez *Lentinula edodes* (Hatvani et Mecs, 2003)

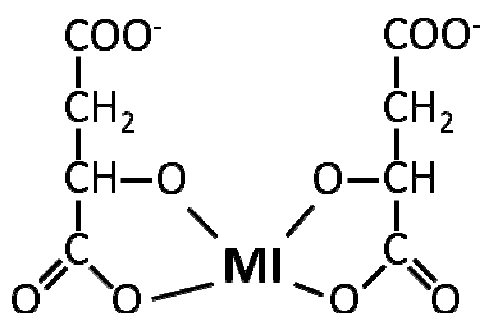
#### I.1.6.2.3 Interaction avec les acides nucléiques :

Les métaux peuvent interagir directement ou indirectement avec les acides nucléiques. Les sites de fixation privilégiés par les métaux lourds sont les centres nucléotides des acides nucléiques. On peut aussi observer une réduction des appariements entre les deux brins de l'ADN, ou des cassures des ADN simple brin, ainsi que la formation de complexes avec l'ADN (Chiaverini et De Ley, 2010). On peut observer les réactions similaires entre les métaux et les ARN.

Les métaux peuvent induire une dépurination de l'ADN ayant pour conséquence des effets mutagènes (Bregadze, 2008). Les radicaux libres générés par les métaux peuvent induire des cassures dans les brins d'ADN ainsi que leur dégradation (Blokina, 2003).



**Figure 7 :** Mécanismes de tolérance aux métaux lourds chez un champignon. M : Métal; L : Ligand; MT : Méthallothionéine; GSH : Glutathion; 1 : Chélation externe par un ligand sécrété; 2 : Chélation par la paroi; 3 : Efflux; 4 : Chélation par méthallothionéines; 5 : Chélation par glutathion; 6 : Compartimentation vacuolaire; 7 : Compartimentation vacuolaire du complexe glutathion/métal. Plusieurs phénomènes peuvent s'accumuler pour accroître la résistance. D'après Bellion et al, 2006.



**Figure 8 :** Exemple de chélation d'un ion métallique par le malate. (MI : ion métallique)

Les métaux peuvent également agir sur les acides nucléiques de manière indirecte en perturbant le fonctionnement d'enzymes impliquées dans le métabolisme de ceux-ci est ainsi conduire à une station de l'information génétique en influent sur la fidélité de la réplication. La structure en doigt de zinc , notamment observée dans les enzymes de réparation de l'ADN, est une cible fréquente pour certains métaux toxiques comme le  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{As}^{3+}$ .

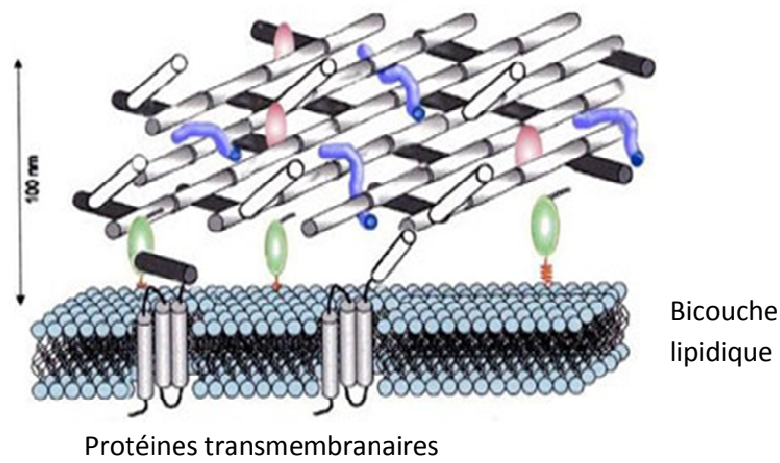
#### I.1.7. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds :

Ce mémoire discutant de problématiques liées aux organismes eucaryotes d'une part et à un champignon en particulier d'autre part, nous utiliserons la cellule de champignon comme modèle. Les principaux mécanismes observés chez les champignons sont schématisés sur la figure 7.

##### I.1.7.1. Complexation et précipitation extracellulaire (figure 7, n°1) :

Plusieurs types de molécules peuvent être sécrétés et se complexer avec les métaux lourds. Un des principaux mécanismes permettant la tolérance aux métaux des cellules implique l'excrétion d'acides organiques (Haferburg et Kothe, 2007; López-Bucio *et al.*, 2000 ; Saber *et al.*, 1999). Différentes molécules organiques, et en particulier des acides di- et tricarboxyliques, sont en effet excrétées par les cellules et servent ainsi à chélater les ions métalliques, entre autres fonctions.

L'induction de l'efflux de l'acide oxalique est étroitement corrélée avec la tolérance au cuivre chez les champignons de la pourriture brune (Green & Clausen, 2003), et l'excrétion accrue d'acide oxalique contribue probablement à la tolérance aux métaux chez *Beauveria caledonica* (Fomina *et al.*, 2005). De même, les champignons ectomycorhiziens répondent souvent à l'exposition aux métaux par l'augmentation de l'exsudation d'oxalate (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000; Cumming *et al.*, 2001). Cette sécrétion de molécules organiques et ses effets dans la tolérance sont bien étudiés pour l'aluminium (Kinraide *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2003; Pellet *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2001). L'aluminium induit la production d'acide citrique, d'acide oxalique, et d'acide malique. L'acide citrique va chélater l'aluminium et ainsi diminuer la toxicité de ce dernier tel que



**Figure 9 :** Structure de la paroi cellulaire d'une cellule fongique. La légende des différents composants extracellulaires représentés est la suivante :



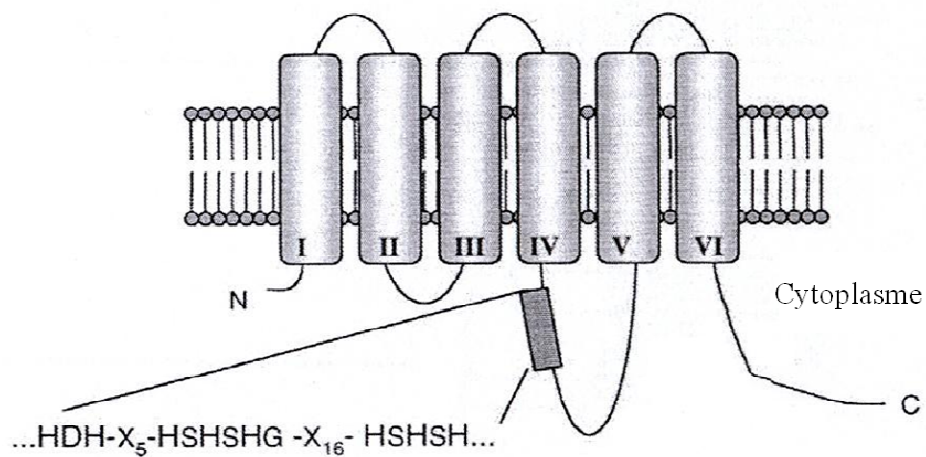
cela fut démontré sur sol podzolisé de forêt (Landeweert et al., 2001; Van Hees *et al.*, 2001). Le malate pourrait inhiber le blocage des canaux calcique au niveau de la membrane plasmique (Huang *et al.*, 1996). Il peut aussi complexer un ion métallique libre (figure 8). Bien qu'il a été démontré que l'efflux d'oxalate est une réponse spécifique au stress du à l'aluminium (Yang *et al.*, 2005), la relation exacte entre la production d'acide oxalique et la tolérance à ce métal reste à démontrer.

D'une manière générale, les acides organiques semblent jouer un rôle dans la tolérance vis-à-vis des métaux lourds.

#### I.1.7.2. Fixation aux parois cellulaires (figure 7, n°2) :

L'ensemble des interactions (échange ionique, complexation, précipitation,...) entre un organisme et les éléments métalliques est nommé « biosorption » (Gadd, 1993). La biosorption montre une dépendance au pH extracellulaire, ainsi si ce dernier est bas, il diminue la biosorption d'ions tel que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  (Gadd, 1993). Au niveau des parois, une compétition entre d'autres anions et cations et les métaux peut avoir lieu pour les sites de fixation (Gadd, 1990).

La paroi cellulaire est le premier site d'interaction directe. Chez les champignons, la composition de la paroi comprend des polymères tels que la chitine, des glucanes, des galactosamines et des protéines (figure 9). Ainsi, un grand nombre de sites potentiels de liaison y exposent des groupement libres (carboxyle, amino, hydroxyle, mercapto ou phosphate) (Strandberg et al., 1981). Il a été démontré que la liaison du cadmium aux parois cellulaires représente une fraction importante du métal accumulé par *Paxillus involutus*. Elle peut être considérée comme un mécanisme de tolérance important chez les champignons mycorhiziens (Blaudez et al., 2000; Frey et al. 2000). Lorsqu'un ascomycète formant des mycorhizes éricoïdes est traité avec des concentrations en Zn de l'ordre du millimolaire, des changements dans la morphologie des hyphes peuvent se produire (Lanfranco et al., 2002). On observe alors des gonflements apicaux et une augmentation des branchements dans les régions subapicales, ainsi qu'une augmentation significative de la quantité de chitine dans les hyphes traités aux métaux. La présence de mélanines parmi les composants de la paroi cellulaire peut encore augmenter la capacité de biosorption de métaux (Fogarty et Tobin, 1996). Lors d'une exposition au cadmium, l'activité laccase, l'expression génique et la



**Figure 10 :** Structure schématique d'un transporteur CDF.

I à VI : domaines transmembranaires, ...HSH... : domaine riche en histidine (H). C et N : extrémités de la protéine. Le passage de  $\text{Zn}^{2+}$  se fait vers l'extérieur. La région riche en histidine permettrait le transport du Zn. La plupart des CDF sont des antiporteurs à protons. D'après Gaither *et al*, 2001.



production de composés polyphénoliques sont induits, ce qui semble être important lors de la réponse cellulaire à l'excès de métaux chez *Paxillus involutus* (Jacob et al., 2004). Palmieri et al. (2000) ont montré que le cuivre peut provoquer l'induction d'isoenzymes de laccase chez *Pleurotus ostreatus*, et Faraco et al. (2003) ont trouvé des séquences d'interaction avec les métaux dans les promoteurs de gènes de laccase de *Pleurotus ostreatus*. Chez le champignon mycorhizien éricoïde *Oïdodendron maius*, l'activité de la polygalacturonase, une enzyme hydrolysant la composante pectine de la paroi cellulaire des plantes, augmente en fonction de l'exposition au cadmium ou au zinc (Martino et al., 2000). Ce mécanisme peut être considéré comme un facteur d'adaptation à la colonisation de sols pollués.

#### I.1.7.3. Séquestration intracellulaire et efflux de métaux (figure 7, n°3) :

Des protéines de transport de composés métalliques peuvent être impliqués dans la tolérance aux métaux, soit par efflux hors de la cellule des ions métalliques toxiques à partir du cytosol ou en permettant la séquestration du métal dans des compartiments intracellulaires (Hall, 2002). Adriaensen et al (2005) ont montré que l'efflux renforcé de zinc peut agir comme un mécanisme de tolérance chez le champignon ectomycorhizien *Suillus bovinus*. Un autre moyen qui peut être mis en place est la répression des gènes de transporteurs impliqués dans l'absorption de métaux au niveau de la membrane plasmique, tel que cela a été décrit par Eide (2003) pour les champignons ou Hall (2002) pour les plantes. ScZRT1 et ScZRT2, deux protéines de la famille ZIP responsables de l'afflux de zinc (respectivement haute et basse affinité), font partie du pool de gènes régulé par ScZap1 ainsi que le gène *Zap1* lui-même. Zap1 régule les gènes en se liant à une séquence particulière au niveau du promoteur de ceux-ci. Cette séquence, appelée ZRE, a été identifiée et Zhao et al. (1998) ont montré qu'elle était nécessaire à la régulation des gènes par Zap1.

Parmi les transporteurs de métaux pouvant être impliqués dans le phénomène, nous allons étudier plus particulièrement le rôle joué par les protéines de transport de la famille CDF (cation diffusion facilitator) de *Laccaria bicolor* (chapitre IV : L'homéostasie du zinc chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*).

Les gènes CDFs ont été découverts chez *Alcaligenes eutrophus* par Nies et Silver en 1995. On les retrouve chez les bactéries, les champignons, les plantes et les mammifères. Pour la plupart, ce sont des antiports  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^{+}$  (MacDiarmid et al., 2002) permettant l'efflux de cations métalliques depuis le cytoplasme vers d'autres compartiments cellulaires ou vers l'extérieur de la cellule.

La majorité des CDFs ont 6 domaines transmembranaires putatifs et des extrémités N et C terminales cytoplasmiques (figure 10). Les domaines transmembranaires I, II, V et VI sont impliqués dans le transfert de métal et sont très conservés (Montanini et al., 2007).

Certains membres CDFs de champignons ont déjà été caractérisés. Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, les transporteurs COT1, MMT1, MMT2, MSC2, ZRC1 et ZRG17 le sont. ScMMT1 et ScMMT2 sont des transporteurs de fer (Li & Kaplan, 1997). MSC2 est un transporteur de zinc localisé au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (Li & Kaplan, 2001). ZRG17 est un transporteur de zinc (Ellis et al., 2005). ScCOT1 est un transporteur de cobalt, cadmium et zinc localisé au niveau de la vacuole. Cot1 est très proche de ScZRC1, ces deux protéines partagent un pourcentage d'identité de 60% (Conklin et al., 1992). ScZRC1 est un transporteur de zinc localisé au niveau de la vacuole ((Kamizono et al., 1989). ScZRC1 voit son expression augmenter en situation de carence en zinc et baisser suite à un rajout de zinc dans le milieu (Miyabe, 2001). En situation de carence en zinc, la cellule augmente sa capacité d'absorption de ce métal, néanmoins si ce métal venait à être de nouveau disponible, la cellule devrait réagir vite pour ne pas subir un choc au zinc (afflux trop massif de zinc dans la cellule). MacDiarmid et al. (2003) montrent le rôle crucial de l'activité de ZRC1, et sa régulation par ZAP1, dans la tolérance à un choc en zinc. ZAP1 est un facteur de transcription qui, suite à la détection d'une carence en zinc, va activer la synthèse de protéines responsable de l'homéostasie du zinc (Herbig et al., 2005; Wang et al., 2006) La cellule répond à cet excès de zinc par une baisse de la régulation de la transcription des importateurs de zinc que sont ScZRT1 et ScZRT2 (Zhao et Eide, 1996 a et b) et en surexprimant, de manière transitoire, *ZRC1*.

D'autres protéines CDF ont été décrites chez les végétaux, comme par exemple ZAT1 (Zinc transporter of *Arabidopsis*) (Van der Zaal et al., 1999) ou PtdMTP1 chez le peuplier (Blaudez et al., 2003). Récemment, le premier transporteur CDF de champignon filamenteux a été

partiellement caractérisé chez *Glomus intraradices*, sa localisation n'ayant pu encore être démontrée (Gonzalez-Guerrero et al., 2005).

#### I.1.7.4. Chélation intracellulaire des métaux (figure 7, n° 4 et 5) :

Malgré les mécanismes décrits ci-dessus, de grandes quantités de métaux peuvent être présentes dans les cellules. Blaudez et al. (2000) ont quantifié les proportions de cadmium dans le cytosol et la vacuole de *Paxillus involutus*, l'importance de celles-ci implique la présence de systèmes de détoxification intracellulaires efficaces. Morselt et al. (1986) ont suggéré que la tolérance aux métaux du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* est basée sur la présence de métallothionéines. Celles-ci forment une classe de protéines riches en cystéine et sont présentes de façon ubiquitaire. Elles ont un faible poids moléculaire et contiennent des agrégats de métaux à base de soufre. Un rôle crucial de ces protéines est leur implication dans l'homéostasie des oligo-éléments essentiels tels le zinc et le cuivre, ou la séquestration des métaux toxiques pour l'environnement, tels le cadmium et le mercure (Chiaverini et De Ley, 2010; Fang et al., 2010; Klaassen et al., 2009). Elles ont été également identifiées chez les champignons et les autres royaumes (Clemens et Simm, 2003).

Courbot et al. (2004) ont montré que la quantité de glutathion augmente en fonction de l'exposition au cadmium chez *Paxillus involutus*, ainsi que celle d'un composé proche des métallothionéines. La séquence pleine longueur de cette métallothionéine rétablit la croissance d'une souche mutante yAP-1 quand elle y est exprimée en présence de glutathion (Courbot et al., 2004). Le rôle du glutathion (figure 11) comme un chélateur de métaux dans les champignons est désormais clairement établi (Pócsi et al., 2004). Le glutathion intracellulaire séquestre les ions métalliques, empêchant ainsi l'action toxique des métaux lourds. Inversement, plusieurs études semblent confirmer l'absence générale de phytochélatines chez les champignons, sauf dans de rares cas tels que *Candida glabrata* qui produit des phytochélatines en réponse au cadmium (Zhou & Goldsbrough, 1994 et 1995) ou *Schizosaccharomyces pombe* (Clemens & Simm, 2003). Les phytochélatines sont répandues largement dans le monde végétal (Yadav, 2010). Les phytochélatines ont la capacité de séquestrer différents métaux (Sneller et al., 2000), comme par exemple le cadmium (DalCorso et al., 2008), le zinc (Gasic et Korban, 2007b), l'arsenic (Gasic et Korban, 2007a).

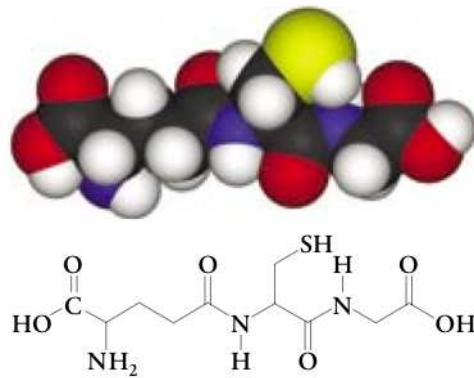
#### I.1.7.5. Compartimentation vacuolaire (figure 7, n°6 et 7) :

Blaudez et al. (2000) ont montré l'importance de l'accumulation du cadmium dans le compartiment vacuolaire, suggérant ainsi le caractère essentiel de ce mécanisme dans les processus de détoxification du cadmium chez le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus*.

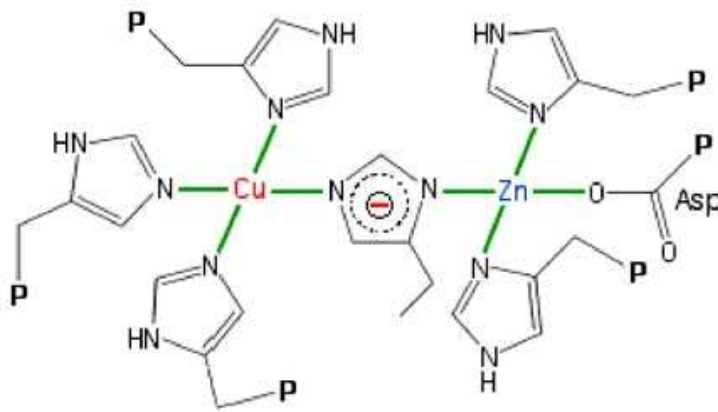
En effet, l'accumulation de complexes glutathion-cadmium ou phytochélatine-cadmium dans la vacuole semble être une étape cruciale dans la détoxification du cadmium, chez la levure et probablement chez les plantes supérieures. Ce processus semble être accompli par le transporteur Hmt1 situé au niveau du tonoplaste (Ortiz et al., 1992). Le gène Ycf1, chez la levure, code pour un transporteur responsable de la séquestration vacuolaire des complexes glutathion-cadmium (Li et al., 1997) ainsi que glutathion-mercure (Gueldry et al., 2003). La présence de cette perméase spécifique chez *Paxillus involutus* pourrait expliquer la forte teneur en cadmium retrouvé dans la vacuole (Blaudez et al., 2000).

#### I.1.7.6. Transformation des métaux :

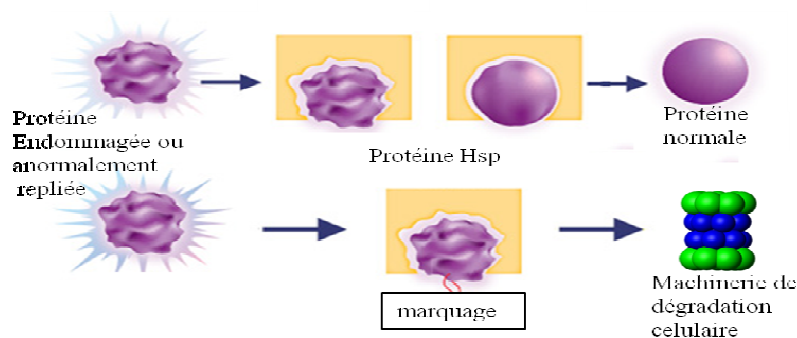
Bien que la majorité de la littérature présente ces mécanismes chez les bactéries, de nombreux autres organismes, comme les champignons par exemple (Gadd, 1993), sont capables de transformer des métaux par différents moyens tels la méthylation, l'oxydation, la réduction. Le but de ces transformations est souvent la neutralisation de la toxicité du métal visé soit directement (le métal est ainsi moins ou non toxique après la transformation) soit indirectement en rendant le métal volatile par exemple (Gadd, 1993). La toxicité de l'arsenic dépend de l'espèce présente, ainsi As(III) et As(V) sont les plus toxiques (Islam et al, 2004). Les transformations bactériennes incluent la réduction, l'oxydation et la méthylation de composés, et il a été démontré que cela se produit dans les systèmes aquatiques et terrestres (Silver et Phung, 2005a et b). Plusieurs études suggèrent que la réduction de l'As(V) en As(III) est impliqué dans la solubilisation de l'élément résultant de la contamination des réserves d'eau importantes (Kinniburgh et Kosmus, 2002; Oremland et Stolz, 2003). De fait, le mécanisme d'oxydation convertit le très toxique et très soluble As(III) en As(V) (Battaglia-Brunet et al., 2006 ; Bruneel et al., 2003).



**Figure 11 :** Représentation en 3 dimensions et formule chimique d'une molécule de Glutathion.



**Figure 12 :** Site actif de la SOD Cu-Zn (simplifié d'après Potter et Valentine, 2003). Un atome de Cu est réuni par liaisons de coordination (vert) à un atome de Zn. Ce lien est le cycle imidazole d'une histidine déprotonée, dans lequel est délocalisé un électron (charge -). Trois histidines achèvent de coordonner le Cu, tandis que deux autres, assistées d'une asparagine, complètent la coordination de Zn. **P** : chaîne protéique



**Figure 13 :** Principes d'action des protéines chaperonnes (ou Hsp). Les protéines endommagées ou anormalement repliées sont soit correctement repliées soit adressées à la machinerie de dégradation cellulaire (protéasome)

#### I.1.7.7. Système de détoxification anti-oxydatif :

La formation de radicaux libres, induite directement ou indirectement par les métaux, peut causer de graves dommages aux différents composants cellulaires.

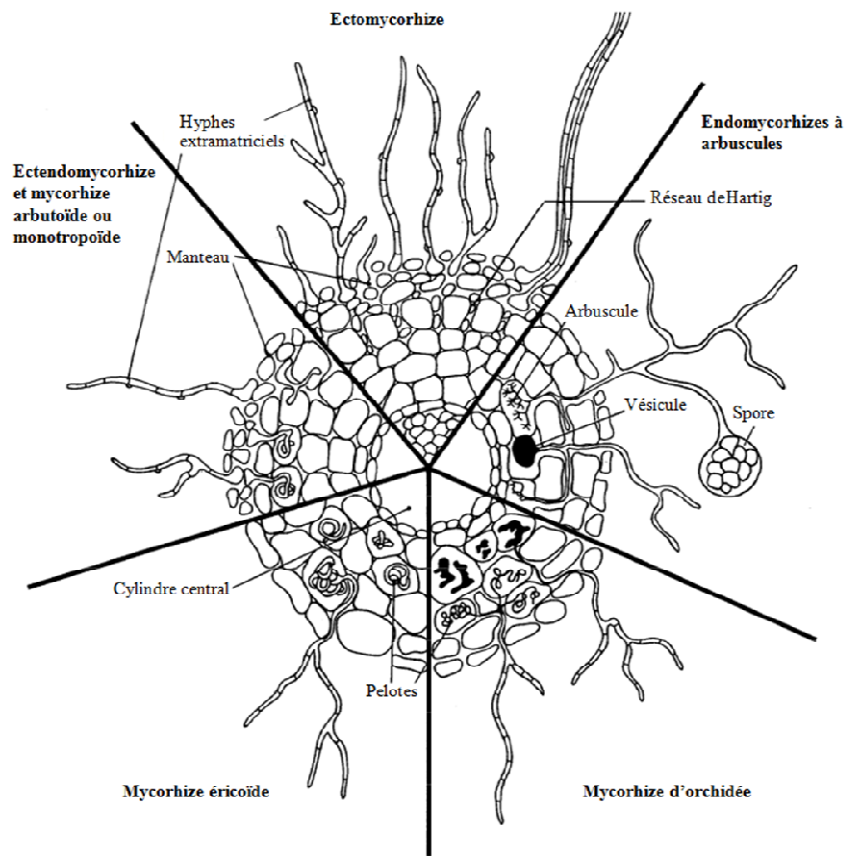
Les organismes possèdent des mécanismes anti-oxydatifs efficaces qui peuvent être enzymatiques (superoxyde dismutase ou SOD, peroxydase, ...) ou non (par exemple le glutathion ou les flavonoïdes).

Les enzymes SOD (figure 12), peroxydase et catalase servent à éliminer les formes réactives de l'oxygène. Ott et al. (2002), dans leur étude, ont analysé les systèmes antioxydants chez le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* en réponse au cadmium, ils ont ainsi révélé l'induction de la superoxyde dismutase ainsi que l'accumulation du glutathion ainsi que d'autres systèmes liés au glutathion (une peroxydase glutathion-dépendante, une glutathion réductase). Jacob et al. (2001) ont montré que la SOD de *Paxillus involutus* restaure le phénotype de souche bactérienne dont la SOD a été délétée et que l'activité de cette PiSOD augmente en présence de cadmium. Ces résultats suggèrent une implication de cette SOD dans la réponse cellulaire de *P. involutus* au cadmium.

Les thiorédoxines sont de petites oxydoréductases thermostables, qui contiennent deux résidus cystéine conservés dans leur site actif (Zeller et Klug, 2006). Leurs rôles supposés incluent de nombreux processus cellulaires tels un le repliement des protéines et sa régulation, la réduction du déhydro-ascorbate, la réparation des protéines endommagées par oxydation et le métabolisme du soufre. Trotter et Grant (2002) ont démontré que les thiorédoxines sont nécessaires au maintien de l'homéostasie redox dans des conditions de stress.

#### I.1.7.8. Autre mécanismes :

D'autres mécanismes peuvent intervenir suite à un stress métallique, comme par exemple la production de protéines de stress telles les protéines HSP (Heat Shock Proteins) (figure 13) (Flora et al., 2008; Gupta et al., 2010). Néanmoins ceci n'est pas spécifique aux stress métalliques.



**Figure 14** : Différents types de mycorhizes (modifié d'après Selosse et Le Tacon, 1998)

## I.2. *Laccaria bicolor* et la symbiose mycorhizienne :

### I.2.1. La symbiose mycorhizienne :

Les mycorhizes (du grec *mukês*, champignon et *rhiza*, racine, Frank 1885) sont une association mutualiste à bénéfice réciproque entre un champignon et une plante. Les végétaux sont ancrés dans le sol par leurs racines, et prélèvent l'eau et les éléments minéraux à leur substrat. Leurs racines sont exposées à un large spectre d'organismes d'où l'existence de plusieurs types d'interactions : le saprophytisme, le parasitisme, et la symbiose. La plupart des familles végétales (environ 80%) sont concernées par la symbiose mycorhizienne (Trappe, 1996, Read et al. 2000, Brundrett 2002). Elles constituent le type de symbiose le plus représenté sur terre (Smith and Read, 1997).

Sept types de mycorhizes ont été distingués, selon des critères morphologiques (figure 14).

#### I.2.1.1. Ectomycorhizes :

Les premières traces datent d'approximativement 50 millions d'années (LePage et al., 1997). Elles sont formées par l'association d'un champignon de l'ordre des Basidiomycètes, Ascomycètes ou Zygomycètes, et d'un partenaire végétal appartenant aux Angiospermes ou aux Gymnospermes. Morphologiquement, les ectomycorhizes se caractérisent par la présence d'un manchon mycélien entourant la jeune racine (le manteau), un réseau fongique entre des cellules corticales (le réseau de Hartig), et un réseau d'hyphes extramatriciels.

#### I.2.1.2. Endomycorhize à arbuscules :

C'est la plus ancienne des symbioses mycorhiziennes, elle serait apparue entre 353 et 462 millions d'années (Simon et al., 1993). A la différence des ectomycorhizes, le champignon pénètre à l'intérieur des cellules racinaires et forme des structures intracellulaires, les arbuscules et vésicules. Ces mycorhizes sont formées par des champignons de l'ordre des Glomales et une grande variété de partenaires végétaux incluant les Bryophytes, presque tous les groupes de Ptéridophytes, des Gymnospermes et de nombreux Angiospermes.



### I.2.1.3. Autres type de mycorhizes :

- Les mycorhizes éricoïdes présentent des structures fongiques sous la forme de pelotes à l'intérieur des cellules racinaires. Les champignons impliqués dans les mycorhizes éricoïdes sont des ascomycètes principalement du genre *Hymenoscyphus* et *Oidiodendron*. La mycorhization a lieu directement au niveau des cellules corticales des Ericacées puisqu'elles ne possèdent pas d'épiderme.
- Les mycorhizes d'orchidées où les champignons produisent des hyphes à l'intérieur des racines. La plupart des champignons impliqués appartiennent au genre *Rhizoctonia*
- Les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes et les ectendomycorhizes sont similaires aux associations ectomycorhiziennes avec néanmoins des caractéristiques spécialisées.

*Laccaria bicolor* est un modèle de choix au sein de l'unité UMR1136 où la thèse a eu lieu. Ce champignon ectomycorhizien, qui présente un intérêt économique important du fait de son utilisation en pépinière pour inoculer les pins Douglas, est le premier champignon mycorhizien dont le génome a été séquencé (Martin et al., 2008). Les ectomycorhizes feront donc l'objet de notre étude.

### I.2.2. Rôle des ectomycorhizes dans l'écosystème :

Les échanges entre les deux partenaires suivraient une loi d'échange équitable où la plante autotrophe fournit des photosynthétats au champignon hétérotrophe qui, lui, approvisionne la plante en retour essentiellement en N et P (Chalot et Brun, 1998). En effet, la mise à l'obscurité du peuplier hybride *Populus tremula* x *Populus alba* provoque une diminution de la quantité de carbone apportée au champignon ectomycorhizien *Laccaria*, induisant en retour une baisse proportionnelle de la quantité de phosphate absorbé par la plante (Bucking et Heyser, 2001).



#### I.2.2.1. Echanges trophiques :

Une mycorhize est une interface d'échange de nutriments entre plante et champignon. Ces échanges, à bénéfices réciproques, impliquent de nombreux systèmes de transport qui sont résumés sur la figure 15.

##### I.2.2.1.1. Bénéfices pour la plante :

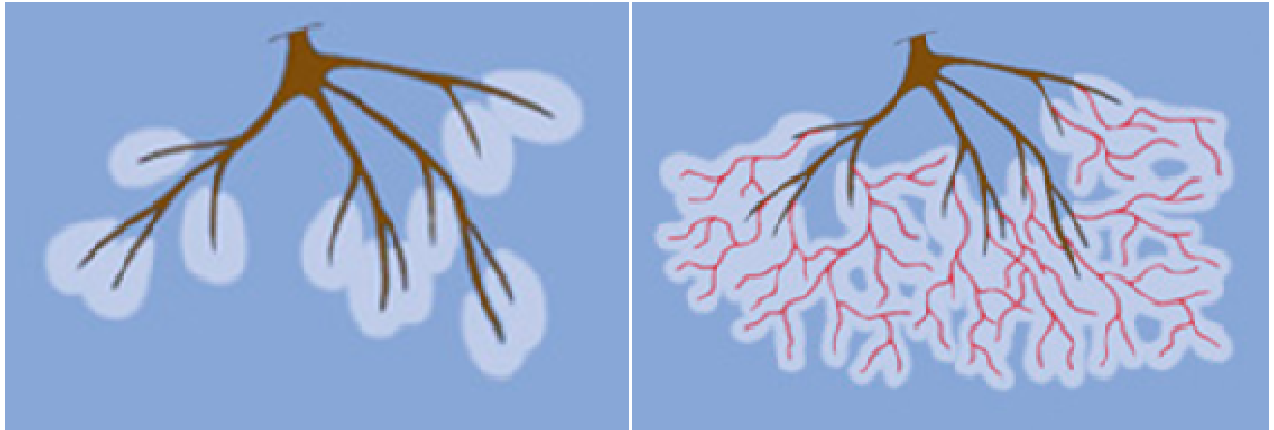
Le mycélium extramatriciel peut coloniser un volume important de sol (figure 15), permettant ainsi à la plante d'augmenter son volume de prospection pour le phosphore et l'azote, deux éléments principaux limitant la croissance des arbres dans les sols forestiers (Alvarez et al., 2009; Brearley et al., 2005; Vance, 2001).

Les champignons ectomycorhiziens peuvent améliorer la nutrition phosphatée de leurs plantes hôtes en sécrétant, dans la solution du sol, des phosphatases acides en mesure de libérer du phosphate inorganique à partir du phosphore organique du sol (Louche et al., 2010).

Des dosages d'ammonium marqué ont été effectués dans les racines et les feuilles de la plante après traitement du système intact et du système pour lequel le mycélium a été déconnecté des racines. Les résultats montrent que la plante a pu incorporer de plus grandes quantités d'azote à la fois dans les racines et les tiges grâce au champignon lorsque le système est intact (Javelle et al., 1999).

##### I.2.2.1.2. Bénéfices trophiques pour le champignon :

Les bénéfices de l'interaction sont, pour le champignon, essentiellement d'ordre trophique. Ainsi, dès 1894, Frank suggère que les photosynthétats de la plante représentent la principale source de nutriments organiques pour les champignons ectomycorhiziens. Néanmoins, ces derniers pourraient prélever ces nutriments directement dans le sol. L'hypothèse de Frank a été vérifiée plus tard par Melin (1925) qui a montré que les champignons étaient dépendants des sucres simples que pouvait lui fournir la plante via la photosynthèse. De plus, les composés présents dans le sol, essentiellement sous forme de cellulose et de lignine, sont difficilement assimilables par les champignons mycorhiziens.



**Figure 16 :** Zone d'exploration (bleu clair) de la racine sans mycorhize (à gauche) comparée à la zone d'exploration (bleu clair) avec mycorhizes en rouge (à droite). L'exploration du sous-sol et donc la nutrition de l'arbre sont grandement améliorées.

Lors d'étude au carbone marqué sur des plants de pins ou de bouleaux mycorhizés par *Paxillus involutus*, Söderström et al. (1988) ont identifié le tréhalose, le mannitol et l'arabitol comme étant les composés carbonés marqués présents dans le champignon en fin d'expérience. Ces composés sont transloqués à raison de 20 cm/heure depuis la racine jusqu'à la périphérie du mycélium (Finlay et Read, 1986).

En plus de l'acquisition de carbones à partir de photosynthétats produit par les plantes, Laczko et al. (2004) ont démontré que des lipides de la plante pouvaient eux aussi constituer une réserve de carbone. Ainsi, chez le pin (*Pinus sylvestris*), on observe une production accrue de lipides neutres contenant des acides gras saturés en réponse à la présence de *Pisolithus tinctorius*. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un prélèvement de ces acides gras par le champignon dès l'établissement du contact avec la plante, avant même la formation du réseau de Hartig. Ces acides gras seraient transférés sous forme de lipides neutres, ce qui expliquerait la teneur plus forte car, en début d'expérience, le mycélium en culture pure et le mycélium extramatriciel présentaient de très faibles concentrations en lipides neutres.

#### I.2.2.2. Protection de la plante :

A côté des bénéfices trophiques mutuels qui ont lieu entre le partenaire fongique et la plante, l'ectomycorhize offre aussi le bénéfice d'une protection à la plante contre divers agents nuisibles.

##### I.2.2.2.1. Protection contre les pathogènes :

Les champignons ectomycorhiziens tiennent un rôle important dans la protection des plantes contre les agressions environnementales. Bien qu'il soit assez facilement admis que l'association ectomycorhizienne permet une meilleure résistance des plantes face aux pathogènes, les mécanismes de protection de la plante par le champignon restent mal connus. Marx (1973) a montré que la présence de certains champignons ectomycorhiziens tels *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* ou *Thelephora terrestris* a permis de réduire l'impact de champignons pathogènes sur des plantules de pin. Il a attribué cet effet à la barrière physique que représente le manteau fongique. D'autres études ont mis en avant la production de composés phénoliques dans les tissus végétaux en réponse à la présence du symbiote (Charitha et Reddy, 2002; Yao et al., 2007).

**Tableau V:** Etudes de la tolérance aux métaux lourds chez les champignons à mycorhizes arbusculaires en symbiose avec une plante hôte.

| Champignon(s)              | Plante(s) hôte(s)              | Métal                       | Effet                                                                  | Référence                        |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Glomus sp.</i>          | <i>Medicago sativa</i>         | cuivre                      | Tolérance accrue                                                       | Novoa et al., 2010               |
| <i>Glomus deserticola</i>  | <i>Eucalyptus globulus</i>     | zinc                        | Tolérance accrue<br>Diminution du transfert vers les parties aériennes | Arriagada et al., 2010           |
| <i>Glomus intraradices</i> | <i>Medicago truncatula</i>     | cadmium                     | Tolérance accrue                                                       | Redon et al., 2009               |
| <i>Glomus macrocarpum</i>  | <i>Zea mays</i>                | cadmium                     | Tolérance accrue                                                       | de Andrade et da Silveira, 2008a |
| <i>Glomus intraradices</i> | <i>Helianthus annuus</i>       | cadmium                     | Tolérance accrue                                                       | de Andrade et da Silveira, 2008a |
| <i>Glomus mosseae</i>      | <i>Chrysopogon zizanioides</i> | plomb                       | Augmentation du transfert vers les parties aériennes                   | Punamiya et al., 2010            |
| <i>Glomus mosseae</i>      | <i>Vicia faba</i>              | multiples                   | Stabilisation sur racines                                              | Zhang et al., 2004               |
| <i>Glomus mosseae</i>      | <i>Cannabis sativis</i>        | cadmium<br>chrome<br>nickel | Augmentation du transfert vers les parties aériennes                   | Citerio et al., 2005             |

| Champignon(s)                                                                                     | Plante(s) hôte(s)       | Métal         | Effet                                              | Référence                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Laccaria bicolor</i> , <i>Paxillus involutus</i>                                               | <i>Picea abies</i>      | cadmium       | Tolérance accrue                                   | Jentschke et al., 1999                  |
| <i>Amanita rubescens</i> , <i>Hebeloma sinapizans</i>                                             | <i>Pinus sylvestris</i> | cadmium       | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Kozdro et al., 2007                     |
| <i>P. involutus</i> , <i>Suillus sp.</i> , <i>Laccaria laccata</i> , <i>Thelephora terrestris</i> | <i>Pinus sylvestris</i> | cadmium       | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Colpaert and Van Assche, 1993           |
| <i>S. luteus</i>                                                                                  | <i>Pinus sylvestris</i> | cadmium       | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Krznaric et al., 2009                   |
| <i>Suillus luteus</i>                                                                             | <i>Pinus sylvestris</i> | cuivre        | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Adriensen et al., 2005                  |
| <i>Suillus bovinus</i> , <i>Thelephora terrestris</i>                                             | <i>Pinus sylvestris</i> | cuivre        | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Van Tichelen et al., 2001               |
| in situ                                                                                           | <i>Betula pendula</i>   | cuivre, plomb | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Bojarczuk et Kieliszewska-Rokicka, 2010 |
| <i>Hebeloma crustuliniforme</i>                                                                   | <i>Picea abies</i>      | multiples     | Diminution du transfert vers les parties           | Frey et al., 2000                       |
| <i>Suillus bovinus</i>                                                                            | <i>Pinus sylvestris</i> | zinc          | Tolérance accrue                                   | Adriensen et al., 2006                  |
| <i>Amanita muscaria</i> , <i>P. involutus</i>                                                     | <i>Betula sp.</i>       | zinc          | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Brown and Wilkins, 1985                 |
| <i>P. involutus</i> , <i>S. bovinus</i>                                                           | <i>Pinus sylvestris</i> | zinc          | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Colpaert and Van Assche, 1992           |
| <i>T. terrestris</i>                                                                              | <i>Pinus sylvestris</i> | zinc          | Diminution du transfert vers les parties aériennes | Colpaert and Van Assche, 1992           |

**Tableau VI:** Etudes de la tolérance aux métaux lourds chez les champignons à ectomycorhizes en symbiose avec une plante hôte.

Chez les champignons mycorhiziens arbusculaires, cette protection est aussi présente, ainsi Abdel-Fattah et Shabana (2002) ont montré que *Glomus clarum* protège *Vigna unguiculata* du Basidiomycète *Rhizoctonia solani*. Cette protection serait la résultante de deux phénomènes : d'une part une nutrition accrue et performante, limitant en même temps celle du pathogène, et d'autre part la compétition pour les sites d'infection et les réactions antagonistes pouvant exister entre le champignon mycorhizien et l'agent pathogène.

#### I.2.2.2.2. Protection contre les xénobiotiques :

##### I.2.2.2.2.1. Généralités :

Des substances xénobiotiques potentiellement présentes dans les sols peuvent perturber les échanges décrits précédemment. Ainsi des composés organiques, surtout des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ou des ions métalliques sont susceptibles de modifier l'assimilation de composés azotés ou carbonés par le champignon (Blaudez et al., 2000). Les cellules fongiques qui entourent les racines des plantes constituent une barrière physique contre les xénobiotiques et protègent ainsi le partenaire végétal du contact direct avec ces substances toxiques. A côté de cette protection physique, les champignons possèdent des mécanismes moléculaires de protection. Quant aux HAP, quelques espèces fongiques sont capables de les dégrader par voie enzymatique (Braun-Lüllemann et al., 1999 ; Dittmann et al., 2002 ; Genny et al., 2004).

##### I.2.2.2.2.2. Protection contre les effets toxiques des métaux lourds :

Jenstschke et al. (1999) ont montré que la réduction de la toxicité des métaux peut être reliée, souvent, à l'amélioration de la croissance grâce à une meilleure nutrition et, de fait, une meilleure dilution des métaux dans les tissus de la plante hôte. Les travaux de Karagiannidis & Nikolaou (2000) ont montré une diminution du nombre de spores dans le sol ainsi que de la mycorhization en présence de cadmium et de plomb dans le sol.

Des expériences en systèmes hydroponiques confirment que les champignons améliorent la survie des jeunes arbres en présence de solutions de substances toxiques à la fois par une consommation plus soutenue en nutriments et une diminution du transfert de métaux lourds à l'hôte (Adriaensen et al., 2005).

Une forte toxicité va induire une pression de sélection forte et seulement quelques organismes vont réussir à reconstituer des populations métallo-tolérantes. Ce phénomène est bien connu chez les procaryotes (Mergeay et al., 2003). Toutefois, il est beaucoup plus laborieux de réaliser des études de terrain sur la communauté ou de structure de la population de champignons. En effet, les champignons sont des organismes le plus souvent cryptiques dont la croissance hyphale est indéterminée, de fait, les caractéristiques telles que le nombre et la taille des individus sont difficilement mesurables.

De nombreuses études traitant de la tolérance aux métaux chez les champignons et des bénéfices partagés avec les plantes hôtes ont été menées chez les mycorhizes à arbuscules (tableau V) et les ectomycorhizes (tableau VI). D'une manière générale, ces études nous montrent que les associations mycorhiziennes protègent efficacement les plantes hôtes contre les effets nocifs des métaux lourds. On peut notamment souligner l'augmentation de tolérance due à une diminution du transfert de métaux lourds vers les cellules végétales (Adriensen et al., 2005; Arriagada et al., 2010; Bojarczuk et Kieliszewska-Rokicka, 2010; Brown and Wilkins, 1985; Colpaert and Van Assche, 1992 et 1993; Frey et al., 2000; Kozdro et al., 2007; Van Tichelen et al., 2001). Le champignon, directement en contact avec le sol, donc avec les métaux lourds, va jouer un rôle de « filtre » (Arriagada et al., 2010). Les moyens de détoxification des métaux lourds mis en œuvre pour réaliser ce rôle important sont ceux présentés dans le paragraphe I.1.7, mais on peut souligner plusieurs autres stratégies. Les champignons mycorhiziens augmentent le pH du sol de la rhizosphère lors d'un stress au zinc élevé, ce qui se traduit par une baisse de la concentration en zinc soluble, ainsi, les mycorhizes peuvent protéger les plantes hôtes en diminuant la biodisponibilité du zinc. (Audet et Charest, 2006 et 2008). On retrouve de fortes concentrations de métal au niveau des parois cellulaires des hyphes extramatriciels d'*Hebeloma crustuliniforme* (lors de son association avec *Picea abies*), mais pas dans leur manteau (Frey et al., 2000). De la même manière, Ker et Charest (2009) ont montré que les champignons mycorhiziens à arbuscule améliorent la tolérance au nickel du tournesol, notamment en aidant à la séquestration du métal dans les racines de la plante hôte et dans les tissus fongiques.

Un autre effet observé chez les associations mycorhiziennes est l'augmentation du transfert vers la partie foliaire des plantes. Cet effet présente un grand intérêt dans des possibilités de phytoextraction (Citterio et al., 2005; Punamiya et al., 2010)





**Figure 17 :** Photographie du Carpophore de *Laccaria bicolor*, champignon établissant une mycorhization du pin Douglas (source INRA Champenoux)

### I.2.3. *Laccaria bicolor* : (figure 17)

#### I.2.3.1. Généralités :

C'est le premier champignon symbiotique dont le génome a été séquencé. En effet, le *Laccaria* Genome Consortium, en collaboration avec le Joint Genome Institute (US Department of Energy), ont séquencé et analysé le génome de 65 millions de paires de bases de *Laccaria bicolor*, S238N souche H82 (Martin et al., 2008).

Environ 20.000 gènes codant pour des protéines ont été identifiés en combinant divers logiciels de prédiction de gènes. Néanmoins, une partie seulement, soit 14.464 protéines, a montré une similarité de séquence (à l'aide du logiciel BLASTX avec un seuil d'e-value de 0,001) aux protéines déjà documentées (Martin et al., 2008)

Le champignon symbiotique *Laccaria bicolor* est un membre des Agaricales, un clade de Basidiomycètes ectomycorhiziens. Il se développe rapidement en culture pure et ses mycorhizes sont facilement établies avec les racines des arbres dans les conditions de laboratoire. Enfin, cette espèce est utilisée dans de vastes programmes d'inoculation dans les pépinières forestières commerciales dans le monde entier pour favoriser la croissance des jeunes plants d'arbres (Villeneuve et al. 1991).

La systématique, la biogéographie ; la physiologie et l'écologie de *Laccaria* ont donc été bien étudiées, notamment au sein de l'unité UMR1136 (Courty et al., 2009; Felten et al., 2009; Labbé et al., 2008 ; Lucic et al., 2008; Martin et al., 2008; Morel et al., 2008; Reich et al., 2009).

#### I.2.3.2. Origine de la souche utilisée :

Une fructification de *Laccaria bicolor* a été collectée en 1976 sous un conifère, *Tsuga mertensiana*, dans le Parc national de Crater Lake (Oregon, USA) par Trappe et Molina et déposée au Service des forêts (Corvallis, OR, USA). Une sous-culture de cette souche, dite S238-O, a été transférée à l'INRA-Nancy en 1980 et rebaptisé S238N. Les spores ont été obtenues à partir d'une fructification recueillies en dessous de plants de sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), inoculés avec la souche *L. bicolor* S238N. Pour la purification de l'ADN de haut poids moléculaire utilisé pour la construction de banques génomiques, l'haploïde monocaryotique de la lignée S238N-H82 a été utilisé.

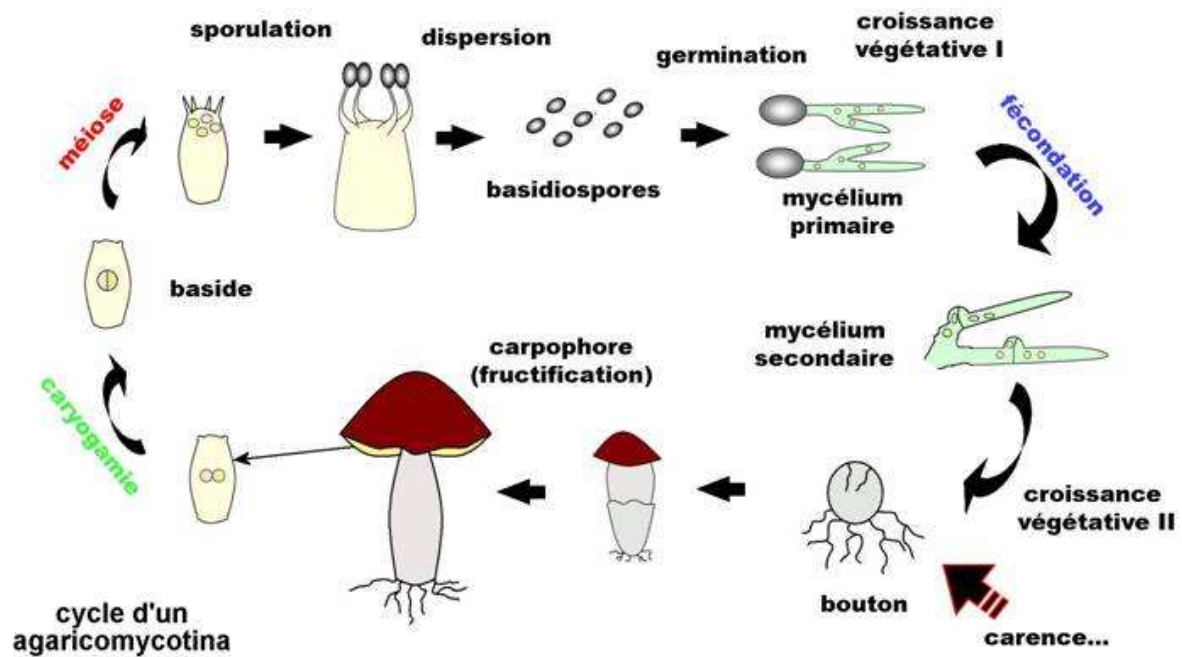


Figure 18 : cycle de vie d'un Basidiomycète. Le cycle commence par la germination des basidiospores qui donnent naissance à des mycéliums primaires haploïdes. La rencontre de 2 mycéliums haploïdes primaires de types sexuels compatibles et leur fusion entraîne la formation du mycélium dicaryotique secondaire.

### I.2.3.3. Le cycle de vie de *Laccaria bicolor* : (figure 18)

Les fructifications du champignon produisent des méiospores qui germent dans le voisinage des racines de l'arbre-hôte pour produire des mycelia haploïdes monocaryotiques. La fusion de mycelia monocaryotiques haploïdes sexuellement compatibles résulte en la formation de mycélia dicaryotiques (diploïdes). On retrouve deux facteurs sexuels complexes contrôlant la compatibilité des monocaryons et régulant le maintien de l'état dicaryotique. Le dicaryon est la structure végétative prédominante chez *Laccaria bicolor* ainsi que chez la plupart des autres Basidiomycètes. Dans des conditions appropriées, le mycélium filamenteux dicaryotique fixé aux racines de l'hôte produit des fructifications dans lequel la méiose se produit. Les mycélia monocaryotiques et dicaryotiques sont capables d'une croissance indéfinie dans le sol, permettant le maintien et la duplication du génotype dans chaque état de ploïdie. La symbiose ectomycorhizienne est généralement provoquée par des mycélia dicaryotiques interagissant avec les racines courtes de l'arbre hôte.

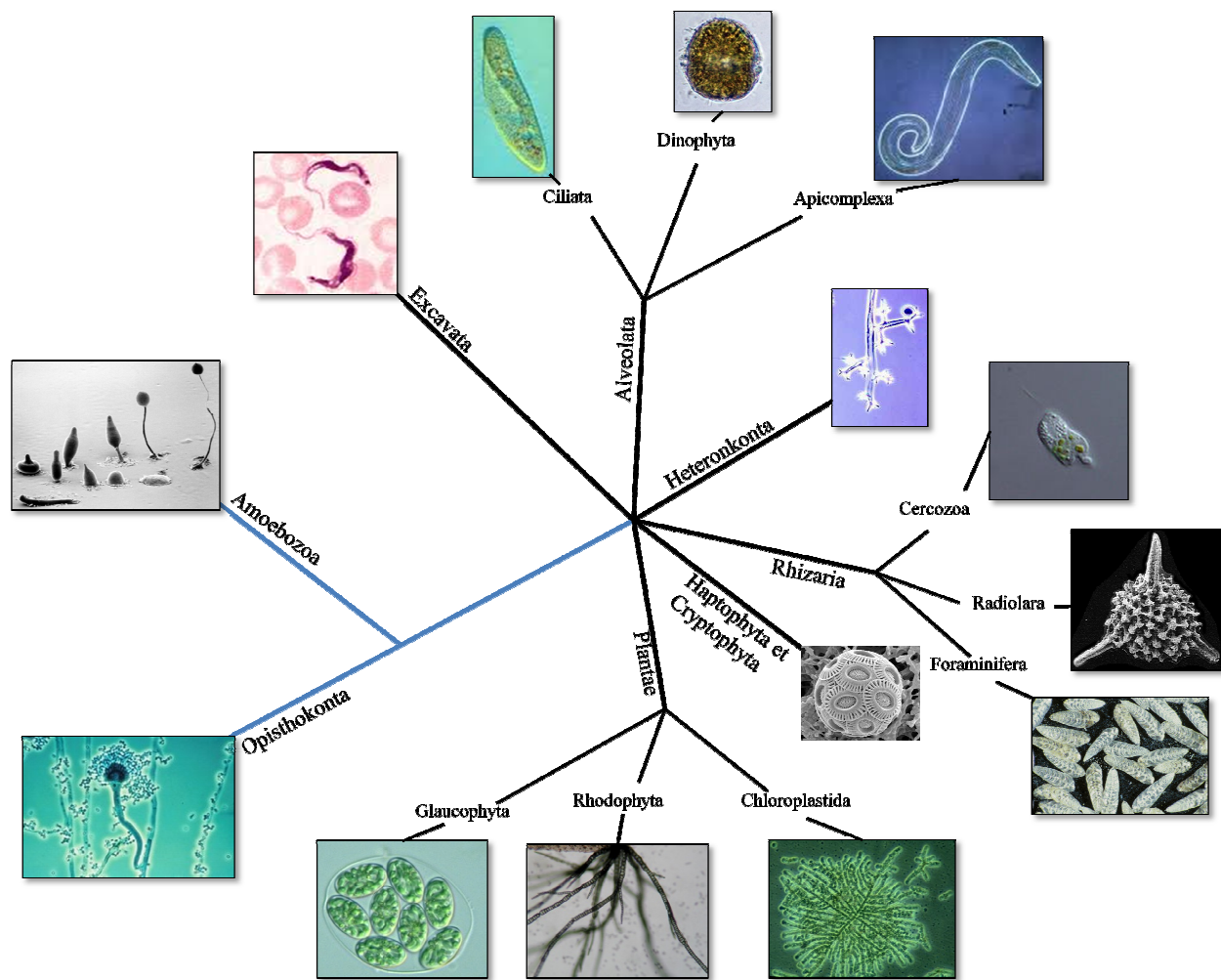
## I.3. De la génétique « classique » à la métatranscriptomique des microorganismes eucaryotes :

### I.3.1. Les microorganismes eucaryotes :

Un de nos objectifs, lors de cette thèse, est d'étudier une réponse adaptative de microorganismes eucaryotes du sol aux métaux lourds. L'étude phylogénétique de ces derniers a beaucoup progressée depuis les années 2000. Pour discuter de ces microorganismes et les classer, nous utiliserons les phyla définis par les travaux de Cavalier-Smith (2003; 2004; 2009 et 2010), Cavalier-Smith et Chao (2003), de Burki et al. (2007) et López-Garcia et Moreira (2008) (figure 19). Les eucaryotes peuvent être subdivisés en deux superclades : Les unicontes et les bicontes (Cavalier-Smith, 2002).

#### I.3.1.1. Les Unicontes :

Les Unicontes comprennent exclusivement des eucaryotes hétérotrophes tels les opisthocontes et les Amoebozoa.



**Figure 19 :** Arbre phylogénétique des microorganismes eucaryotes. Les Unicontes sont sur la partie bleue et les Bicontes sur la noire de l'arbre. Un organisme de chaque branche est présenté. Chez les Unicontes, on reconnaîtra *Aspergillus sp.* pour les Opisthokonta et *Dyctiostelium discoideum* pour les Amoebozoa. Pour les bicontes sont représentés *Trypanosoma brucei* pour les Excavata; *Paramecium caudata* (Ciliata), *Peridinium willei* (Dinophyta), *Plasmodium falciparum* (Apicomplexa) pour les Alveolata; *Plasmopara viticola* pour les Heteronkonta; *Cercomonas gigantea* (Cercozoa), *Alievium superbum* (Radiolara), *Bolivina subaenariensis* (Foraminifera) pour les Rhizaria; *Hemilania huxleyi* pour les Haptophyta; *Coleochaete scutata* (Chloroplastida), *Compsopogon sp.* (Rhodophyta), *Glaucocystis nostochinearum* (Glaucophyta) pour les Plantae. (modifié d'après Cavalier-Smith, Burki et al. 2007 et Lopéz-Garcia et Moreira, 2008).

- Les Opisthokonta sont composés d'organismes hétérotrophes, qu'ils soient unicellulaires ou pluricellulaires. On y retrouve deux groupes taxonomiques importants, celui des eumycètes (ou champignons) et des métazoaires. Les opisthocontes ont en commun un caractère ancestral, un flagelle unique postérieur.
- Les Amoebozoa sont, pour la plupart, unicellulaires. Ils sont souvent rencontrés dans les sols et les milieux aquatiques comme *Dictyostelium discoideum* (Annesley et Fisher, 2009), un Mycetozoa. On retrouve aussi certains organismes pathogène tel *Entamoeba histolytica* (Lejeune et al., 2009), un Archamoebae parasite de l'homme. Les Amoebozoa ont une forme amiboïde (Adl *et al.*, 2005 ; Minge et al., 2009).

#### I.3.1.2. Les Bicontes :

Les bicontes comprennent les Plantae, les Rhizaria, les Haptophytes, les Cryptophytes, les Heterokonta et les Alvéolaires.

- Les Excavata sont des organismes unicellulaires hétérotrophes et généralement flagellés. C'est un groupe monophylétique (Hampl *et al.*, 2009) qui contient, notamment, un embranchement bien étudié, celui des Euglenozoa. En effet, ce dernier est composé d'organismes uni- ou bi-flagellés dont beaucoup sont des parasites tels *Trypanosoma brucei*, l'agent responsable de la maladie du sommeil (Ralston *et al.*, 2009), ou *Leishmania sp.*, agent causal de la leishmaniose (Oliveira et al., 2009).
- Les Heterokonta sont caractérisés par l'existence, au cours de leur cycle, d'une cellule biflagellée avec deux flagelles différents : un flagelle court et lisse et un flagelle plumeux (Adl et al., 2005). On retrouve dans ce phylum, par exemple, des parasites comme *Plasmopara viticola*, l'agent causal du mildiou de la vigne (Kennelly et al., 2007), des algues unicellulaires comme les diatomées (Round et al., 2007) ou multicellulaires comme les *Xanthophyceae sp.* (algues brunes).
- Les Alveolata ont en commun la présence de vésicules sous-membranaires, les *alvéoles*, pouvant servir de réservoir calcique ou contenir des plaques de cellulose, constituant la thèque chez les dinophytes. Le groupe des Alvéolobiontes rassemble les Ciliés (ou Ciliata), les Dinophytes et les Apicomplexes.
  - Les Ciliata sont des unicellulaires aquatiques. Ils possèdent une ciliature abondante qui est utilisée pour le déplacement et la nutrition. Un représentant très étudié de ce

groupe est *Paramecium caudatum*. La plupart des ciliés présentent la particularité d'avoir un appareil nucléaire bipartite : un (ou plusieurs) petit noyau, le micronucleus, et un gros noyau, le macronucleus. Le premier assure les fonctions sexuelles indispensables pour engendrer des variations génétiques alors que le second dirige les fonctions trophiques quotidiennes et la multiplication asexuée (Tanaka et Watanabe, 2003).

- o Les Dinophyta sont des organismes unicellulaires aquatiques. Malgré l'origine photosynthétique de ce groupe, 50% environ des dinophytes sont hétérotrophes (Sanchez-Puerta et al., 2007). On retrouve dans ce groupe deux flagelles inégaux qui entraînant un mouvement de nage rotatoire spécifique.
  - o Les Apicomplexes : Ces micro-organismes, unicellulaires, sont pour la grande majorité des parasites de métazoaire. On y trouve un complexe apical formé d'organelles spécialisées donnant le nom à ce groupe. Ce complexe permet au parasite de pénétrer dans l'hôte. Ils ne possèdent pas de flagelle sauf à certains moments du cycle vital faisant généralement intervenir plusieurs hôtes. *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme (Carucci, 2001); *Toxoplasma gondii* causant la toxoplasmose (Innes, 2010) font notamment partie de ce phylum.
- Le terme Rhizaria a été proposé par Cavalier-Smith (2002). C'est un groupe hétérogène de protistes, dont la majorité prend une forme de pseudopode ou amiboïde, mais on retrouve aussi des lignées parasitaires et quelques flagellés. L'existence de ce super-groupe est basée sur plusieurs études phylogénétiques (Bhattacharya et al. 1995), (Cavalier-Smith et Chao, 1997) et des analyses de constituants cellulaires telle l'actine (Keeling 2001, Nikolaev et al. 2004) ou la polyubiquitine (Archibald et al. 2003). On subdivise les Rhizaria en Radiolaires, Foraminifères et Cercozoaires (Pawlowski et Burki, 2009).
    - o Les Radiolaria : Ils font partie du zooplancton. Ils se caractérisent par la présence d'une capsule centrale séparant physiquement un ectoplasme d'un endoplasme (Ogane et al., 2009).
    - o Les Foraminifera : Ils ont un mode de vie benthique (sur et dans le sédiment) ou planctonique. Ils sont de formes amiboïdes et la plupart se construisent aussi des tests (appelées souvent à tort coquille) qui permettent une

classification des foraminifères selon leur composition (organique, agglutinés, carbonatés ou siliceux) (Pawlowski et Holzmann, 2002).

- o Les Cercozoa : Les Cercozoaires sont un groupe comprenant la plupart des protozoaires amiboïdes ou flagellés qui se nourrissent par filopode (pseudopode filamenteux). La plupart sont hétérotrophes. Certains sont devenus photosynthétiques par assimilation d'une algue verte (Archibald, 2005).
- Les Plantae : C'est le groupe d'eucaryotes dans lequel la photosynthèse est apparue en premier, de fait, les Plantae sont souvent appelées Archaeplastida (Adl *et al.*, 2005). Tous les membres de ce groupe, Toutes les espèces de ce groupe, à l'exception de quelques lignées mineures (parasites ou hétérotrophes), sont photosynthétiques et ont acquis leurs plastes par endosymbiose primaire. Les plastes de ce groupe sont monophylétiques (Reyes-Prieto *et al.*, 2007). Ce groupe est divisé en 3 sous-groupes, celui des chloroplastides, celui des glaucophytes et celui des rhodophytes.
  - o Les Chloroplastidae regroupent les plantes terrestres et la plupart des algues vertes. Ils sont composés d'organismes uni et multicellulaires.
  - o Les Glaucophyta sont des organismes unicellulaires de forme variable. Ils possèdent des chloroplastes de couleur bleu-vert comportant des pigments accessoires contenus dans les phycobilisomes : la phycocyanine et l'allophycocyanine.
  - o Les Rhodophyta, appelés plus communément les algues rouges, sont pour la plupart des organismes multicellulaires marins. Les Rhodophytes contiennent des pigments rencontrés chez les autres végétaux, la chlorophylle *a* et des caroténoïdes, on retrouve aussi des phycobilisomes contenant, à l'instar des glaucophytes, de l'allophycocyanine (couleur bleue), de la phycocyanine (bleu) et de la phycoérythrine (rouge).
- Les Haptophyta sont un groupe d'algues unicellulaires. Les pigments principaux sont les chlorophylles *a* et *c* mais aussi des xanthophylles comme la fucoxanthine.



- Cryptophyta se rencontrent dans tous les types de milieux aquatiques. Certaines espèces sont des parasites intestinaux de métazoaires, d'autres sont endosymbiontes de dinophytes, d'autres encore vivent symbiotiquement dans l'ectoplasme des Radiolaires.

### I.3.2. De la génétique à la génomique .... :

Depuis la fin des années 1990, la biologie et la médecine subissent une véritable révolution basée sur une détermination toujours plus rapide de séquences d'ADN, ainsi que le séquençage d'un nombre croissant de génomes (Fields et al., 1999).

Le terme génome a été utilisé pour la première fois par H. Winkler en 1920 et se réfère au jeu complet de gènes et de chromosomes d'un organisme (Hieter et Boguski, 1997).

Au fil des années, nous avons assisté à un essor de nouvelles technologies et de nouvelles disciplines scientifiques.

Le terme de «génomique» a été créé en 1986 par Thomas Roderick pour décrire la discipline scientifique consistant à cartographier, séquencer et analyser les génomes (McKusick, 1997).

L'analyse des génomes est maintenant divisée en « génomique structurale » et « génomique fonctionnelle ».

- La génomique structurale représente la phase initiale de l'analyse d'un génome et a une limite claire : la construction, pour un organisme donné, de cartes génétiques, physiques et de transcrits de haute résolution. L'ultime carte physique d'un organisme étant sa séquence nucléotidique complète.
- La génomique fonctionnelle est une nouvelle étape de l'analyse des génomes. Cette étape a trait au développement et à l'application d'approches expérimentales globales (à l'échelle du génome ou du système) pour établir la ou les fonctions des gènes en utilisant les informations et les moyens fournis par la génomique structurale. Elle est caractérisée par une forte capacité de traitement où des méthodologies à grande échelle sont combinées à des analyses statistiques et informatiques des données (Hieter et Boguski, 1997). La génomique fonctionnelle doit permettre d'élucider la fonction des gènes séquencés.

De nombreuses études utilisant des techniques globales comme la génomique ou la protéomique et menées en laboratoire chez des modèles procaryotes, tel *Escherichia coli* (Isarankura-Na-Ayudhya et al., 2009; Wang et Crowley, 2005), ou eucaryotes comme *Saccharomyces cerevisiae* (Vido et al., 2001) ont permis de mettre en évidence les mécanismes majeurs impliqués dans la toxicité due à différents métaux lourds et de les transposer à d'autres organismes.

Les progrès récents en écologie moléculaire microbienne ont conduit à identifier de nombreuses nouvelles espèces de microorganismes dont les conditions correctes de culture n'ont pas encore été découvertes (Hugenholtz et Pace, 1996; Nesbø et al., 2005; Rappe et Giovannoni, 2003; Strous et al., 2006; Tyson et al., 2004).

Parmi ces microorganismes, on retrouve des eucaryotes (Amaral-Zettler et al., 2002) qui peuvent parfois constituer une fraction très importante de la biomasse microbienne des sols (Högberg et Högberg, 2002). L'étendue de la biodiversité des microorganismes colonisant les milieux naturels est révélée par l'extraction des acides nucléiques (ADN et/ou ARN) d'échantillons environnementaux couplée à l'analyse de séquences conservées, comme les ADN ribosomiques, amplifiées par PCR. Toutefois, en se focalisant sur l'analyse des gènes codant les ARN ribosomiques, la plupart de ces approches moléculaires demeurent très descriptives et n'abordent que très peu les aspects fonctionnels des communautés microbiennes étudiées.

### I.3.3. à la métagénomique ... :

Considérant que le génome est la collection de toutes les informations génétiques d'un organisme (Pfeiler et Klaenhammer, 2007), le métagénome est donc la collecte de toutes les informations génétiques de l'ensemble d'un écosystème donné (Grzymski et al., 2008)

Le concept de métagénomique est apparu il y a quelques années (Rondon et al., 2000). Le métagénome pouvant être défini comme la somme des génomes des différents microorganismes cohabitant dans un même échantillon environnemental. L'ADN total isolé de l'environnement est cloné sous forme de fragments dans un vecteur d'expression pour constituer une banque d'ADN métagénomique. L'exploitation de ces banques permet une analyse de la biodiversité taxonomique et fonctionnelle des communautés par l'étude combinée des gènes ribosomiques et de gènes impliqués dans des fonctions précises (Courtois

et al., 2003). Un autre grand intérêt des banques d'ADN métagénomique réside dans l'expression potentielle des gènes extraits de la métapopulation formée à plus de 99% de microorganismes réfractaires à la culture *in vitro*.

Ces bibliothèques sont générées à des fins différentes englobant la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Le métagénome est considéré comme un vrai trésor de nouvelles enzymes (Voget et al., 2003; Yun et al., 2004).

A partir d'une banque d'ADN métagénomique, deux types d'analyses peuvent être effectuées : une basée sur les séquences et l'autre sur la fonction des organismes la composant.

#### I.3.3.1. Analyse des séquences du métagénome :

Cette approche requiert des amorces particulières pouvant s'hybrider aux régions conservées de gènes connus. L'application de ceci est donc limitée à l'identification de nouveaux membres de familles connues comme par exemple des gènes codant pour l'ARNr 16S (Rondon et al., 2000) ou pour des enzymes ayant des domaines très conservés (Courtois et al., 2003).

Une autre approche a été suivie, le séquençage aléatoire de banques, il faut toutefois tenir compte de la puissance de séquençage et d'assemblage que cette voie nécessite. On peut citer la technologie de la « puce à ADN » qui a été notamment utilisée pour étudier l'effet d'un sol pollué sur l'expression des gènes d'*A.thaliana* (Magrini et al., 2009) ou l'effet de divers contaminants sur la diversité des microorganismes des eaux souterraines (Waldron et al. 2009). Cependant Zhou et Thompson (2002) décrivent cette technologie comme étant 100 à 10000 fois moins sensible que la PCR, la rendant inappropriée à l'analyse de séquences peu abondantes dans un milieu donné.

#### I.3.3.2. Analyse des fonctions du métagénome :

La banque est criblée à la recherche d'un phénotype particulier, par exemple la production d'un antibiotique, la tolérance à un stress donné, une activité spécifique d'enzymes ...

Cette stratégie est idéale pour identifier de nouvelles classes de gènes codant pour des fonctions connues ou non. Elle fut notamment utilisée lors de l'étude de nouvelles protéines

de résistance au nickel (Mirete et al., 2007) ou la découverte de nouveaux moyens de résistance aux antibiotiques mis en place par des microorganismes (Diaz-Torres et al., 2003)

Les micro-organismes eucaryotes (champignons, « protistes », ...) jouent un rôle essentiel dans la vie et la fertilité des sols en tant que décomposeurs de la matière organique, symbiontes ou pathogènes des macroorganismes végétaux ou animaux, prédateurs régulant les populations bactériennes ...Néanmoins peu de données d'études globales sur les eucaryotes sont disponibles à ce jour. Cependant, les approches utilisées avec succès pour l'étude de microorganismes procaryotes de l'environnement terrestre (Leininger et al., 2006; Urich et al., 2008) ou marins (Frias-Lopez et al., 2008; Gilbert et al., 2008; Poretsky et al., 2009) semblent peu appropriées à l'étude des eucaryotes. Ceci peut-être du au fait qu'ils étaient minoritaires dans les écosystèmes étudiés ou qu'ils ont été exclus physiquement avant l'extraction de l'ADN.

L'étude de métagénomes eucaryotes est confrontée à plusieurs obstacles.

#### I.3.3.2.1. La taille du génome eucaryote :

Les génomes eucaryotes ont une densité de gènes bien plus faible et des tailles très supérieures à celles des génomes procaryotes. Ainsi peut-on observer des tailles allant de 13.8 Mpb pour la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Wood et al., 2002), avec une estimation de 4800 gènes codant des protéines, à 69 Mpb pour la paramécie ciliée *Paramecium tetraurelia* (Aury et al., 2006), avec une estimation de 39 600 protéines putatives.

En conséquence, il est très difficile de créer une banque métagénomique (donc une banque d'ADN génomique) contenant une fraction importante des gènes contenus d'une communauté microbienne eucaryote.

#### I.3.3.2.2. La présence fréquente d'introns :

De plus, la présence d'introns dans de nombreux gènes eucaryotes et la non conservation de la machinerie de transcription entre eu- et procaryotes n'autorisent pas un criblage direct des clones bactériens recombinants pour la production de métabolites ou d'enzymes d'origine eucaryote.

#### I.3.3.2.3. Des problèmes techniques :

Il n'existe pas de protocoles permettant une séparation facile des cellules eucaryotes de celles des bactéries. Ainsi, une banque métagénomique issue d'un milieu complexe, tel le sol, comprendrait de l'ADN eucaryote mais aussi, nécessairement, des séquences procaryotes.

#### I.3.4. ... à la métatranscriptomique :

##### I.3.4.1. Généralités :

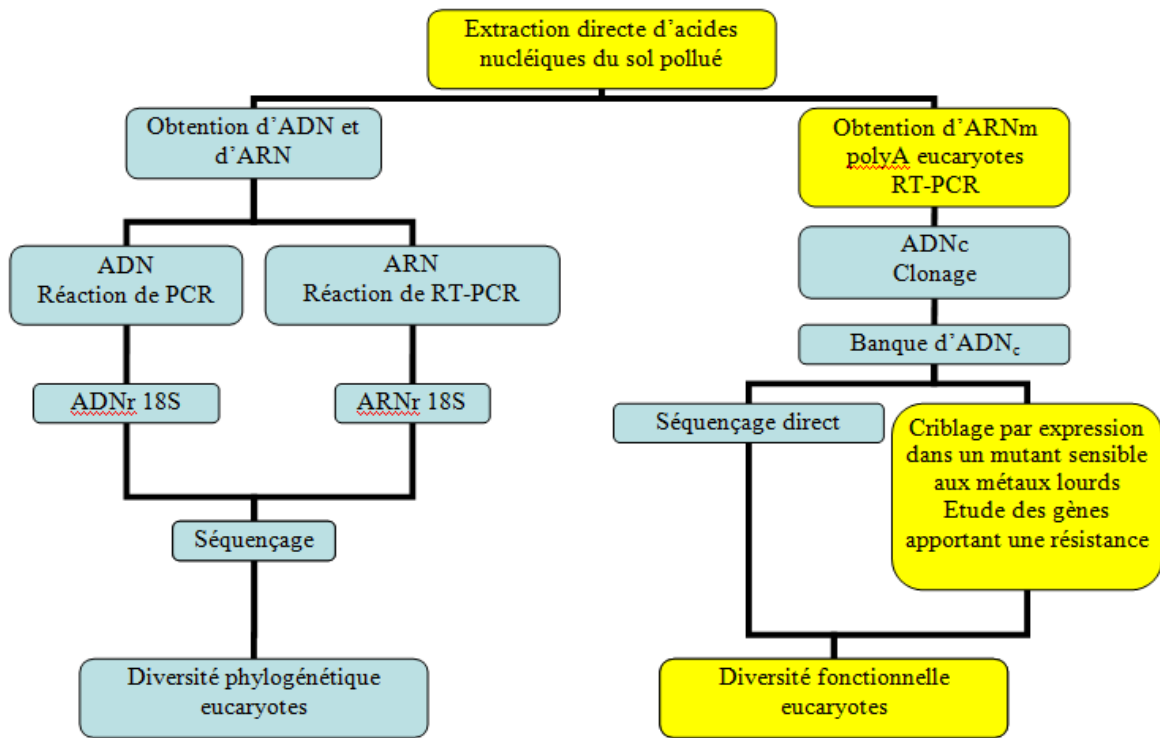
Pour palier aux problèmes suscités, il a été suggéré de travailler sur les « ARN environnementaux » (Grant et al., 2006) lors des études des microorganismes eucaryotes. Le transcriptome peut être décrit comme l'ensemble des gènes d'un organisme qui sont exprimés dans les conditions indiquées au moment de l'échantillonnage (Hegde et al. 2003; Velculescu et al., 1997; Wang et al., 2009); par extension, le métatranscriptome peut être considéré comme l'ensemble de tous les gènes exprimés par un ensemble d'organismes d'un écosystème donné dans les conditions indiquées au moment de l'échantillonnage. L'étude du métatranscriptome, la métatranscriptomique, est donc un outil puissant permettant d'appréhender le caractère essentiel de certains gènes pour la survie dans certaines conditions particulières.

Grâce à leur queue poly-A (jusqu'à 30 résidus), les ARN messagers eucaryotes peuvent, en effet, être isolés spécifiquement à partir d'un mélange complexe d'ARN et convertis en ADNc. Ce dernier peut être cloné pour générer des banques environnementales d'ADNc ou banques métatranscriptomiques d'ADNc (Bailly et al., 2007). Ces banques sont représentatives de la fraction exprimée des gènes codant pour des protéines au moment de l'échantillonnage.

Grant et al. (2006) ont utilisé une première fois cette stratégie en utilisant l'ARN extrait de l'eau de sources chaudes et de boues activées alors que Todaka et al. (2007) ont fait de même à partir d'une communauté symbiotique de protistes de l'intestin de termites.

##### I.3.4.2. Le projet EUMETATOX :

Cette thèse s'inscrit, pour la partie « métatranscriptomique », dans le projet EUMETATOX. Ce projet est coordonné par Roland MARMEISSE, chargé de recherches au CNRS et localisé à l'Université de Lyon 1.



**Figure 20 :** Organigramme représentant le principe général du projet. Les deux parties du projet y sont représentées, l'étude de la diversité phylogénétique eucaryote d'une part et l'étude de la diversité fonctionnelle des eucaryotes de notre banque d'autre part. Les parties en jaune sont celles qui ont été réalisés, au moins en partie, à Nancy

EUMETATOX a pour objectif de révéler les mécanismes d'adaptation à des métaux lourds, notamment le zinc et le cadmium, mis en place par les différents microorganismes eucaryotes présents dans un sol donné.

Une approche originale de génomique environnementale, la métatranscriptomique, a été mise en place. Cette approche, schématisée sur la figure 19, est basée sur l'extraction directe des ARN de sols pollués ou non et la conversion des ARN messagers eucaryotes en ADNc qui sont clonés dans un vecteur d'expression de levure pour constituer des banques d'ADNc environnementales. Celles-ci sont criblées par complémentation fonctionnelle de mutants de levure sensibles aux métaux lourds. L'analyse fonctionnelle des gènes ainsi sélectionnés devrait nous renseigner sur les mécanismes d'adaptation mis en place.

Ce projet s'appuyait en parallèle sur un programme du Genoscope accepté en 2006 visant à séquencer de façon systématique les inserts des banques afin d'obtenir une vision globale des activités physiologiques exprimées par l'ensemble des organismes eucaryotes du sol.

Deux laboratoires français participent à ce projet: l'UMR CNRS-Université Lyon 1 d'Ecologie Microbienne et l'UMR 1136 INRA/Nancy-Université Interactions arbres-microorganismes. Deux partenaires étrangers sont aussi associés : l'Université de Hasselt notamment pour le choix des lieux de prélèvements et les facilités de prélèvement et de l'Université de Parme pour son expertise sur les mutants de levure.

## Chapitre II :

### Matériels et Méthodes

---





**Figure 20 :** Carte de la province du Limbourg en Belgique où se situent les sites de prélèvements (zoom) ainsi que la ville de référence (Lommel).

**Tableau VII :** Analyses physico-chimiques des sols de Paal, Lommel et Balen prélevés en novembre 2006 et juin 2008. MO : Matière Organique.

| Site   | pH   | Pourcentage humidité | MO (g.kg <sup>-1</sup> ) |
|--------|------|----------------------|--------------------------|
| Paal   | 4,68 | 4,8                  | 4,9                      |
| Lommel | 4,66 | 4                    | 15,8                     |
| Balen  | 5,79 | 8,7                  | 30,9                     |

## II.1 Les sites d'étude :

Les sites d'études de Lommel, Paal, Overpelt et Balen sont situés dans la Province du Limburg et d'Anvers (en Campine, région du nord-est de la Belgique) dans un périmètre d'environ 60 km (figure 21). Le sol des sites étudié est sableux, et on y trouve des valeurs différentes de pH, d'humidité et de taux de matière organique (Tableau VII). Ces paramètres sont globalement plus élevés pour le site de Balen, sur lequel une végétation plus importante a été observée.

Suite à l'activité de quatre zingueries, le sol a été contaminé sur plus de 280 km<sup>2</sup> par des éléments traces métalliques ; ainsi trouve-t-on sur environ 70 km<sup>2</sup> des parcelles de sol contenant plus de 3 mg/kg de cadmium.

Dans certains emplacements de prélèvements, on observe aujourd'hui une zone nue, quasi désertique, où la végétation naturelle a disparue sur de grandes surfaces. À l'origine, ceux-ci faisaient parti d'un paysage de landes, dominé par une végétation de callunes et de bouleaux développés sur des sols pauvres, assez acide, sableux, typique de la région.

A Lommel, une fonderie a fonctionné entre 1904 et 1974. Le zinc a été produit par un procédé pyrométallurgique, méthode émettant dans l'atmosphère de très fortes émissions de zinc et d'autres métaux associés, tels que le plomb, le cuivre et le cadmium. Des déchets solides, tels que des cendres et des scories métalliques, furent également stockées sur le site. En 1974, l'usine fut fermée et démolie. Pendant ce temps, une zone sans végétation s'était développée autour des installations. Le site fut nivelé puis laissé à l'abandon. Pour notre étude, ce site sera considéré comme anciennement contaminé. En effet, la concentration actuelle de métaux dans le sol est bien inférieure à celle observée au début de ce siècle, qui, elle, était équivalente à celle observée à Balen de nos jours (Damien Blaudez, communication personnelle). On peut émettre aisément une hypothèse de « lessivage » des métaux.

Le site de Balen, situé à proximité de la plus grande fonderie de zinc européenne toujours en activité, présente des concentrations totales, disponibles et biodisponibles en zinc et en cadmium plus élevées que celles dosées sur les sites de Lommel et Paal. Des études de phytoremédiation y sont effectuées depuis une dizaine d'années (Adriaensen et al., 2004; Colpaert et al., 2000; Vangronsveld et al., 1996).

Le site de Paal est relativement éloigné de toute industrie métallurgique. Ce site ressemble à celui de Lommel.

**Tableau VIII** : Composition du milieu Pachlewski (Pachlewski et Pachlewska, 1974).

| Composé                                                           | Concentration finale dans le milieu |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Glucose                                                           | 20 g.l <sup>-1</sup>                |
| Maltose                                                           | 5 g.l <sup>-1</sup>                 |
| Tartrate d'ammonium                                               | 2,3 .l <sup>-1</sup>                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                   | 1,0 g.l <sup>-1</sup>               |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                              | 0,5 g.l <sup>-1</sup>               |
| Thiamine hydrochloride                                            | 10 µg.l <sup>-1</sup>               |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                              | 0,63 mg.l <sup>-1</sup>             |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                               | 1,54 mg.l <sup>-1</sup>             |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                              | 0,25 mg.l <sup>-1</sup>             |
| Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O | 0,05 mg.l <sup>-1</sup>             |
| Fe-EDTA                                                           | 3,44 mg.l <sup>-1</sup>             |
| pH                                                                | 5,5                                 |
| Autoclavage                                                       | 20 minutes à 120°C                  |

**Tableau IX** : Composition du milieu Luria - Bertani (LB).

| Composé           | Concentration dans le milieu |
|-------------------|------------------------------|
| Bacto-Tryptone    | 10 g.l <sup>-1</sup>         |
| Extrait de levure | 5 g.l <sup>-1</sup>          |
| NaCl              | 10 g.l <sup>-1</sup>         |
| Agar              | 20 g.l <sup>-1</sup>         |
| Autoclavage       | 20 minutes à 120°C           |
| Ampicilline       | 100 µg.ml <sup>-1</sup>      |

Aujourd'hui, plus de 30 ans après l'arrêt des activités industrielles, les horizons supérieurs des sols sont toujours fortement contaminés par des métaux non ferreux.

Lors d'études dans les années 2000, les teneurs totales les plus fortes avaient tendance à se trouver entre 20 cm et 40 cm de profondeur. Néanmoins, Le cuivre et le plomb sont à leur maximum dans la partie la plus superficielle du sol alors que des pics de cadmium sont observés plus profondément : entre 20 et 40 cm voire même entre 40 et 60 cm. Les données de profondeur montrent une forte diminution de la pollution métallique vers les couches les plus profondes : à 1,5 à 2 m de profondeur, les concentrations tendent à revenir à des valeurs normales (Baize, 2002).

## II.2. Matériels biologiques :

### II.2.1. Isolats fongiques et conditions de culture :

Dans cette étude, l'isolat utilisé est la souche dicaryotique S238N du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* provenant d'une fructification récoltée en 1976 sous un conifère, *Tsuga mertensiana*, dans le parc national de Crater Lake aux Etats-Unis (Oregon). Les isolats fongiques utilisés sont la souche américaine dicaryotique S238N de *Laccaria bicolor*, la souche monocaryotique S238N-H82 (Di Battista et al. 1996). C'est un Basidiomycète qui appartient à l'ordre des Tricholomatacées, famille des Agaricales.

L'entretien des souches de *Laccaria bicolor* est assuré par repiquages successifs à partir des souches mères conservées à 25°C et à l'obscurité. Ces dernières sont cultivées pendant 10 jours sur milieux de Pachlewski gélosé (Pachlewski et Pachlewska, 1974). La composition de ce milieu est donnée dans le tableau VIII.

Pour les expériences nécessitant de transférer les colonies fongiques sur d'autres milieux nutritifs, des disques de cellophane préalablement traités à l'EDTA (10 mM) à 100°C pendant 20 minutes, rincés et autoclavés, sont ajoutés dans les boîtes de Pétri. L'inoculum est déposé sur la feuille de cellophane.

**Tableau X :** Génotype des souches de levure utilisées :

| Souches                                | Génotype                                                                                                              | Référence        |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>BY4741</b>                          | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0                     | Euroscarf Y00000 |
| <b><i>zrc1</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ZRC1::kanMX4</i> | Euroscarf Y00829 |
| <b><i>cot1</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>COT1::kanMX4</i> | Euroscarf Y01613 |
| <b><i>ycf1</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>YCF1::kanMX4</i> | Euroscarf Y04069 |
| <b><i>pmr1</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>PMR1::kanMX4</i> | Euroscarf Y04534 |
| <b><i>smf1</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>SMF1::kanMX4</i> | Euroscarf Y06272 |
| <b><i>cup2</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>CUP2::kanMX4</i> | Euroscarf Y04533 |
| <b><i>ccc1</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>CCC1::kanMX4</i> | Euroscarf Y04169 |
| <b><i>yap1</i> <math>\Delta</math></b> | MATa <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>YAP1::kanMX4</i> | Euroscarf Y00569 |

**Tableau XI :** Composition du milieu YPD.

| Composé           | Concentration finale dans le milieu |
|-------------------|-------------------------------------|
| Bacto-Tryptone    | 20 g.l <sup>-1</sup>                |
| Extrait de levure | 10 g.l <sup>-1</sup>                |
| Glucose           | 20 g.l <sup>-1</sup>                |
| Agar              | 20 g.l <sup>-1</sup>                |
| Autoclavage       | 20 minutes à 120°C                  |

**Tableau XII :** Composition du milieu synthétique sans uracile (SD-URA).

| Composé                                                                          | Concentration finale dans le milieu |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| YNB (Yeast Nitrogen base) sans acide aminés et sans NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | 1,7 g.l <sup>-1</sup>               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                  | 5 g.l <sup>-1</sup>                 |
| Synthetic Drop-out without uracile (Sigma)                                       | 1,98 g.l <sup>-1</sup>              |
| glucose ou galactose                                                             | 20 g.l <sup>-1</sup>                |
| Agar                                                                             | 20 g.l <sup>-1</sup>                |
| pH                                                                               | Ajusté à 5,8                        |
| Autoclave                                                                        | 20 minutes à 120°C                  |

### II.2.2. Souche bactérienne d'*Escherichia coli* et conditions de culture :

La souche DH5 $\alpha$  d'*Escherichia coli* (*supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80LacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA 1 end A1 gyr A96 thi1relA1*) a été utilisée pour les étapes de clonage et de multiplication du plasmide. Elle est également conservée au laboratoire à -80°C. Cette souche est cultivée sur milieu Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al, 1989) (Tableau IX). Son taux de transformation est élevé. Elle permettra la synthèse d'un grand nombre de copies des plasmides. Les transformants obtenus lors des expérimentations sont conservés par repiquage sur milieu LB+Ampicilline (LB+Amp) (Tableau IX). L'ampicilline étant le marqueur de sélection de la présence des plasmides utilisés dans cette étude.

### II.2.3 Souches de *Saccharomyces cerevisiae* et conditions de culture :

Les souches de levures déficientes utilisées sont des mutants de *S. cerevisiae*. Elles sont conservées au laboratoire à -70°C. Leur génotype est présenté dans le tableau X.

Les différentes souches de *S. cerevisiae* déficientes en transporteur sont réactivées sur milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose) gélosé.

La composition du milieu YPD est présentée dans le tableau XI. En fonction de la souche de levure déficiente utilisée, le milieu de culture présentant des conditions de restriction n'est pas le même. En effet, on ajoute au milieu utilisé (milieu minimum synthétique, tableau XII), des agents de sélection (métal à la concentration désirée et/ou chélateur de métaux) suivant l'expérience envisagée.

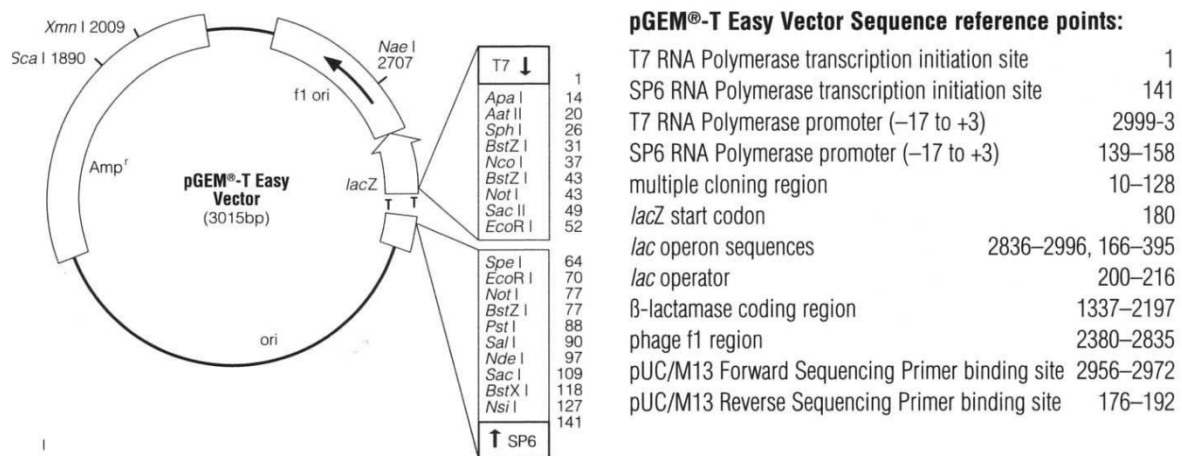
Les cultures sont réalisées en aérobiose, à 30°C. Toutes les expériences nécessitant une culture liquide ont été effectuées sur des cellules en phase exponentielle de croissance.

On remplace le glucose par du galactose dans les cultures de levure transformées à l'aide du plasmide pYES2 quand on veut activer la transcription de l'insert car celle-ci est sous le contrôle du promoteur pGAL1 qui est induit par le galactose et réprimée par le glucose.

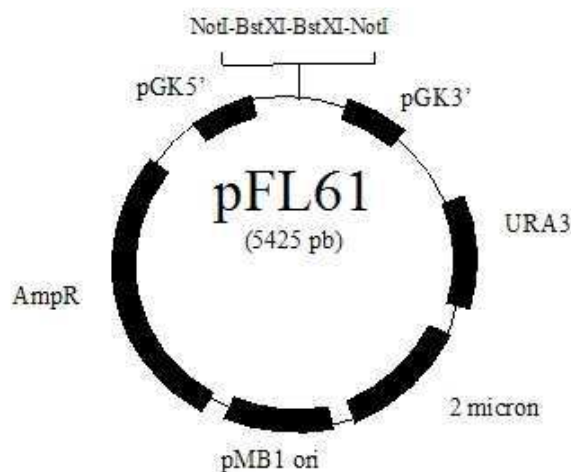
### II.2.4. Plasmides utilisés :

#### II.2.4.1. Plasmide d'*E. coli* :

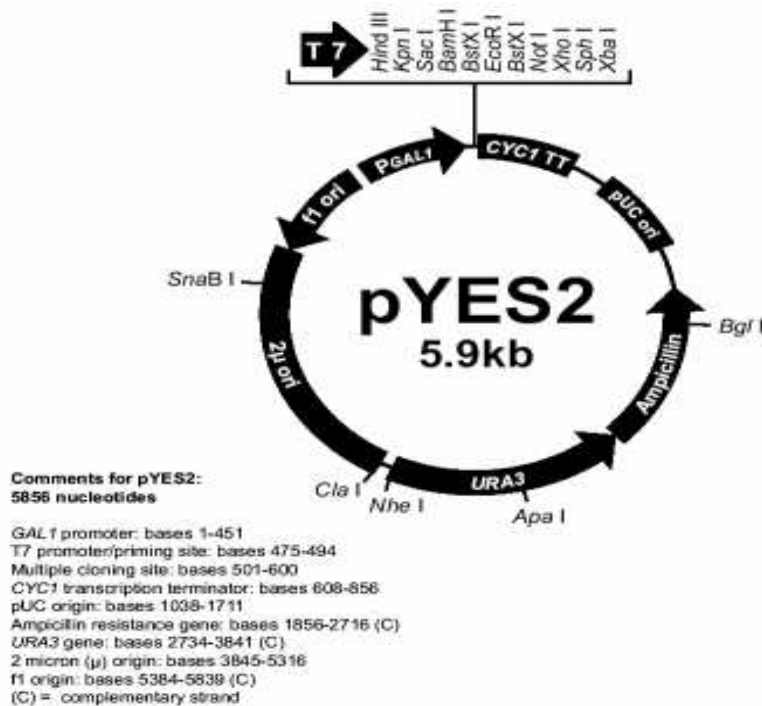
Le plasmide pGEM<sup>®</sup>-T easy (3015 pb) (Promega) possède le gène de résistance à l'ampicilline et un multisite de clonage localisé dans le gène lacZ (figure 22). Il a été utilisé pour le clonage de produits d'amplification par PCR dans *E. coli*.



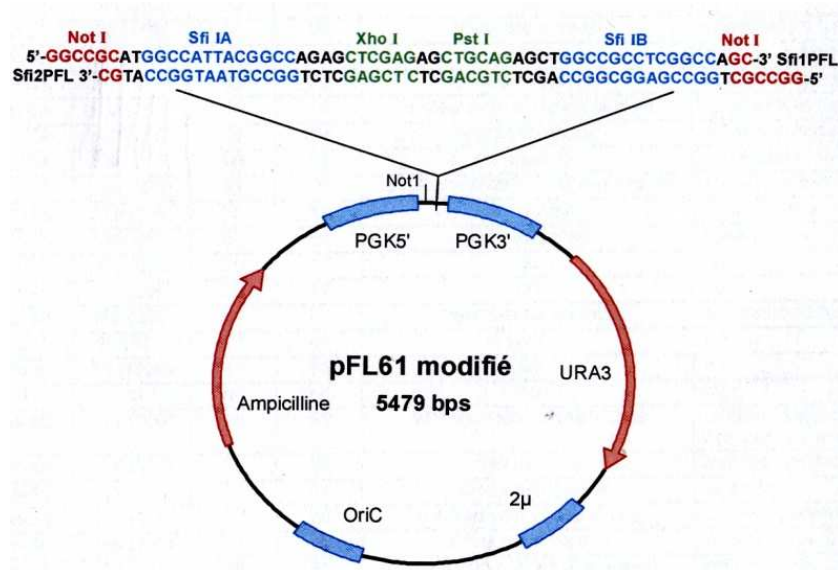
**Figure 22 :** Carte de restriction du vecteur pGEMT-T Easy (promega). Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline et un multisite de clonage localisé dans le gène *lacZ*.



**Figure 23 :** Carte de restriction du vecteur pFL61. Ce plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline et deux sites de clonages (NotI et BstXI) en aval du promoteur de la phosphoglycérokinase de *S. cerevisiae*. La cassette de clonage est entourée par deux régions, L2 et R2. Ce plasmide est pourvu du gène marqueur *URA3*.



**Figure 24 :** Carte de restriction du vecteur pYES2 (invitrogen) Le promoteur pGAL1 de levure, en amont du site de clonage, est induit par le galactose et réprimé par le glucose. Ce plasmide porte le gène marqueur d'auxotrophie URA3 et le gène de résistance à l'ampicilline



**Figure 25 :** Carte du vecteur pFL61 modifié utilisé pour le clonage des inserts de la banque d'ADNc lors des études de métatranscriptomique (Lehembre, 2009). Ce plasmide est modifié par insertion des séquences hybrides Sfi2PFL/Sfi1PFL dans la région *Not I*, permettant l'insertion des deux sites de restrictions Sfi IA et Sfi IB. Ces sites de restrictions serviront à l'insertion orientée des ADNc. Il contient également les origines de réplcation Ori C et 2 $\mu$ , ainsi qu'un promoteur fort PGK. Le gène de résistance à l'ampicilline et celui permettant la synthèse d'uracile serviront de marqueurs de sélection en système bactérien et levure, respectivement.



Ce plasmide linéaire possède une base thymidine à chacune de ses extrémités 3'OH, permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits de PCR obtenus avec l'ADN polymérase Advantage 2 (Clontech). Celle-ci rajoute en effet une molécule de dATP avec extrémités 3'OH des fragments d'ADN qu'elle génère. Les amorces SP6 et T7 encadrent la cassette de clonage et permettent l'amplification du fragment d'ADN cloné dans ce vecteur pour vérifier son insertion.

#### II.2.4.2. Plasmides navettes *S. cerevisiae* - *E. coli*

##### II.2.4.2.1. pFL61 : figure 23

Le plasmide pFL61 (5425 pb) possède le gène de résistance à l'ampicilline et deux sites de clonages (NotI et BstXI) en aval du promoteur de la phosphoglycérokinase de *S. cerevisiae*. Les régions L2 et R2 encadrent la cassette de clonage. A l'aide d'amorces spécifiques L2 et R2, il est alors possible d'amplifier le fragment cloné dans ce vecteur pour vérifier à la fois sa présence et/ou son orientation. Ce plasmide est pourvu du gène marqueur *URA3*. Ce plasmide a été utilisé pour exprimer les gènes étudiés dans la levure.

##### II.2.4.2.2. pYES2 : figure 24

Le plasmide pYES2 (5900 pb) (Invitrogen) est un vecteur navette *Escherichia coli*-*Saccharomyces cerevisiae* contenant les origines de réplication pUC ori (pour les bactéries) et 2μ (pour les levures). Le promoteur pGAL1 de levure, en amont du site de clonage (figure 30), est induit par le galactose et réprimé par le glucose. Ce plasmide porte le gène marqueur d'auxotrophie *ura3* et le gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide pYES2 contenant le gène codant la « green fluorescent protein » (GFP) inséré au niveau du site *XbaI* (pYES2-GFP) est utilisé dans les expériences de localisation des protéines d'intérêt chez la levure.

##### II.2.4.3. Plasmide de la banque de métatranscriptomique : figure 25

Les banques d'ADNc environnementales utilisées ont été fournies par l'équipe d'écologie microbienne de Roland MARMEISSE (Université Lyon 1). Elles ont été construites à partir d'ARN messagers rétrotranscrits issus de sols des sites de Lommel, Paal et Balen en Belgique. Les ARNm polyadénylés eucaryotes ont été extraits et purifiés par affinité sur billes magnétiques recouvertes d'oligo-(dT) à partir des ARN totaux du sol. Ces ARNm ont ensuite été retro-transcrits, puis amplifiés, pour fournir des ADNc. Ils sont bordés par les sites de

restrictions *Sfi* IA et *Sfi* IB, permettant leur clonage dans le vecteur d'expression pFL61 modifié. Les ADN<sub>c</sub> de taille inférieure à 400 pb sont éliminés.

Le plasmide utilisé pour les tests de complémentation fonctionnelle chez la levure est pFL61 modifié (Lehembre, 2009) (Figure 25). Il s'agit d'un plasmide navette de 5,478 kb possédant un gène de résistance à l'ampicilline pour sa sélection chez *E. coli* et le gène *ura3* pour sa sélection chez *S. cerevisiae*. Il contient les origines de répllication OriC pour la propagation dans l'hôte bactérien et l'origine de répllication 2μ pour la propagation chez la levure, ainsi qu'un promoteur constitutif fort PGK. Il contient également les sites de restrictions *Sfi* IA et *Sfi* IB permettant l'insertion des ADN<sub>c</sub> par ligation en aval du promoteur dans le site *Not* I. Il est de type répllicatif et à grand nombre de copies.

## II.3. Méthodes :

### II.3.1. Techniques d'extraction et d'analyse des acides nucléiques :

#### II.3.1.1. Extraction de l'ADN plasmidique d'*E. coli* :

La colonie bactérienne est mise en culture sur la nuit à 37°C sous agitation, puis centrifugée 5 minutes à 3500 rpm. L'ADN plasmidique est ensuite extrait et purifié à l'aide du kit « Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System » (Promega) suivant les indications du protocole donné par le fournisseur. Les plasmides sont élués d'une colonne fixant les acides nucléiques avec 100μL d'eau sans DNase dans un microtube plastique. Leurs concentrations sont mesurées par spectrophotométrie. Une unité de DO<sub>260nm</sub> correspond à 50μg.mL<sup>-1</sup> d'ADN. La solution plasmidique est conservée à -20°C.

#### II.3.1.2. Extraction des ARN totaux de matériels fongiques :

L'extraction des ARN totaux de mycélium est réalisée à l'aide du kit "Rneasy Plant Mini Kit" (Qiagen) à partir de 50 à 100 mg de mycélium jeune (prélevé en périphérie de la colonie) congelé à -80°C et broyé à l'aide d'un broyeur à billes (MM Retsch 300, Qiagen). Les ARN obtenus sont repris dans 50 μl d'eau stérile traitée au DEPC (inhibiteur de RNase) avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 1 μg/μl. Une unité de DO à 260 nm correspondant à 40μg/ml d'ARN. La qualité et la quantité des ARN sont vérifiées sur gel d'agarose à 1% à partir d'un dépôt de 1μg. La qualité est contrôlée sur un gel d'agarose 1% où

les ARNr 28 S et 18S apparaissent comme deux bandes intenses. La bande correspondant aux ARNr 28S doit être approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARNr 18S.

Les ARN totaux de mycorhizes *Laccaria bicolor* – *Pseudotsuga menziesii* ont été extraits avec la méthode décrite précédemment, avec en plus ajout de 20 mg/ml de PEG 6000 (selon le protocole du fabricant) dans le tampon d'extraction.

Après congélation immédiate dans de l'azote liquide, les ARNs sont conservés à -80°C.

#### II.3.1.3. Extraction d'ARN de sol :

Les sols ont été broyés 3 min dans un broyeur de roche en agate préalablement congelé à -70°C. Un gramme de sol est alors placé dans un tube Eppendorf «RNase-free» de 2 mL contenant 0,5 g de billes de verre (diamètre 0,1 mm), x  $\mu$ L de solution dénaturante (guanidine isothiocyanate 4 M, Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, pH 8,0), y  $\mu$ L de tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 20 mM, NaCl 100 mM, SDS 2%, pH 9,0), 50  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 4  $\mu$ L d'ARNt de levure à 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

Le mélange est agité 5 min dans un broyeur Mikro Dismembrator U (B.Braun Biotech International) à 1600 agitations.min<sup>-1</sup>, puis centrifugé 5 min à 15000 rpm, et à 4°C.

Au surnageant est ajouté 1 mL de phénol acide (pH 5,0)/ CHCl<sub>3</sub>/ alcool isoamylique (25/24/1 : vol/vol/vol). Le mélange est agité 1 min au vortex à vitesse maximale, puis centrifugé 10 min à 15000 rpm et à 4°C. Cette procédure d'extraction est réalisée 2 fois.

Après transfert de la phase aqueuse dans un nouveau tube, 250  $\mu$ L de CHCl<sub>3</sub>/alcool isoamylique (24/1 : vol/vol) sont ajoutés et le mélange est agité manuellement, puis centrifugé 10 min à 15000 rpm à 4°C. A la phase aqueuse sont ajoutés 0,1 vol d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après une incubation de 20 à 30 min à -70°C, le mélange est centrifugé 15 min à 15000 rpm à 4°C.

Le culot d'acides nucléiques est repris dans 40  $\mu$ L d'eau «RNase-free» et 65  $\mu$ L de LiCl 4M. Après une nuit à 4°C, 10  $\mu$ L sont prélevés pour l'étude des ADN et le reste est centrifugé 15 min à 15000 rpm. Le culot est traité à la DNase I (7  $\mu$ L de DNase «RNase-free» (Fermentas) 1 U. $\mu$ L<sup>-1</sup> + 2  $\mu$ L de tampon + 11  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O «RNase-free») pendant 1h30 à 37°C. Les ARN sont précipités dans 2 volumes d'isopropanol, centrifugés 8 min à 15000 rpm et

lavés par 1 vol d'éthanol 70%. L'extrait brut d'ARN est séché sous vide puis repris dans 20 à 50 µL d'eau «RNase-free».

L'éluat obtenu est précipité par 0,1 vol d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) et 2,5 vol d'éthanol absolu, lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 20 à 50 µL d'eau «RNase-free».

#### II.3.1.4. Analyse des taux de transcrits par PCR semi-quantitative :

Pour les analyses de PCR semi-quantitative, 1 µg d'ARN totaux sont utilisés par essai de rétrotranscription. Les ARN messagers sont convertis en ADNc en utilisant le kit cMaster<sup>TM</sup> Rt Kit (Eppendorf) à l'aide d'une enzyme, la reverse transcriptase, selon les instructions du fournisseur.

Ces ADNc sont ensuite utilisés pour des réactions de PCR avec des oligonucléotides spécifiques de chacun des gènes étudiés, conçus à partir des séquences prédites. La température d'hybridation et le temps d'élongation dépendent des amorces choisies et de la taille du fragment à amplifier (la Taq polymérase Biolabs amplifie 1kb d'ADN par minute). Le nombre de cycles de PCR a été optimisé pour chaque gène et fixé entre 19 et 28 (Tableau XIII). Comme contrôle positif, un fragment d'ADNc d'un gène codant une ubiquitine est simultanément amplifié. Les résultats sont exprimés par le rapport du taux d'expression du gène d'intérêt sur celui de l'ubiquitine.

#### II.3.1.5. Analyses du taux d'expression sur une lame génome entier :

Les tissus prélevés ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et l'extraction d'ARN a été réalisée en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les préparations d'ARNs totaux ont été amplifiées en utilisant le kit SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech, Mountain View, CA, États-Unis) selon les instructions du fabricant.

Les puces « génome entier » ont été construites par NimbleGen Systems Limited (Madison, WI, USA) et utilisées pour des analyses d'expression selon Martin et al. (2008). Les niveaux d'expression moyens ont été calculés pour chaque gène d'intérêt (travaux d'Eva Lucic et Annegret Kohler, communication personnelle, Lucic et al., 2008). Les amorces à moins de six nucléotides de différence entre deux gènes ont été éliminées avant le calcul du niveau d'expression moyen (risque d'hybridation croisée). Pour estimer le signal de fond et le niveau

**Tableau XIII :** Conditions optimales d'utilisation des gènes étudiés en RT-PCR.

| Gène              | quantité (µg) | Tm | Nombre de cycles |
|-------------------|---------------|----|------------------|
| <i>LbCdfA</i>     | 1             | 55 | 26               |
| <i>LbCdfB</i>     | 1             | 55 | 26               |
| <i>LbCdfC</i>     | 1             | 55 | 28               |
| <i>LbZipA</i>     | 1             | 55 | 27               |
| <i>LbZipB</i>     | 1             | 55 | 27               |
| <i>Ubiquitine</i> | 1             | 55 | 19               |

moyen d'une expression significative, l'intensité moyenne de 30 000 sondes prises au hasard sur la puce a été calculée. Les gènes présentant une expression plus que triplée par rapport à ce niveau moyen ont été considérés comme transcrit. Les gènes dont l'expression varie d'un facteur supérieur à 3 entre deux conditions ont été considérées comme significativement différentiellement exprimés. Le jeu complet de données est disponible sous le numéro d'adhésion série (# GSE9784) sur le site du NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)).

Les niveaux d'expression mentionnés pour les mycorhizes correspondent à la valeur moyenne d'expression dans les mycorhizes de *L. bicolor* - *Pseudotsuga menziesii* (2 répétitions), de mycorhizes *L. bicolor* - *P. trichocarpa* produites en serre et *L. bicolor*-*P. tremula* × *alba* produites *in vitro*, les valeurs d'expression dans le carpophore correspondent à la valeur moyenne, sur deux répétitions, de plusieurs fructifications, enfin, l'expression dans le mycélium correspond à la moyenne des taux d'expression dans du mycélium vieux de trois semaines et pour deux répétitions.

### II.3.2. Techniques d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction) :

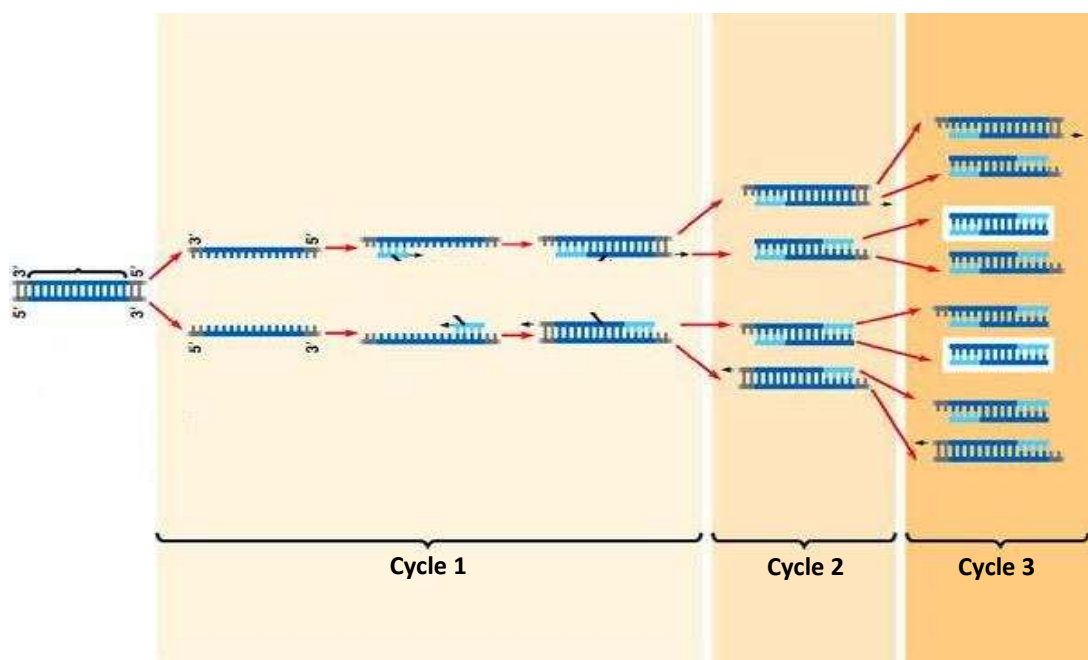
#### II.3.2.1. Généralités :

La PCR ou réaction de polymérisation en chaine est une technique d'amplification enzymatique *in vitro* (Saiki *et al*, 1985) catalysée par une ADN polymérase ADN dépendante thermostable. Elle permet l'amplification d'une séquence d'ADN à l'aide d'un couple d'amorces nucléotidiques (Figure 26).

La PCR est composée d'une succession de cycles dont chacun comprend trois phases : la dénaturation de l'ADN par la chaleur, l'hybridation des amorces à l'ADN matrice et l'élongation des brins à partir des amorces (tableau XIV). Une réaction PCR se déroule sur un nombre de cycles dépendant de l'expérimentation réalisée.

#### II.3.2.2. Les amorces nucléotidiques :

Des amorces spécifiques des vecteurs utilisés et des gènes étudiés ont été conçues, et ensuite commandées chez Invitrogen (tableau XIV). Toutes les amorces ont été créées suivant une série de critères spécifiques : un pourcentage en GC compris entre 40 et 60%, un T<sub>m</sub> compris entre 55 et 72°C, et longueur comprise entre 18 et 25 nucléotides hors rajout de site de reconnaissance pour un enzyme de restriction.



**Figure 26 :** Principe de la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) : Amplification des gènes d'intérêts grâce aux amorces préalablement définies. Une étape précédente correspond à la dénaturation initiale des brins d'ADN (94°C) où les structures secondaires sont cassées et les enzymes dénaturées, exceptée la Taq polymérase. Puis trois étapes suivent. Une étape de dénaturation de l'ADN où il y a déshybridation des brins et décrochage des polymérases. Une étape d'hybridation des amorces à température thermodynamiquement stable. Et une étape d'élongation des brins complémentaires aux ADN matrices grâce aux polymérases et aux dNTP libres. Ce cycle à trois étapes est répété X fois. Puis suit une étape d'élongation finale à 72°C.

**Tableau XIV:** Oligonucléotides utilisés. Les codons « START » sont signalés en rouge, les « STOP » en bleu. Les séquences de reconnaissance des enzymes de restrictions sont représentées en vert. cc indique 2 cytosines rajoutées pour le sous-clonage en pYES2-GFP afin de conserver le cadre de lecture avec la GFP.

| Nom         | Utilisation                       | Séquence                          | Orientation | Site de reconnaissance d'enzyme de digestion |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------------------|
| Lb-UbqF     | RT-Ubiquitine de Laccaria bicolor | AGCAGCTTGAAGATGGTCTCGT            | forward     |                                              |
| Lb-UbqR     | RT-Ubiquitine de Laccaria bicolor | AGGTGAAGGGTGCTTTCCTT              | reverse     |                                              |
| SP6         | PCR sur vecteur pGEMT             | TATTTAGGTGACACTATAGAAT            |             |                                              |
| T7          | PCR sur vecteur pGEMT             | GTAATACGACTCACTATAGGGC            |             |                                              |
| L2          | PCR sur vecteur pFL61             | CAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTAC       |             |                                              |
| R2          | PCR sur vecteur pFL61             | GCGTAAAGGATGGGGAAGAGAAAAG         |             |                                              |
| LbZIP-A443  | clonage pGEMT                     | ATGTCATCCGATTGTAGTACCGTC          | forward     |                                              |
| LbZIP-A444  | clonage pGEMT                     | AAGCTAGGCCCCATTTCCTCAAGGAG        | reverse     |                                              |
| LbZIP-A551  | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCAGGCTTATGTCATCCGATTGTAGTAC     | forward     | HindIII                                      |
| LbZIP-A552  | sous-clonage pYES2                | CCCGGATCCCTAGGCCCCATTTCCTCAAGGA   | reverse     | BamHI                                        |
| LbZIP-A553  | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGGATCCccGGCCCCATTTCCTCAAGGAGC  | reverse     | BamHI                                        |
| LbZIP-B445  | clonage pGEMT                     | ATGTCGCTCTGATGGCTCTGCCTGTAA       | forward     |                                              |
| LbZIP-B446  | clonage pGEMT                     | TTATGCCCCACTTTCCTCAAGGAGTGC       | reverse     |                                              |
| LbZIP-B554  | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCGGATCCATGTCGCTCTGATGGCTCTG     | forward     | BamHI                                        |
| LbZip B855  | sous-clonage pYES2                | CCCGAATTCCTATGCCCCACTTTCCTCAAGGAG | reverse     | EcoRI                                        |
| LbZip B856  | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGAATTCGCCCCACTTTCCTCAAGGAGTGCC | reverse     | EcoRI                                        |
| LbZip-C728  | clonage pGEMT                     | ATACATGCCCCCGCTCCCTCTCGCAAA       | forward     |                                              |
| LbZip-C729  | clonage pGEMT                     | TCACTCGCCTAACCCAACAAGTAC          | reverse     |                                              |
| LbZip-C776  | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCAGGCTTATGCCCCCGTCCCCCTCGCA     | forward     | HindIII                                      |
| LbZip-C777  | sous-clonage pYES2                | CCCGGATCCCTACTCGCCTAACCCAACAAGT   | reverse     | BamHI                                        |
| LbZip-C778  | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGGATCCccCTCGCCTAACCCAACAAGT    | reverse     | BamHI                                        |
| LbZIP-D447  | clonage pGEMT                     | ATGTTATCTCGCAATACCCGCCTACTC       | forward     |                                              |
| LbZIP-D448  | clonage pGEMT                     | GAGGCTATTCATTCCAAGCGACCAAA        | reverse     |                                              |
| LbZIP-D557  | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCAGGCTTATGTTATCTCGCAATACCCG     | forward     | HindIII                                      |
| LbZIP-D558  | sous-clonage pYES2                | CCCGGATCCCTATTCATTCCAAGCGACCA     | reverse     | BamHI                                        |
| LbZIP-D559  | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGGATCCccTTCATTCCAAGCGACCAAA    | reverse     | BamHI                                        |
| LbCDF-A451  | clonage pGEMT                     | GCATCCGCATCATGAAGAACAACAACG       | forward     |                                              |
| LbCDF-A452  | clonage pGEMT                     | TCACTGCTACACCAAGTTTTCGGTTT        | reverse     |                                              |
| LbCDF-A563  | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCAGGCTTATGAAGAACAACAACGCGCAT    | forward     | HindIII                                      |
| LbCDF-A564  | sous-clonage pYES2                | CCCGGATCCCTACGCTACACCAAGTTTTC     | reverse     | BamHI                                        |
| LbCDF-A565  | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGGATCCccCGCTACACCAAGTTTTCCTG   | reverse     | BamHI                                        |
| LbCDF-B453  | clonage pGEMT                     | CTATCCCCAGCATGAAGAACGTGACA        | forward     |                                              |
| LbCDF-B454  | clonage pGEMT                     | CTACACCAAGCCCTCCAATTCTCCGCTT      | reverse     |                                              |
| LbCDF-B566  | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCAGGCTTATGAAGAACGTGACACGCAT     | forward     | HindIII                                      |
| LbCDF-B567  | sous-clonage pYES2                | CCCGGATCCCTACACCAAGCCCTCCAATTC    | reverse     | BamHI                                        |
| LbCDF-B568  | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGGATCCccCACCAGCCCTCCAATTCTC    | reverse     | BamHI                                        |
| LbCDF-C455  | clonage pGEMT                     | ATGGCAATGTCTCGTTTCAGCTAGA         | forward     |                                              |
| LbCDF-C456  | clonage pGEMT                     | TCAAACGTCAACTGCGGCTGGTG           | reverse     |                                              |
| LbCDF-C569  | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCGGATCCATGGCAATGTCTCGTTTCAG     | forward     | BamHI                                        |
| LbCDF-C570  | sous-clonage pYES2                | CCCGAATTCCTAACGTCAACTGCGGCT       | reverse     | EcoRI                                        |
| LbCDF-C571  | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGAATTCCTAACGTCAACTGCGGCTGGT    | reverse     | EcoRI                                        |
| LbCdf-D732  | clonage pGEMT                     | AGGTAGTATGCCCTGTGCCAGAC           | forward     |                                              |
| LbCdf-D733  | clonage pGEMT                     | TCTATGATGACGCTGAGAAAGCTTG         | reverse     |                                              |
| LbCdf-D1014 | sous-clonage pYES2/pyes2GFP       | CCCCGAGCTCAGGTAGTATGCTGTGCCAGAC   | forward     | SacI                                         |
| LbCdf-D1015 | sous-clonage pYES2                | CCCGGATCCCTATGATGACGCTGAGAAAGCTTG | reverse     | BamHI                                        |
| LbCdf-D1016 | sous-clonage pYES2GFP             | CCCGGATCCccTGATGACGCTGAGAAAGCTTG  | reverse     | BamHI                                        |



#### II.3.2.3. Composition de la réaction :

Le mélange de réaction comprenant le tampon spécifique de l'enzyme dilué au dixième, 5 nano-grammes de dNTP, 5 nano-grammes de chacune des amorces et 0,1 µL de Taq Polymérase (Biolabs) et de l'eau pour compléter la réaction à 25 micro-litres. La spécificité des amorces permet l'unique amplification de la région ciblée.

#### II.3.2.4. Conditions d'amplification :

Les conditions d'amplification type sont résumées dans le tableau XV.

#### II.3.3. Technique de clonage :

##### II.3.3.1 Préparation du vecteur :

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

Concernant les autres vecteurs, ceux-ci sont linéarisés par la (ou les) enzyme(s) de restriction choisie(s) puis éventuellement déphosphorylés (afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même dans le cas où une seule enzyme de restriction est utilisée).

Deux microgrammes de plasmide sont digérés pendant 2 à 4 h dans un volume de 50 µl, puis le tampon 10x de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Euromedex) et l'enzyme sont ajoutés au mélange pour un volume final de 90 µl. La réaction se déroule à 37°C pendant 1h. Le vecteur digéré (et éventuellement déphosphorylé) est purifié sur gel d'agarose 1% puis à l'aide du Kit "GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Pharmacia Biotech). Suite à la migration sur le gel d'agarose 1%, la bande d'ADNc d'intérêt est excisée (maximum 600ng). L'échantillon est chauffé à 60°C 2 minutes pour dissoudre le gel d'agarose puis repris dans 500 µl tampon de lyse. On dépose la solution obtenue sur une Colonne MicroSpin GFX; l'ADNc s'y lie à la membrane. Une centrifugation à 14000 rpm pendant 30 secondes est réalisée. Cette dernière est suivie d'un lavage à l'aide de 500 µl de tampon de lavage. L'élution de l'échantillon purifié est réalisée à l'aide d'eau sans nucléases.

**Tableau XV :** Exemple d'un programme de PCR.

| <b>Etapes</b>     | <b>Programme</b> |      |
|-------------------|------------------|------|
| Dénaturation      | 94°C             | 1'   |
| Dénaturation      | 94°C             | 30'' |
| Hybridation       | 55°C             | 30'' |
| Elongation        | 72°C             | 3'   |
|                   | } 40 cycles      |      |
| Elongation finale | 72°C             | 6'   |

**Tableau XVI :** Composition du milieu SOC.

| <b>Composés</b>      | <b>Concentration finale</b> |
|----------------------|-----------------------------|
| Bactotryptone        | 20 g.l <sup>-1</sup>        |
| Extrait de levure    | 5 g.l <sup>-1</sup>         |
| NaCl                 | 0,5 g.l <sup>-1</sup>       |
| KCl                  | 0,2 g.l <sup>-1</sup>       |
| MgSO <sub>4</sub> 1M | 10 ml                       |
| MgCL <sub>2</sub> 1M | 10 ml                       |
| Glucose 20%          | 10 ml                       |

#### II.3.3.2. Préparation du fragment à cloner :

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans le vecteur pGEM-T, sont purifiés directement ou après séparation sur un gel d'agarose, à l'aide du kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Pharmacia Biotech). Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs autres que pGEM-T sont purifiés comme décrit précédemment et hydrolysés par la (ou les) enzyme(s) de restriction adéquate(s).

#### II.3.3.3. Ligation :

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

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

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

#### II.3.3.4. Transformation des bactéries :

##### II.3.3.4.1. Préparation de bactéries compétentes :

Les bactéries sont cultivées dans 100 ml de milieu SOC (Tableau XVI). A DO<sub>600nm</sub> égale à 0,6, la culture est refroidie puis centrifugée à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont reprises dans 80 ml de tampon de transformation glacé TB (10 mM tampon HEPES ou PIPES ; 55 mM MnCl<sub>2</sub> ; 15 mM CaCl<sub>2</sub> ; 250 mM KCl) puis remises dans la glace 5 minutes avant une centrifugation identique à la précédente. Le culot est repris dans 20 ml de TB et 1,5 ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO). Après une incubation de 10 minutes à 4°C, la préparation de bactéries compétentes est terminée. Des aliquots de 25 µl de la suspension bactérienne sont ensuite additionnés à 25 µl de glycérol pour être congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C.

##### II.3.3.4.2. Transformation par choc thermique :

Le choc thermique génère des micropores dans la paroi et la membrane des bactéries.

Dans la suspension de bactéries, 5 µL de la préparation de plasmides sont ajoutés. Afin de créer les micropores, les cellules sont placées 30 minutes dans la glace puis subissent un choc

thermique à 42°C pendant 1 minute, suivie d'une incubation pendant 2 minutes de nouveau dans la glace. (L'ADN peut ainsi pénétrer dans le milieu intracellulaire bactérien).

Après ces étapes, un milieu SOC (tableau XVI) est ajouté (400 µl) aux bactéries et placé en incubation 1 heure à 37°C sous agitation pour favoriser la régénération des membranes bactériennes. Après ce temps d'incubation, les bactéries sont étalées sur du milieu LB solide contenant de l'ampicilline à une concentration de 100 µg.mL<sup>-1</sup> (tableau IX) et laissées à nouveau en incubation 20 heures en étuve à 37°C dans le but de sélectionner les bactéries transformées.

#### II.3.4. Expression hétérologue dans *S. cerevisiae* :

##### II.3.4.1. Transformation de *S. cerevisiae* :

###### II.3.4.1.1. Transformation des levures par choc thermique à partir de la banque :

La transformation s'effectue par choc thermique dans le but de créer des micropores dans la membrane. Cette technique est réalisée suivant la méthode de *Gietz et al (1992)*. Une culture de la souche mutante d'intérêt (Tableau X) (50mL) inoculée la veille en milieu riche YPD (tableau XI) est centrifugée 5 minutes à 4000 rpm lorsque la DO<sub>600nm</sub> est égale à 0,6.

Les cellules de levure sont resuspendues dans 1mL d'eau stérile. Deux lavages dans 1mL d'eau stérile, puis deux autres lavages dans 1mL d'un tampon Tris EDTA/Acetate de Lithium (TE/AcLi) (10mM Tris-Base ; EDTA 1 mM ; Acétate de Lithium 0,1 M ; pH 7,5) sont réalisés. Les cellules sont ensuite reprises dans 0,5 mL de ce tampon TE/AcLi. Les cellules sont alors compétentes et prêtes à être transformées.

A 50 µl de cellules sont ajoutés, 5 µl d'ADN « carrier » de sperme de saumon soniqué (10 mg/ml), 10 µL d'ADN<sub>c</sub> de la banque (ou 1 µg de vecteur vide) et 300 µl d'une solution PEG 4000 40% / TE / AcLi. Le mélange est incubé 30 min à 30°C sous agitation puis un choc thermique est réalisé pendant 15 min à 42°C. Ensuite, les cellules sont lavées dans 1mL d'eau stérile et resuspendues dans 1 mL de milieu YPD pour être mises en culture à 30°C pendant 4 heures sous agitation.

Les cellules sont ensuite lavées avec de l'eau stérile, centrifugées à 4000 rpm pendant 4 minutes et le culot repris dans 1mL d'eau stérile. Cette suspension est étalée sur du milieu SD-URA + 17,5 mM zinc (des témoins sont réalisés à partir de 2µL d'une suspension puis étalés sur du milieu SD-URA afin de quantifier le taux de transformation de chaque

expérience). Les transformants positifs apparaissent après 5 jours d'incubation à 30°C et sont conservés par repiquages successifs toutes les semaines sur du milieu sélectif SD-URA. Un témoin (sans ADN plasmidique) est réalisé et nous permet de nous assurer de la spécificité de la transformation.

#### II.3.4.1.2. Transformation des levures par choc thermique à partir de minipréparation de plasmides :

Cette transformation suit le même protocole que celle précédente pour les levures. A la place de la banque, 1µg d'ADN à transformer (vecteur contenant l'insert correspondant à un gène d'intérêt ou vecteur vide) est utilisé. La régénération de 4 heures en milieu YPD n'est pas réalisée. L'étalement se fait sur SD-URA.

#### II.3.4.2. Tests de complémentation

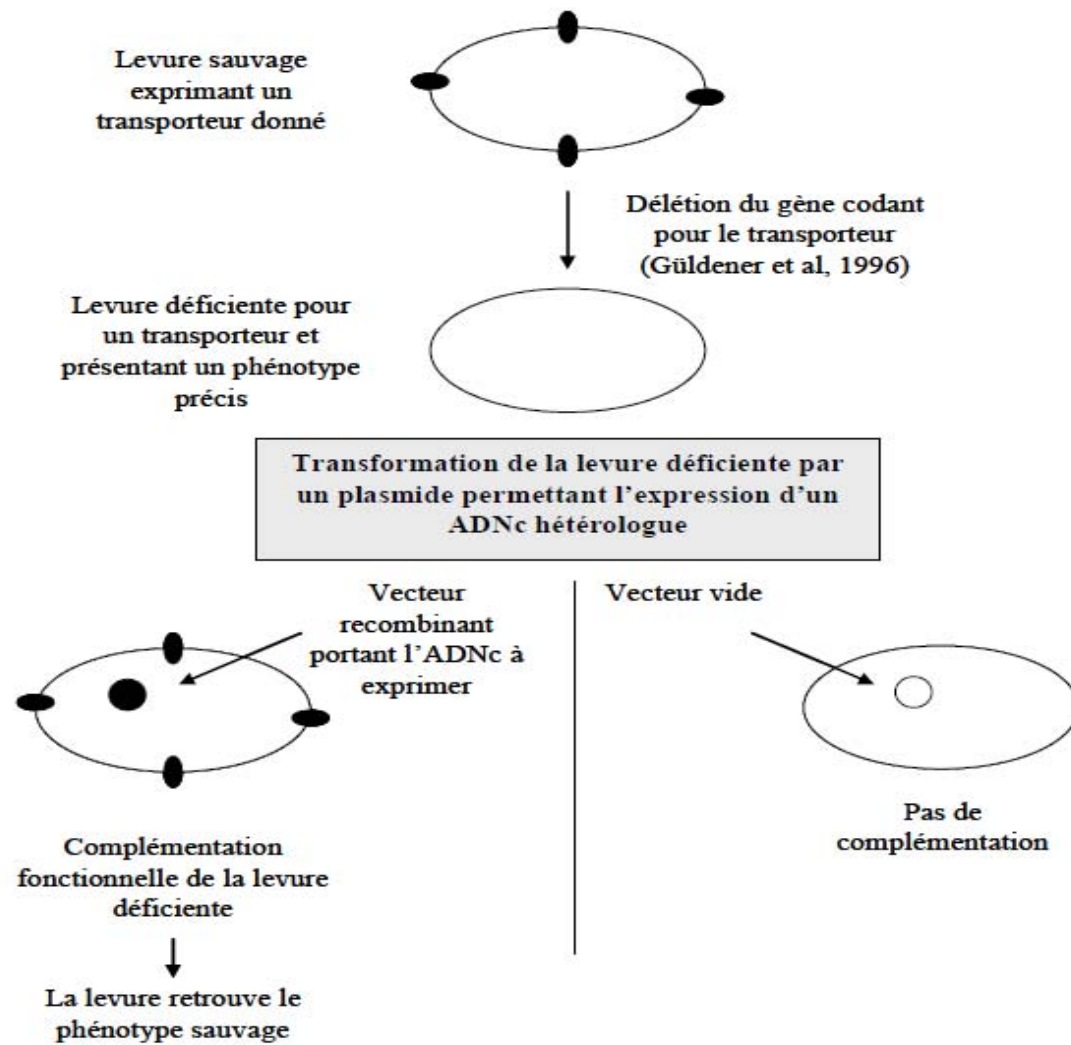
Le principe de la complémentation fonctionnelle de levure déficiente par un plasmide permettant l'expression d'un ADNc hétérologue est décrit sur la Figure 27.

##### II.3.4.2.1. Test de complémentation « classique » :

Les levures transformées par nos différents gènes d'intérêts ont été cultivées pendant 3 à 5 jours sur des milieux contenant différents métaux (tableau XVII).

Sur chaque boîte, la souche sauvage BY4741 et la souche délétée, toute deux transformées par le vecteur vide, sont utilisées comme témoin respectivement positif et négatif. Les souches proviennent d'EUROSCARF (<http://web.unifrankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>).

Nous avons testé pour chaque transformation de *S. cerevisiae* des souches sensibles au Zn (*zrc1Δ* et *cot1Δ*), au Cd (*ycf1Δ* et *yap1Δ*), au Mn (*pmr1Δ* et *smf1Δ*), au Cu (*cup2Δ*), au Fe (*ccc1Δ*) et au Co (*cot1Δ*) (tableau X). Les protéines ZRC1 et COT1 de *S. cerevisiae* sont localisées sur la membrane de la vacuole et participent au stockage des ions  $Zn^{2+}$  et  $Zn^{2+}+Co^{2+}$  respectivement (Li & Kaplan, 1998; MacDiarmid et al., 2000 et 2002 ; Miyabe et al., 2001). YCF1 est localisée sur la membrane vacuolaire et participe à la détoxification du Cd (Li et al., 1997) et du Hg (Gueldry et al., 2003). YAP1 est un régulateur transcriptionnel de *S. cerevisiae*. Sa surexpression entraîne une augmentation de la tolérance au cadmium (Wu et Moye-Rowley, 1994) alors que sa délétion entraîne une hypersensibilité au Cd (Lee et al., 1999). YAP1 est impliqué dans le contrôle de plusieurs gènes de réponse au métal tels que *ycf1* et *gsh1*, ainsi que dans l'induction de gènes de défense antioxydants tels que *trx* et *ccp1*.



**Figure 27 :** Principe de la complémentation de levures déficientes

PMR1 est située sur la membrane de l'appareil de Golgi (Culotta et al., 2005) ; SMF1 est localisé sur la membrane plasmique (Portnoy et al., 2002), ils sont tous deux responsables du transport du Mn: PMR1 permet la séquestration du Mn dans les vésicules golgiennes alors que SMF1 est impliqué dans l'import cytoplasmique de cet élément. CUP2 est localisé au niveau du noyau et participe à l'homéostasie du Cu (Buchman et al., 1989). CCC1 est localisé au niveau de la membrane vacuolaire et y participe à la tolérance au fer et au manganèse (Li et al., 2001).

#### II.3.4.2.2. Test de complémentation lors des expérimentations de métatranscriptomique :

Les clones à tester sont ensemencés sur une plaque multipuits contenant respectivement du milieu liquide SD-URA (Tableau XII) pour les clones possédant un plasmide (pFL61 modifié) et du milieu SD+URA (20 mg.l<sup>-1</sup>) pour ceux n'en possédant pas.

La plaque multi-puits est mise en incubation à 30°C pendant 24 heures. Les clones sont ensuite dilués en cascade au dixième jusqu'à la dilution 10<sup>-3</sup>, puis 2μL de chaque dilution sont déposés sur milieux sélectifs solides SD-URA et SD-URA+zinc (17,5 mM). Les boîtes sont placées à 30°C pendant 5 jours.

La boîte SD-URA sert de témoin de croissance des cellules puisqu'elle ne comprend pas de zinc ajouté. Les boîtes SD-URA+zinc permettent d'analyser la croissance des clones en présence de zinc. En effet, en comparant le taux de croissance de ces clones avec ceux de la souche sauvage et de la souche mutante, on peut observer le degré de restauration du phénotype.

#### II.3.4.2.3. Mise en évidence de l'importance du plasmide :

Afin de vérifier si le phénotype de tolérance qui apparaît avec ces colonies est réellement issu de l'expression de l'insert contenu dans le plasmide, l'étape suivante est de récupérer ces mêmes souches sans plasmides. En effet, des phénomènes épigénétiques pourraient s'être produits lors du processus de transformation des cellules et être la cause du phénotype observé. Préalablement, un milieu SD modifié est préparé. Une première solution contenant la moitié du volume final d'eau, à laquelle sont ajoutés 20g.l<sup>-1</sup> d'agar, est autoclavée 20 minutes à 120°C. En parallèle, un milieu SD « classique » (tableau XII) est préparé dans l'autre moitié du volume final d'eau, y est ajouté de l'uracile (10 mg / 200 ml de volume final de milieu) et du FOA (100 mg / 100 ml de volume final de milieu). Cette deuxième solution est filtrée, puis

**Tableau XVII:** Concentrations de métaux utilisées lors des tests phénotypique des différentes souches de levures en milieu SD.

| Métal | Souche        | Concentrations testées |
|-------|---------------|------------------------|
| Cd    | $\Delta Ycf1$ | 0 à 50 $\mu\text{M}$   |
| Cd    | $\Delta Yap1$ | 0 à 50 $\mu\text{M}$   |
| Co    | $\Delta Cot1$ | 0 à 2 mM               |
| Cu    | $\Delta Cup2$ | 0 à 100 $\mu\text{M}$  |
| Fe    | $\Delta Ccc1$ | 0 à 5,25 mM            |
| Mn    | $\Delta Pmr1$ | 0 à 2 mM               |
| Ni    | $\Delta Smf1$ | 0 à 1,75 mM            |
| Zn    | $\Delta Cot1$ | 0 à 20 mM              |
| Zn    | $\Delta Zrc1$ | 0 à 20 mM              |

**Tableau XVIII:** Filtres utilisés en microscopie à fluorescence. Le filtre FITC nous sert à observer la fluorescence issue de la GFP, alors que le filtre UV permettra de révéler spécifiquement la fluorescence issu du DAPI ou du CMAC-Arg.

|            | FITC       | UV         |
|------------|------------|------------|
| Excitation | 465-495 nm | 340-380 nm |
| Emission   | 515-555 nm | 435-485 nm |



après refroidissement de la première solution, les deux solutions sont mélangées avant d'être coulées dans des boîtes de Pétri.

Les clones de levures sont prélevés et mis en culture à 30°C dans 2mL de milieu riche YPD sous agitation pendant 8 heures. La perte de pression de sélection pour le plasmide entraîne la perte de celui-ci chez un certain nombre de levures. 10µL de cette culture sont striés sur du milieu SD contenant de l'uracile (20 mg.l<sup>-1</sup>). Le FOA provoque la formation d'un composé toxique lors de son utilisation dans la voie de biosynthèse de l'uracile. Ce composé, le 5-fluoro-uracile, est capable de s'incorporer dans l'ARN, d'induire une transcription erronée et donc de provoquer l'arrêt du cycle cellulaire. Les clones ayant poussé après trois jours sont dépourvus de plasmides puisqu'incapables de synthétiser l'uracile, ils utilisent celle du milieu. Ces clones sont conservés sur du milieu riche YPD solide. Ils seront testés avec les clones possédant un plasmide lors du test de complémentation fonctionnelle.

#### II.3.5 Localisation subcellulaire de protéines par fusion GFP :

Le clonage dans le plasmide pYES2-GFP d'un ADNc nécessite de générer des amorces particulières. En effet, il est nécessaire de rajouter des sites de restriction pour permettre l'insertion de l'ADNc dans le vecteur. Il est aussi important de supprimer le codon stop du gène et de veiller à ce que les cadres de lecture de l'ADNc et celui de la GFP soient en phase, avec l'ajout si besoin d'une ou deux bases au niveau de l'amorce pour rétablir cette phase de lecture. La GFP étant clonée dans le plasmide pYES2 au niveau du site XbaI. Les gènes d'intérêts ont été amplifiés à l'aide de l'ADN polymérase Phusion (Finnzymes) à haute fidélité selon le protocole donné par le fournisseur.

Les produits d'amplification sont ensuite purifiés et digérés à l'aide des enzymes de restriction choisies. Le plasmide pYES2-GFP est digéré avec les mêmes enzymes, déphosphorylé si nécessaire puis une étape de ligation est réalisée (Chapitre II.3.3.1).

Pour visualiser des organites, 2 fluorophores sont utilisés. Le composé CMAC-Arg (Molecular Probes) va pénétrer dans la vacuole et émettre une fluorescence au niveau du lumen. Le DAPI (Kapuscinski, 1995) est utilisé en tant que contre-marqueur pour identifier le noyau.

Après transformation des levures par nos vecteurs, les colonies obtenues sont cultivées dans du milieu SD sans uracile contenant uniquement du galactose comme source de carbone afin

d'induire le promoteur pGAL1, activant ainsi l'expression du gène d'intérêt cloné. Les cellules transformées sont observées avec un microscope à fluorescence Nikon Eclipse 200 (Nikon, Japon) avec un objectif Nikon Plan 100x à immersion. Les filtres utilisés sont présentés dans le tableau XVIII. Les images sont acquises et numérisées avec un appareil photo numérique (Nikon D80) relié au microscope.

Le CMAC est ajouté à la solution de cellule à la concentration de 50µM pendant 5 minutes, les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du milieu SD-URA galactose (centrifugation 4000 rpm 4 minutes) avant visualisation au microscope à fluorescence.

Le DAPI est ajouté à la solution de cellule à la concentration de 300 nM (solution stock diluée dans du PBS) pendant 20 secondes, les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du milieu SD-URA galactose (centrifugation 4000 rpm 4 minutes) avant visualisation au microscope à fluorescence.

### II.3.6. Dosage des éléments minéraux :

#### II.3.6.1. Prélèvement :

Des carottes de sol ont été prélevées, sur sols pollués et non pollués, puis tamisées à 2 mm pour être ensuite congelées à l'azote liquide et conservées à -80°C. Les teneurs en métaux de deux fractions différentes ont été déterminées :

- la teneur en métaux totaux dans le sol (totalité des éléments présents sous toutes les formes chimiques)
- La fraction de métaux « échangeables » du sol.

Dans notre étude, nous avons opté pour l'extraction au chlorure de calcium car c'est une des méthodes les plus couramment utilisées et préconisée par P.Richaud qui a réalisé les analyses ICP-AES sur les échantillons.

Lors des campagnes de prélèvement, des caprophores et des végétaux (Herbacées et aiguilles de pin) furent aussi prélevés.

Après lavage à l'eau distillée des végétaux afin d'éliminer toute pollution externe (notamment la poussière métallique) présente sur les échantillons, ces derniers sont mis à sécher dans un four (60°C, 3 jours) puis sont broyés à l'aide d'un mortier.

Les carpophores sont lavés à l'eau distillée, pelés afin d'éliminer les particules et poussières métalliques qui auraient pu s'incruster à la surface des carpophores. Ces derniers sont ensuite mis à sécher dans un four à 60°C pendant 3 jours avant d'être réduits en poudre.

#### II.3.6.2. Dosage des métaux totaux (dans le sol, les aiguilles de pin et les carpophores) :

L'ICP-AES est basée sur le principe que le plasma d'argon échange son énergie avec les atomes présents dans la solution. En retournant à un état moins énergétique ces atomes émettent des radiations de longueur d'onde caractéristique de l'élément dosé. La spectrométrie d'émission plasma permet de doser en routine la plupart des éléments à des concentrations de l'ordre de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , soit de l'ordre de la partie par milliard en masse (ou ppb, part per billion). Les analyses en ICP-AES ont été réalisées par P. Richaud au CEA de Cadarache.

Une analyse nécessite 100 à 200 mg de matière sèche, que ce soit pour des échantillons de carpophores, d'aiguilles de pin ou encore de sol.

Les échantillons de 100 à 200 mg de matière sèche sont minéralisés avec 5 ml de  $\text{HNO}_3$  à 70% dans un four à micro-ondes. Après dilution à une concentration finale de 3,5 % de  $\text{HNO}_3$ , la teneur en éléments métalliques est déterminée par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (Vista MPX, Varian). Le contrôle de la qualité est basé sur l'utilisation de contrôles internes et de solutions étalons certifiées (Astasol-Mix, Analytica Ltd, Prague, République Tchèque) qui permettent d'établir des courbes étalons sur la gamme entière pour chaque élément.

#### II.3.6.3 Dosage des éléments échangeables du sol :

La fraction des éléments échangeables d'échantillons de sol a été recueillie après extraction au chlorure de calcium (Menzie et al., 2007). Dix grammes de sol sec (séché à  $35^\circ\text{C}$ ) sont mis à agiter ( $150 \text{ trs min}^{-1}$ ) pendant 2 heures à  $20^\circ\text{C}$  en présence de 100 ml d'une solution de chlorure de calcium à 0,01M (Houba et al., 2000). Le mélange est alors filtré sur filtre sans cendres (Rotilabo®-Rundfilter, qualitativ, Roth, Allemagne) et le filtrat est dilué, puis acidifié en ajoutant 1 ml d'acide nitrique pur pour 50 ml de filtrat. Les témoins constitués d'eau ultrapure et du même volume d'acide nitrique ont également été réalisés.

#### II.3.7. Analyses bioinformatiques :

La plupart des travaux bioinformatiques a porté sur l'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques des gènes étudiés. Différents programmes ont été utilisés, dont les principaux sont les sites <http://www.expasy.ch/tools/dna>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.jgi.doe.gov> et [multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html).

Les comparaisons de séquence protéique et nucléotidique ont été réalisées à l'aide de l'algorithme BLAST (Basic Alignment Search tool) (Altschul et al., 1994 ; Altschul et al.,

1997). Les programmes BlastP, BlastN et BlastX comparent respectivement les séquences protéiques, les séquences nucléotidiques et les produits de la traduction de la séquence étudiée dans les six phases de lecture possibles avec les séquences appropriées dans les bases de données. Les banques de données consultées sont des banques non redondantes de séquences nucléotidiques et protéiques du National Center for Biotechnology information (NCBI). Les alignements multiples ont été réalisés en utilisant la méthode ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Les analyses phylogénétiques ont été réalisées à l'aide du logiciel MEGA version 4 (Kumar *et al.*, 2008). Ces dernières utilisent la méthode du Neighbor-Joining (NJ) de ce logiciel en incluant les options Pairwise deletion et Poisson correction.

#### II.3.8. Analyses statistiques :

Les variations de concentrations en métaux entre les échantillons (sols, aiguilles de pin) sont testées avec une analyse de variance à deux facteurs (Two Way ANOVA) avec le logiciel Matlab qui permet de conclure si la différence est significative ou non et avec quel degré de certitude.



## Chapitre III :

# *Le méatranscriptome de microorganismes eucaryotes du sol soumis à une pollution aux métaux lourds*

---

Le projet EUMETATOX, dans lequel cette thèse s'insère, a pour objectif général de révéler les mécanismes d'adaptation à des métaux lourds, notamment le zinc et le cadmium, mis en place par les différents microorganismes eucaryotes présents dans un sol donné. Les tâches ont été réparties entre les deux équipes en fonction du métal étudié (tolérance au cadmium – équipe lyonnaise, tolérance au zinc équipe nancéienne).

Les sites d'études sont situés dans la Province du Limburg (Lommel et Paal) et d'Anvers pour le site de Balen (régions du nord-est de la Belgique). La pollution observée sur les sites de Lommel et Balen est due à l'activité de deux zingueries.

Le premier objectif de cette thèse était l'étude du métatranscriptome de microorganismes eucaryotes issus de sols pollués au zinc. Nous avons ainsi analysé la diversité taxonomique et fonctionnelle de communautés de microorganismes eucaryotes de trois sols distincts, un sol contaminé par des métaux lourds (site de Balen), un sol anciennement contaminé par ces mêmes métaux lourds (site de Lommel) et un sol non contaminé (site de Paal).

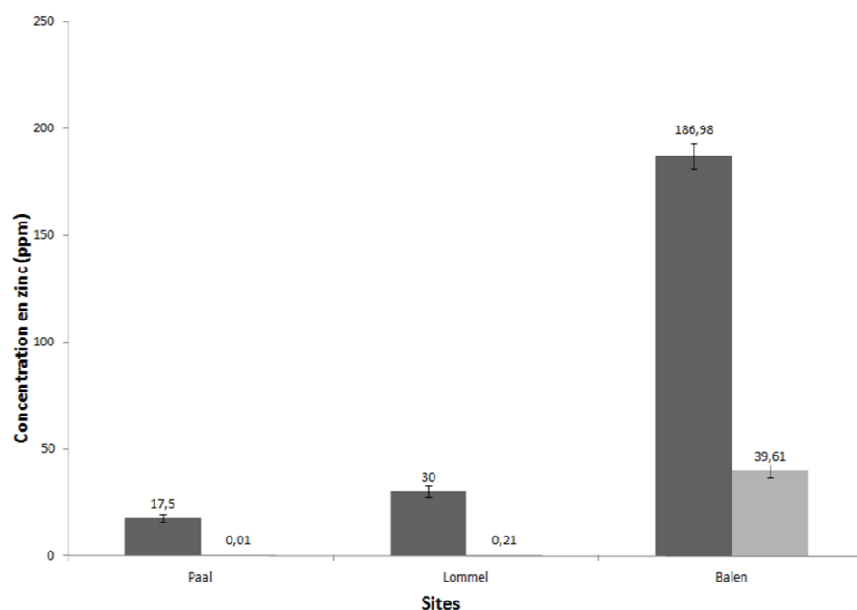
Pour réaliser cet objectif, nous avons analysé en premier lieu la teneur en zinc des sites d'intérêt afin de vérifier l'état de pollution. Ensuite, nous avons considéré la diversité taxonomique de ces lieux. Enfin nous nous sommes concentrés sur l'identification de la diversité fonctionnelle des gènes de microorganismes eucaryotes impliqués dans la tolérance au zinc.

### III.1. Caractéristiques des sites étudiés :

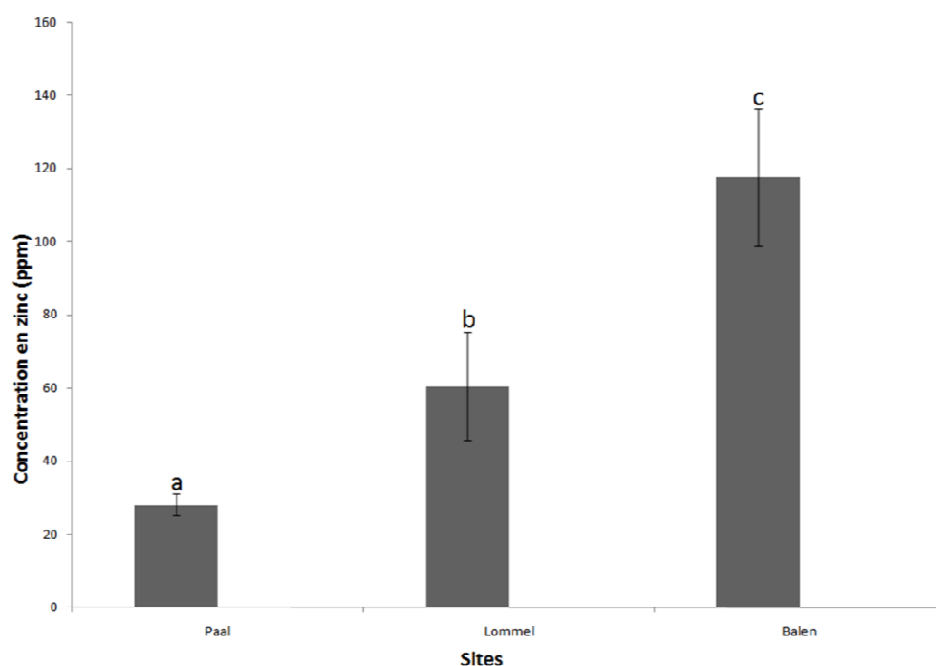
Dans un premier temps, il était nécessaire de vérifier le niveau de pollution métallique des sites étudiés. Pour ce faire, nous avons prélevé des échantillons de sols et d'aiguilles de pins sur les sites d'intérêts et nous avons comparé les teneurs en métaux lourds de ceux-ci.

#### III.1.1. Caractéristiques des sols d'intérêt :

Une des caractéristiques principales des sols est leur composition. Les argiles et la matière organique du sol sont responsables d'une séquestration importante des contaminants, alors que les particules plus grosses comme le sable ou le gravier retiennent moins les métaux. Les sols des sites d'intérêt, composés à 80% de sable, sont pauvres en matière organique (Colpaert, communication personnelle), ce qui suggère une biodisponibilité importante de ces métaux.



**Figure 28 :** Dosage du zinc total (gris) et échangeable (noir) présent dans les échantillons de sols prélevés en 2008 sur les sites de Paal, Lommel et Balen. Les résultats sont présentés en ppm ou  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Les valeurs des concentrations sont indiquées



**Figure 29 :** Concentration en zinc dans les aiguilles de pins prélevées sur les trois sites : Paal (non pollué), Lommel (anciennement pollué) et Balen (pollué). Les concentrations ont été mesurées en ICP-AES et sont exprimées par les moyennes pour chaque site  $\pm$  les écart-types de minimum 5 échantillons. Une analyse statistique (ANOVA) permet de déterminer les différences significatives de concentration en zinc entre les différents sites (des lettres différentes indiquent des différences significatives) ( $p < 0,005$ ).



Un autre facteur important influençant la biodisponibilité des métaux dans les sols est le pH. Ainsi des mesures de pH des sites d'intérêt ont été réalisées. Avec des pH respectifs de 4,68, 4,66 et 5,69 les sols de Paal, Lommel et Balen sont considérés comme des sols acides. Un pH acide tend à solubiliser les métaux. Plus l'espèce métallique est libre et mobile, plus elle sera biodisponible et plus il y a un risque de toxicité pour les organismes vivants (Naidu et al., 2003)

### III.1.2. Teneur en zinc dans les sols : figure 28

Il apparaît que le sol de Lommel, anciennement très pollué (Colpaert et al., 2000; Colpaert et al., 2004) ne présente plus une pollution aussi importante. En effet, on observe une chute de la concentration en zinc total de 1750 ppm au début des années 2000, à 29,87 ppm lors des analyses réalisées en 2008, sans doute due à un « lessivage » des métaux. 0,06% du zinc de Paal est échangeable contre 0,7% pour Lommel. Le zinc de ces deux sols n'est que très peu échangeable, donc peu disponible pour les organismes. Le sol de Balen présente un profil complètement différent. Ainsi, on y retrouve 21,2% de zinc échangeable. Ce sol, bien qu'ayant une pollution modérée (zinc total) comparée à celle présentée dans d'autres études (Migeon et al., 2009; Steckerman et al., 2006 a et b), présente une fraction très importante de zinc disponible pour les organismes.

### III.1.3. Teneur en zinc dans les aiguilles de pins :

Pour quantifier la teneur en zinc dans les organismes présents sur le site, des aiguilles de pins ont été prélevées et cette teneur a été mesurée par ICP-AES (chapitre II.3.6).

Nous trouvons une différence significative entre les concentrations mesurées dans les échantillons issus des trois sites (figure 29). Ainsi, une concentration supérieure est retrouvée dans les aiguilles prélevées à Balen, environ 103 mg.kg<sup>-1</sup>, soit environ deux fois supérieure à celle mesurée dans les échantillons de Lommel et presque quatre fois supérieure à celle des échantillons de Paal. Ces valeurs sont cohérentes avec celles décrites par Yilmaz et Zengin (2004) pour des sites non pollués, anciennement pollués et pollués.

Les trois sites d'étude, possèdent des caractéristiques physico-chimiques très proches. Les pollutions au zinc observées sont significativement différentes, le choix de ces trois sites a ainsi pu être validé pour les études de métatranscriptomique.

**Tableau XIX :** Végétaux et champignons identifiés sur les sites de Paal (site non pollué), Lommel (site anciennement pollué) et Balen (site pollué).

| Sites         | Végétaux                                                                                                                                                                                                                                         | Champignons                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Paal</b>   | <i>Agrostis capillaris</i><br><i>Betula sp.</i><br><i>Campylopus sp.</i><br><i>Quercus petraea</i><br><i>Pinus sylvestris</i><br><i>Polytrichum piliferum</i><br><i>Populus nigra</i>                                                            | <i>Amanita muscaria</i><br><i>Cladonia sp.</i><br><i>Laccaria sp</i><br><i>Lactarius mommensus</i><br><i>Lactarius rufus</i><br><i>Leccinum sp.</i><br><i>Paxillus involutus</i><br><i>Scleroderma sp.</i><br><i>Xerocomus badius</i>                       |
| <b>Lommel</b> | <i>Agrostis capillaris</i><br><i>Algues vertes</i><br><i>Betula sp.</i><br><i>Deschampsia flexuosa</i><br><i>Pinus sylvestris</i><br><i>Polytrichum piliferum</i>                                                                                | <i>Amanita muscaria</i><br><i>Amanita rubescens</i><br><i>Boletus edulis</i><br><i>Cladonia sp.</i><br><i>Laccaria bicolor</i><br><i>Laccaria sp.</i><br><i>Lactarius rufus</i><br><i>Paxillus involutus</i><br><i>Scleroderma sp.</i><br><i>Suillus sp</i> |
| <b>Balen</b>  | <i>Betula sp.</i><br><i>Bromus mollis</i><br><i>Bryum sp.</i><br><i>Cerastium sp.</i><br><i>Ceratodon sp.</i><br><i>Holcus lanatus</i><br><i>Pinus sylvestris</i><br><i>Pleuridiuma acuminatum</i><br><i>Rumex sp</i><br><i>Senecio jacoboea</i> | <i>Hebeloma sp.</i>                                                                                                                                                                                                                                         |

## III.2. Etude de la diversité taxinomique

Cette partie a été principalement réalisée par l'équipe Symbiose Mycorhizienne du Laboratoire d'Ecologie Microbienne (UMR 5557 CNRS-Université Lyon 1), équipe dirigée par Roland Marmeisse. L'équipe nancéenne a participé à la collecte des sols, à l'identification des espèces et à l'extraction des acides nucléiques.

### III.2.1. Diversité macroscopique :

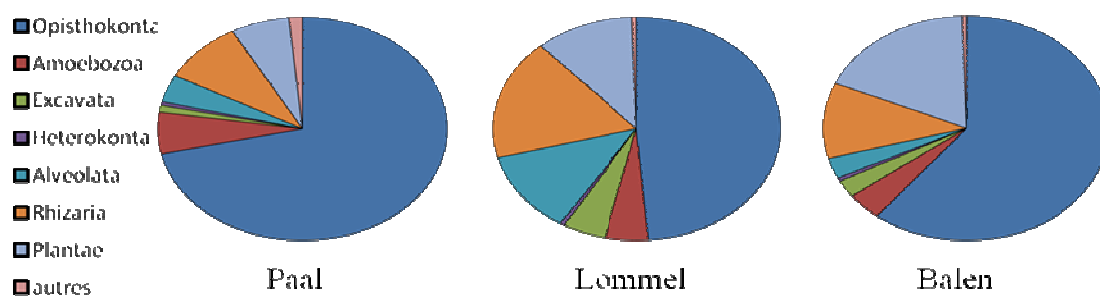
En préliminaire de cette étude taxinomique, des échantillons de carpophores de champignons et les végétaux des trois sites ont été collectés pour une identification visuelle (Tableau XIX). Les trois sites présentent une végétation abondante malgré la pollution. Concernant les végétaux, on peut noter la présence dans les trois sites de deux espèces majoritaires, *Pinus sylvestris* d'une part et *Betula sp.* d'autre part. De nombreuses plantes herbacées sont également présentes sur les trois sites. De manière générale, on retrouve essentiellement les mêmes espèces entre les sites de Paal et Lommel. On observe une diversité de carpophores entre les trois sites, ceci ne peut être cependant considéré comme une preuve d'une communauté fongique différente entre les sites. En effet, Gardes et al. (1996), notamment, ont montré que la représentativité des carpophores par rapport à la réalité de la communauté fongique souterraine d'un périmètre est, au mieux, imprécise.

### III.2.2. Etude des banques d'acides nucléiques ribosomiques 18S : (figure 30)

Dans un deuxième temps, l'équipe lyonnaise a construit une banque d'ADNr et une banque d'ARNr rétrotranscrit pour chaque sol. Un aliquot d'acides nucléiques de chaque sol est récupéré lors de la phase d'extraction des acides nucléiques du sol et cet aliquot sert de matrice aux premières étapes de la création des banques.

La diversité taxinomique des organismes eucaryotes des sols d'intérêt a pu ainsi être étudiée. Toutes les séquences obtenues ont été affiliées à un des grands phyla décrits dans l'introduction (chapitre III.1.). Il s'agit des Opisthokonta, Amoebozoa, Excavata, Heterokonta, des Alveolata, des Rhizaria, des Plantae, des Haptophyta et des Cryptophyta.

On retrouve des représentants de tous les phyla eucaryotes dans le pool des séquences obtenues des trois sites. Les sites de Paal et Balen présentent des profils très proches, au contraire de celui de Lommel.



**Figure 30 :** Affiliation taxinomique des séquences d’ADNr et d’ARNr ribosomiques 18S obtenues à partir des sols de Paal, Lommel et Balen.

| Site   | Titre de la banque |
|--------|--------------------|
| Paal   | $3.10^5$           |
| Lommel | $5.10^6$           |
| Balen  | $3,5.10^6$         |

**Tableau XX :** Titres (nombre total d’ADNc clonés) des banques d’ADNc construites à partir des différents sols dans le vecteur de clonage, pFL6 modifié. Les ADNc sont introduits par transformation dans une souche d’*E.coli*, puis les cellules transformées sont sélectionnées sur un milieu sélectif, puis dénombrées afin de déterminer le titre des banques d’ADNc ainsi générées pour chaque sol.

Au niveau des sites de Lommel et Balen, on observe une dominance des séquences de champignons et d'animaux (Opisthokonta). Hormis ces derniers, le groupe le mieux représenté est celui des Rhizaria, suivi de celui des Alveolata.

Le profil de répartition taxonomique des séquences du site de Lommel est moins dominé par les séquences d'Opisthokonta. Les Rhizaria et Alveolata occupent une place nettement plus importante que sur les deux autres sites.

Les séquences de plantes observées, du genre *Pinus sylvestris*, seraient majoritairement dues aux débris de racines fines passées au travers du tamis pendant l'échantillonnage.

### III.3. Etude de la diversité fonctionnelle :

Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre. D'une part la diversité fonctionnelle des sols de Balen, Lommel et Paal a été analysée par criblage par expression hétérologue dans des mutants de levures sensibles au zinc pour estimer la diversité des mécanismes de tolérance aux métaux utilisés au sein de communautés de microorganismes eucaryotes issues de ces sols.

D'autre part, plusieurs milliers de séquences d'ADNc ont été séquencées par le Genoscope (Evry, France) et analysées. Ainsi, nous pourrions classer ces séquences en fonction de leur homologie avec des séquences connues dans les bases de données et ainsi les classer dans divers groupes fonctionnels.

#### III.3.1. Construction des banques d'ADNc :

##### III.3.1.1. Prélèvements :

3 séances de prélèvements ont été réalisées en vue de la création de plusieurs banques (novembre 2006, juin 2007, juin 2008 pour Paal et Lommel, juin 2008 pour Balen).

A chaque fois, 20 points d'échantillonnage par site ont été réalisés sur une profondeur de 20 cm pour 5 cm de diamètre. Les échantillons de sols d'un même site ont été réunis et tamisés à 2 mm, puis congelés dans de l'azote liquide et stockés à -70°C.

##### III.3.1.2. Extraction des acides nucléiques :

Les acides nucléiques sont extraits suivant le protocole présenté dans le chapitre II.3.1.3.

Un aliquot d'ADN est récupéré pour les études de taxonomie (chapitre III.2). La qualité et la quantité d'ARNs restants ont été testées au laboratoire d'Ecologie Microbienne (Lyon). Pour les sols utilisés, un rendement de 1,1 µg d'ARN total par gramme de sol a généralement été

obtenu. Lors des premiers travaux sur cette méthode (Bailly et al., 2007) le rendement était moindre ( $0,36 \mu\text{g.g}^{-1}$ ).

#### III.3.1.3. Purification des ARNm, synthèse des ADNc et clonage :

Les ARNm polyadénylés eucaryotes sont purifiés par affinité sur billes magnétiques recouvertes d'oligo-(dT)25 à partir des ARN totaux issus des sols d'intérêt. Cette étape est suivie par la transcription inverse des ARNm en ADNc. Ces ADNc sont bordés par les sites de restriction *Sfi* IA et *Sfi* IB pour permettre leur clonage directionnel dans le vecteur pFL61 modifié possédant ces 2 sites (chapitre II.2.4.3, Bailly et al., 2007).

Les banques de plasmides ainsi construites nous permettent de cribler les inserts en système levure. Par transformation d'une souche d'*E.coli* et son dénombrement, le titre des banques a été estimé (tableau XX). La banque de Paal est environ 10 fois moins riche en inserts que celles issues des sols de Balen et Lommel.

#### III.3.2. Criblage des banques d'ADNc par expression hétérologue dans la levure :

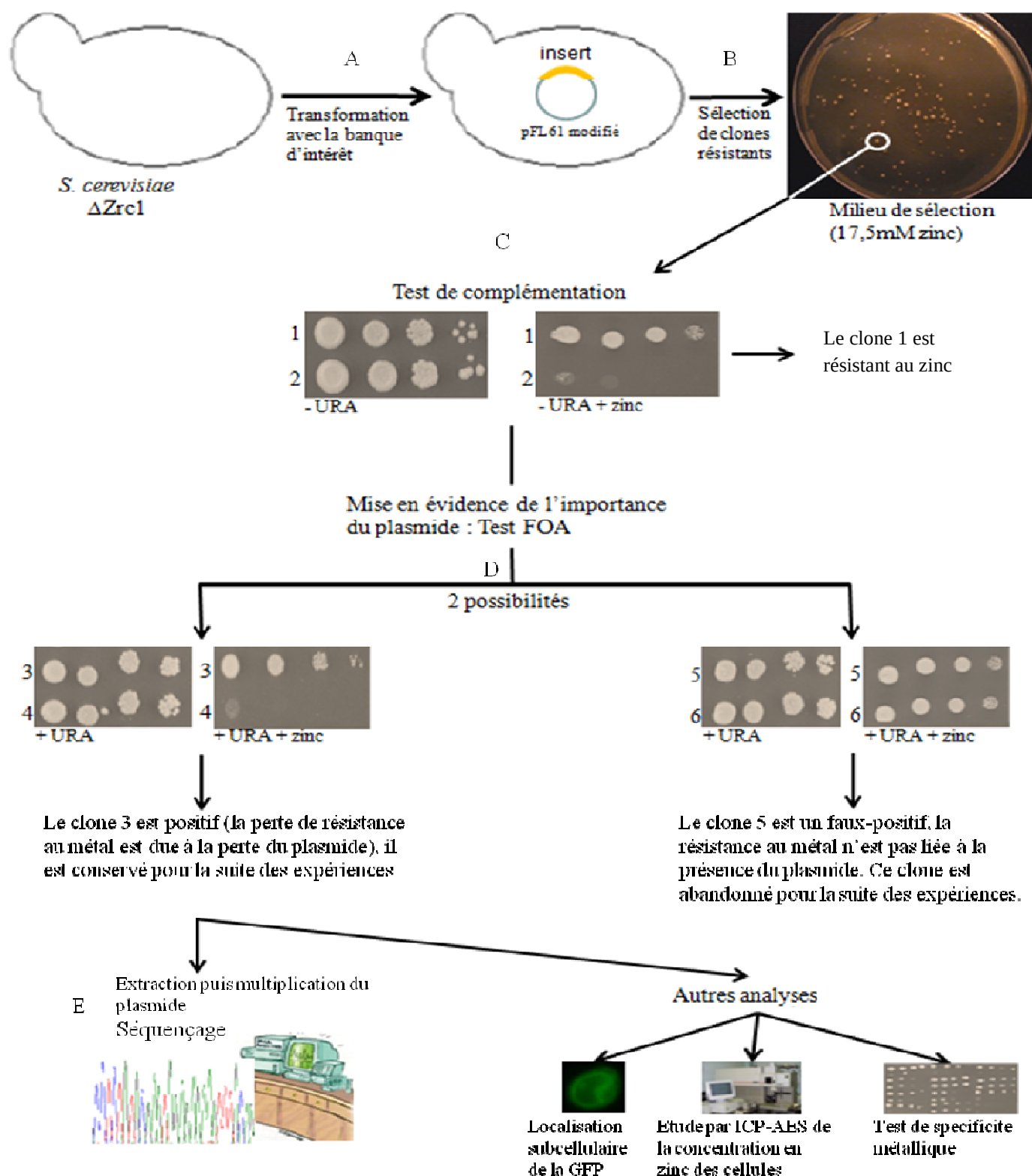
Les banques métatranscriptomiques des sites d'intérêt ont été criblées par complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure sensible au zinc,  $\Delta zrc1$ . En parallèle, ces mêmes banques ont été criblées par complémentation fonctionnelle de deux mutants de levure sensibles au cadmium par nos partenaires lyonnais (Lehembre, 2009). Le principe général de ces expériences est schématisé sur la figure 31. Le tableau XXI reprend, par étape, les chiffres clés de ce criblage.

##### III.3.2.1. Complémentation fonctionnelle du mutant $\Delta Zrc1$ :

Le mutant  $\Delta Zrc1$  (tableau IX) de *Saccharomyces cerevisiae* est délété du gène *zrc1* codant un transporteur vacuolaire de zinc de la famille CDF. Ce mutant n'est plus capable d'effectuer la séquestration du zinc dans la vacuole, de fait, il accumule des concentrations toxiques de zinc dans le cytoplasme. Le phénotype qui en résulte est une non croissance aux fortes concentrations en zinc dans le milieu de culture.

##### III.3.2.1.1. Test de résistance au zinc :

En préliminaire de cette étude, nous avons testé la tolérance au zinc de la souche mutante  $\Delta Zrc1$ . D'après nos résultats expérimentaux (figure 32), la souche utilisée présente un



**Figure 31 :** Les différentes étapes de sélection d'un clone résistant au métal suite à la transformation avec une banque métatranscriptomique eucaryote d'un mutant de levure sensible au métal. 1, 3 et 5 : clones avec insert testés ; 2 : clones avec vecteur vide ; 4 et 6 : clones sans plasmides.

phénotype bien distinct de celui de la souche sauvage à partir d'une concentration de 17,5mM de zinc dans le milieu. Nous utiliserons donc cette concentration pour la suite des tests de criblage de cette étude.

#### III.3.2.1.2. Transformation :

Le mutant  $\Delta Zrc1$  est transformé avec les banques d'intérêt (figure 31, A). Lors de cette étape, nous isolons les transformants d'intérêt (les mutants ayant acquis une certaine tolérance au zinc) d'une part, et d'autre part, nous estimons également le nombre total de transformants. Pour estimer le nombre total de transformants, un aliquot de chaque réaction de transformation est dilué et étalé sur milieu de sélection, puis un dénombrement des transformants est réalisé après trois jours de culture. Ainsi, leur nombre pour les sites de Paal, Lommel et Balen, est respectivement de  $3,83.10^5$  (soit un taux de criblage de 1,27 fois la taille de la banque),  $4,9.10^6$  (soit un taux de criblage de 0,98 fois la taille de la banque) et  $1,16.10^7$  (soit un taux de criblage de 3,31 fois la taille de la banque). En raison de l'importance du taux de couverture du criblage de la banque de Balen par rapport à ceux des autres banques (3 fois la couverture de la banque « Balen » contre 1 fois pour les deux autres sites), et pour des raisons temporelles, seuls les clones obtenus sur le premiers tiers des transformations ont été conservés pour la suite des expériences, les autres ont été conservés en vue d'une utilisation ultérieure.

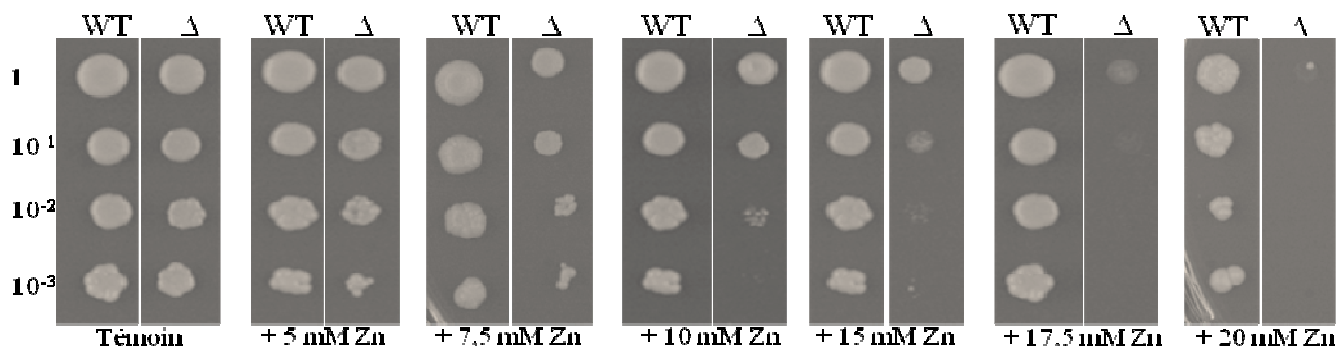
#### III.3.2.1.3. Sélection des clones d'intérêt :

La double sélection (milieu sans uracile et contenant du zinc) à l'issue de la transformation permet de cibler les levures ayant incorporé un plasmide et ayant un insert sensé compléter la déficience de la souche  $\Delta Zrc1$  (figure 31, B).

Pour la banque de Lommel, et à l'issue de cette étape, nous obtenons 103 clones. Pour les banques de Paal et Balen, le nombre de clones obtenus est de 78 et 315 (tableau XIX), respectivement. Ces clones subissent un premier test de confirmation de tolérance au zinc pour confirmer les résultats issus de l'étape de transformation (figure 31, C).

Pour s'assurer que le phénotype de résistance est effectivement dû à l'insert porté par le plasmide, ce dernier est éliminé des cellules en utilisant de l'acide 5-fluoro-orotique (ou FOA, chapitre II.3.4.2.3) et de l'uracile dans le milieu. Le FOA, analogue structural d'un métabolite nécessaire à la synthèse de l'uracile, va perturber cette synthèse et conduire à la synthèse du 5-fluoro-uracile qui est capable de s'incorporer dans l'ARN, d'induire une transcription erronée et donc de provoquer l'arrêt du cycle cellulaire. Sans pression de





**Figure 32 :** Test de résistance au Zinc, essai sur une gamme de concentration, allant de 5 à 20mM de zinc dans le milieu SD sans uracile, en vue de la détermination de la concentration la plus significative pour nos manipulations. Les souches sauvage BY4741 (WT) et délétée  $\Delta zrc1$  ( $\Delta$ ) ont été transformées préalablement avec le vecteur vide pFL61. 2 $\mu$ l de plusieurs dilutions sont étalées de la culture sont déposés ( $1$  à  $10^{-3}$ ).

**Tableau XXI :** Tableau récapitulatif des résultats des différentes étapes du criblage. L'astérisque (\*) dénote le nombre de gène étudiés (315) parmi le pool total de clones résistants obtenus suite aux 80 transformations réalisées. SaccDH : saccharopine deshydrogenase, Cytb5 : protéine proche d'une Cytochrome b5.

|                                                                                       | Paal        | Lommel                             | Balen                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------------|---------------------------------------------|
| Titre de la banque                                                                    | $3.10^5$    | $5.10^6$                           | $3,5.10^6$                                  |
| Nombre de transformations effectuées                                                  | 5           | 11                                 | 80                                          |
| Nombre total de clones obtenus (transformant)                                         | $3,83.10^5$ | $4,8.10^6$                         | $1,16.10^7$                                 |
| Couverture de la banque                                                               | 1,27X       | 0,98X                              | 3,31X                                       |
| Nombre de clones résistants obtenus sur milieu SD-URA+Zn après transformation de la   | 78          | 103                                | 1621*<br>315**                              |
| Nombre de clones dont la tolérance au zinc est due au plasmide (positifs au test FOA) | 13          | 46                                 | 112                                         |
| Nombre de clones positifs ayant été séquencés                                         | 8           | 43                                 | 23                                          |
| Répartition par famille de gènes (nombre de clone et famille)                         | 8 Skp1      | 1 Ubiquitine<br>8 BoIA<br>34 Skp 1 | 5 Sacc DH<br>4 BoIA<br>14 SKP 1<br>1 Cytb 5 |

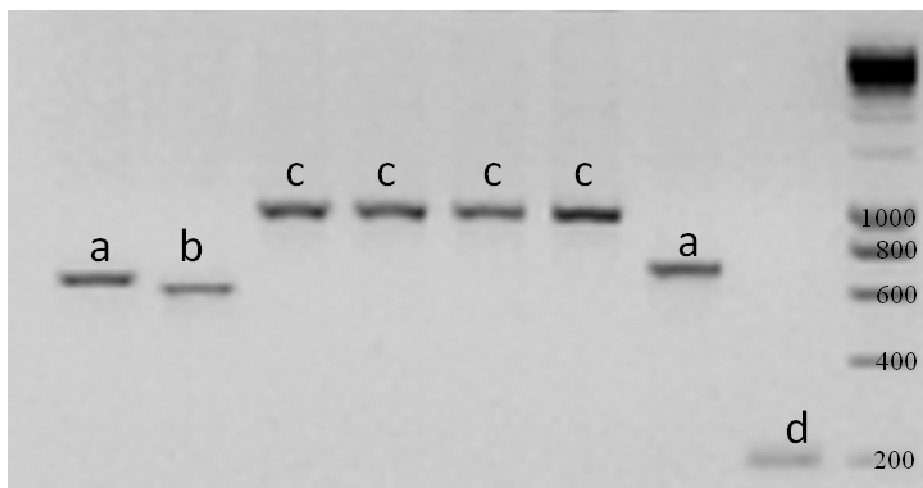
sélection (présence d'uracile dans le milieu), certaines cellules vont perdre leur plasmide et ne seront pas atteintes par la toxicité indirecte du FOA. En effet, sans le gène *ura3*, le FOA ne sera pas métabolisé par les cellules. Ces cellules sans plasmide peuvent néanmoins croître grâce à l'utilisation de l'uracile présente dans le milieu de culture (figure 31, D).

Ainsi sur les 103 transformants issus de la banque de Lommel, 46 sont confirmés positifs, leur tolérance au zinc étant liée à la présence du plasmide incorporé. Pour la banque de Paal, sur les 78 transformants qui poussaient sur milieu sélectif, seulement 13 ont leur résistance due au plasmide. Pour la banque de Balen, sur les 315 clones résistants testés, 112 avaient leur résistance au zinc qui pouvait être imputée au plasmide (tableau XIX).

La levure peut incorporer plusieurs plasmides de la banque lors du processus de transformation. Ainsi, lors de nos expériences, 75% des clones positifs au test FOA possédaient plusieurs plasmides. Une extraction des plasmides de levure est alors réalisée. La solution plasmidique obtenue est utilisée pour transformer une souche d'*E. coli*. Par PCR sur colonies, en utilisant des amorces spécifiques du vecteur, nous observons la taille des inserts des plasmides (figure 33). Dans le cas présenté (figure 33), il y avait dans le clone de levure testé 4 plasmides pFL61 différents (noté a à d) dont un, noté ici d sans insert (la taille observée, 200 nucléotides, correspondant à la distance entre les deux amorces de PCR). Une minipréparation d'ADN plasmidique permet la récupération d'une solution de plasmide purifié (un seul plasmide incorporé dans le système bactérien lors de la transformation). Les plasmides ainsi purifiés sont utilisés pour transformer la souche mutante *Δzr1*. Les clones issus de transformations sont soumis à un nouveau test de tolérance au zinc. Le but de ce dernier est de vérifier quel ADNc est responsable de la restauration du phénotype de la souche mutante *Δzr1*.

Ce test de confirmation conduit à la sélection de 43 inserts conférant une résistance au zinc pour la banque d'ADNc environnementale issue du sol de Lommel, 8 pour celle de Paal et 23 pour celle de Balen (tableau XIX).

Il est intéressant de noter que dans certains cas, aucun des plasmides issu du clone levure ne restaure, seul, le phénotype de la souche mutante. Il y aurait donc dans notre test, des synergies d'action entre plusieurs ADNc issus de plusieurs plasmides. Malgré l'intérêt certain qu'une étude de ces synergies aurait, ces plasmides ont été congelés dans l'attente d'études ultérieures.



**Figure 33 :** PCR sur colonies avec des amorces spécifiques au vecteur pFL61 sur des clones d'*E.coli* issus d'une transformation d'une souche bactérienne par une solution de plasmides provenant de l'extraction plasmidique de levure. Le profil multi bandes affiché ici sur le gel d'agarose 1% indique la présence, dans le clone de levure dont sont issus les plasmides, de plusieurs plasmides contenant des ADNc différents (ici 4 plasmides différents : a à d). La taille des fragments est évaluée en comparaison du marqueur de taille 1kb (Euromédex).

### III.3.2.2. Analyse des séquences d'ADNc restaurant le phénotype $\Delta$ Zrc1 :

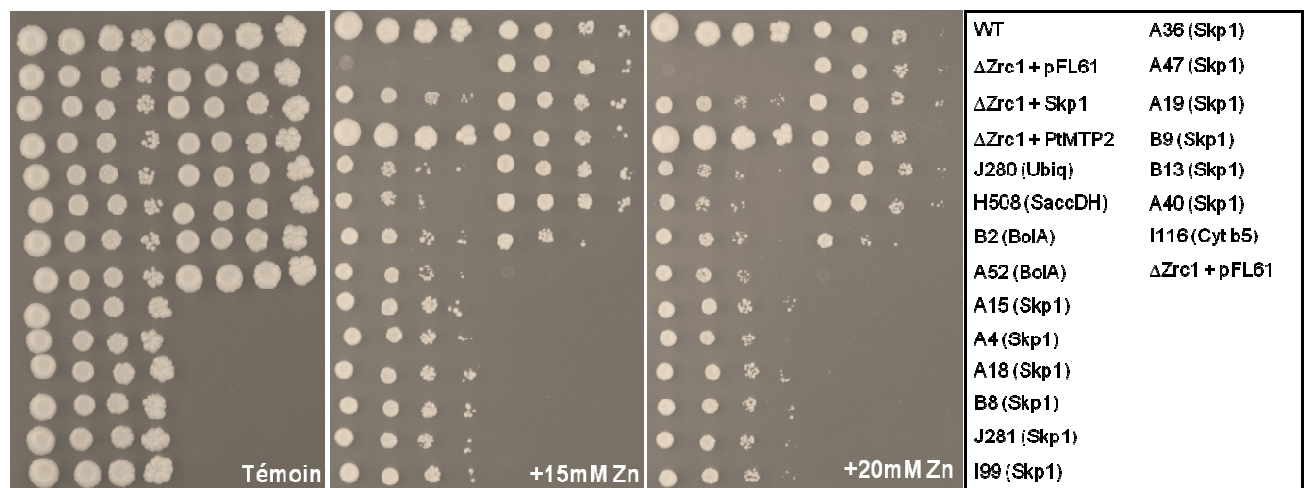
Les plasmides contenant les inserts ayant restauré le phénotype de sensibilité au zinc du mutant  $\Delta$ Zrc1 (figure 34) sont extraits, après séquençage (E figure 31). Ils sont comparés à la base de données GenBank nr (ne contient pas de séquences d'EST) à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Les séquences n'ayant pas d'homologie avec celles de cette base de données sont analysées contre une base de données du même site mais contenant des EST.

Les séquences obtenues sur les trois sites se classent en 5 familles de gènes : l'ubiquitine, les saccharopines déshydrogénases, les protéines Skp1, les protéines BolA et une protéine similaire au cytochrome b5 (tableau XIX).

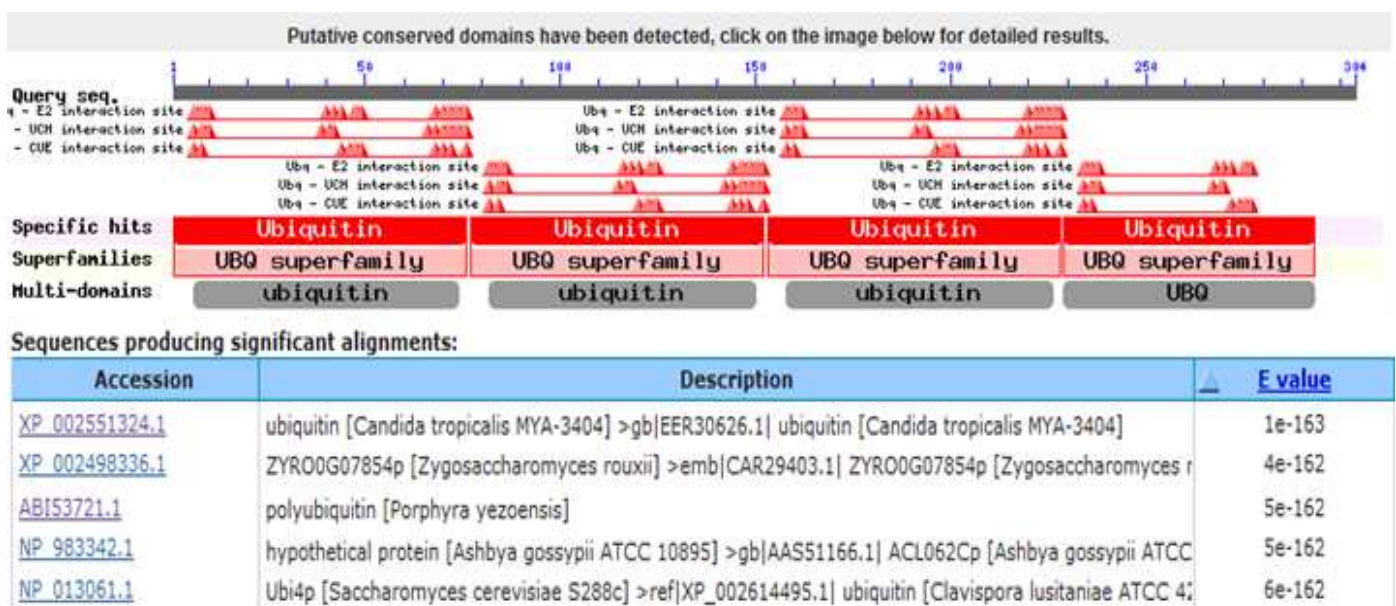
L'ADNc J280 code une ubiquitine. Cette poly-ubiquitine longue de 305 acides aminés n'a été identifiée que dans la banque de Lommel (site anciennement pollué). Les 20 premiers résultats de l'analyse par BLAST indiquent une appartenance de ce gène à un ascomycète, plus particulièrement d'un membre de l'ordre des Saccharomycetales d'après les meilleures réponses (e-value les plus faibles) (figure 35)

Les 5 clones G294, G554, H508, I39 et I334 codent des saccharopines déshydrogénases et sont tous issus du criblage de la banque de Balen. Ces 5 protéines sont 100% identiques (figure 36). Au niveau phylogénétique, ces protéines seraient issues d'Opisthokontes (figure 37).

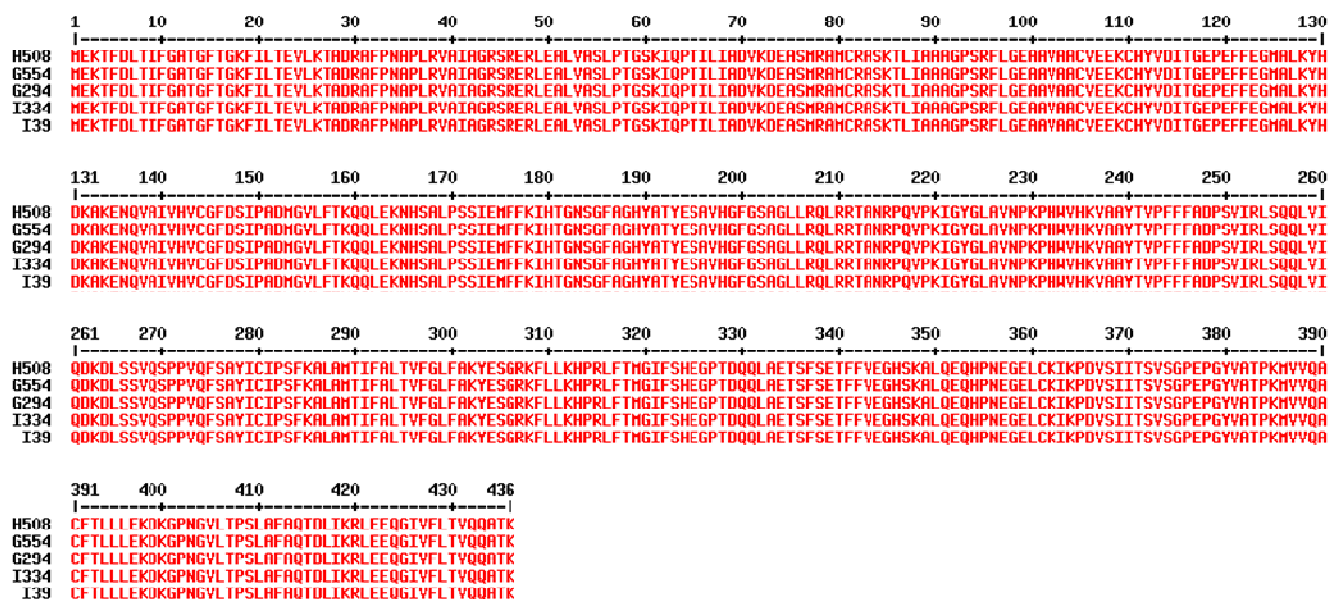
Les protéines Skp1, identifiées d'après 56 ADNc discriminés lors des criblages des trois banques environnementales, représentent le groupe majoritaire d'ADNc isolés pour leur tolérance au zinc. Ces ADNc sont présents dans les trois banques de sol (pollué, anciennement pollué et non pollué). Leurs organismes d'origine permettent de créer deux sous-groupes, un (figure 38, B) dont l'origine est un membre des Plantae (vraisemblablement *Pinus sylvestris*, retrouvé sur le site), le deuxième (figure 38, A) est proche (d'après les résultats de l'analyse du BLAST) de *Dictyostelium discoïdeum*, un Unikonte du règne des Amoebozoa.



**Figure 34 :** Test final de complémentation de la souche mutante  $\Delta Zrc1$  par les plasmides issus des banques métatranscriptomique. Les souches sauvages BY4741 (Wt) et  $\Delta zrc1$  transformées par le gène MTP2 de peuplier servent de témoins positifs. La souche  $\Delta zrc1$  transformée par le vecteur vide sert de témoin négatif. Tous les clones testés ont une croissance supérieure à celle du témoin négatif sur les milieux contenant du zinc. Ubiq : Ubiquitine, SaccDH : saccharopine deshydrogenase, Cytb5 : protéine proche d'une Cytochrome b5



**Figure 35 :** Résultats suite à l'analyse par Blast de l'insert J280 de la banque métatranscriptomique de Lommel. Cet ADNc code une poly-ubiquitine, isolé d'un organisme appartenant à l'ordre des Saccharomycetale. L'e-value représente la probabilité de similarité; plus l'e-value est petite plus la séquence désignée est proche de celle utilisée comme matrice à ce test (la séquence blastée) . La partie haute de la figure présente les domaines protéiques putatifs reconnus par le logiciel de Blast. Les numéros d'accension donnés sont ceux du site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)



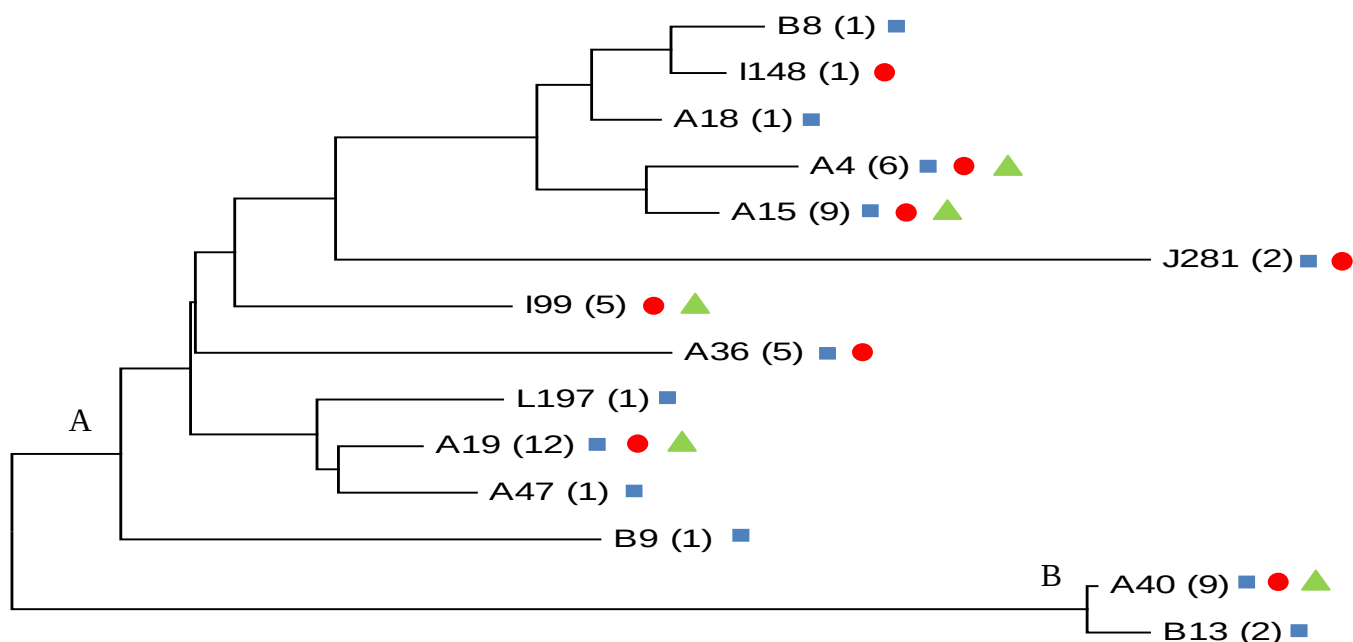
**Figure 36 :** Alignement des séquences protéiques des Saccharopines déshydrogénase H508, G554, G294, I39 et I334 issues du criblage de la banque environnementale de Balen. Les 5 séquences protéiques sont identiques à 100%.

#### Sequences producing significant alignments:

| Accession                      | Description                                                                                             | E value |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <a href="#">NP_001085942.1</a> | saccharopine dehydrogenase (putative) [Xenopus laevis] >gb AAH73574.1  MGC82870 protein [Xenopus        | 3e-85   |
| <a href="#">XP_002125674.1</a> | PREDICTED: similar to saccharopine dehydrogenase a [Ciona intestinalis]                                 | 5e-85   |
| <a href="#">NP_001012893.1</a> | probable saccharopine dehydrogenase [Gallus gallus] >emb CAG31040.1  hypothetical protein [Gallus ga    | 6e-85   |
| <a href="#">XP_001744297.1</a> | hypothetical protein [Monosiga brevicollis MX1] >gb EDQ91000.1  predicted protein [Monosiga brevicollis | 6e-85   |
| <a href="#">XP_001639381.1</a> | predicted protein [Nematostella vectensis] >gb EDO47318.1  predicted protein [Nematostella vectensis]   | 7e-85   |

**Figure 37 :** Résultats suite à l'analyse par Blast de l'insert H508 de la banque métatranscriptomique de Balen. Cet ADNc code une saccharopine déshydrogénase. L'e-value représente la probabilité de similarité; plus l'e-value est petite plus la séquence désignée est proche de celle utilisée comme matrice à ce test (la séquence blastée). Les numéros d'accension donnés sont ceux du site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les 5 saccharopines déshydrogénases issues de la banque du site de Balen ont leur origine chez les Opisthokontes.





**Figure 38 :** Arbre phylogénétique des différentes protéines Skp1 isolés lors du criblage. Les noms des clones isolés sont indiqués aux extrémités des branches de l'arbre. Le nombre entre parenthèse indique le nombre total de séquences identiques obtenues à partir des trois banques. La provenance des séquences est indiquée par un signe : site pollué de Balen (rond rouge), site anciennement pollué de Lommel (carré bleu) et site non pollué de Paal (triangle vert).

A



B

Sequences producing significant alignments:

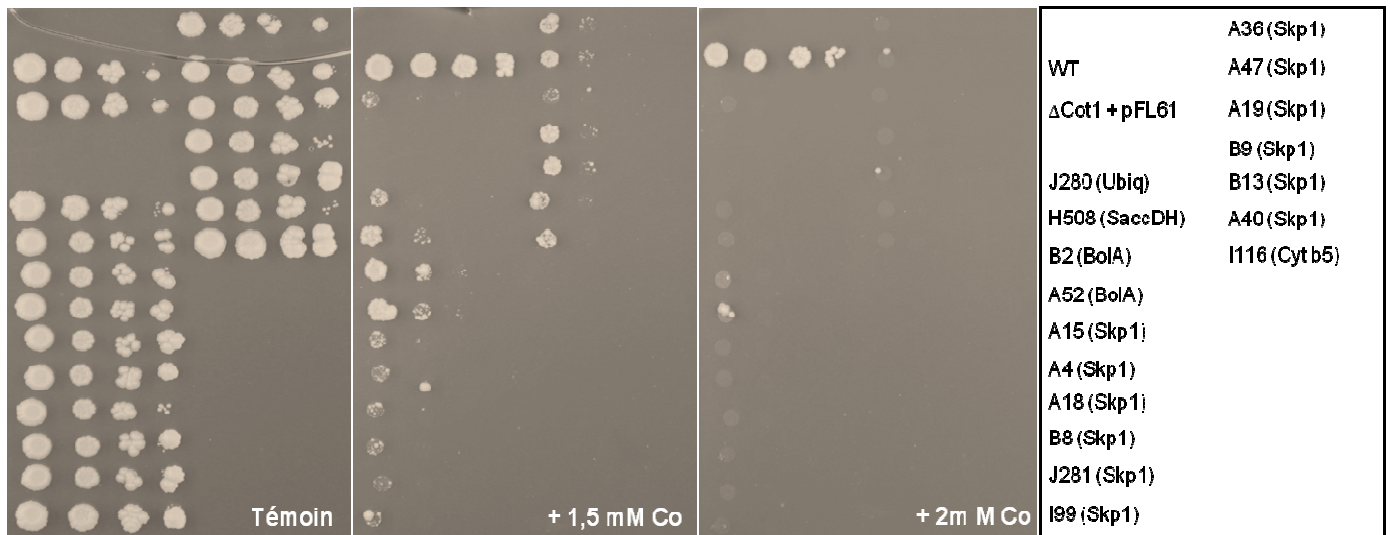
| Accession                   | Description                                                                                              | E value |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <a href="#">ABK22779.1</a>  | unknown [Picea sitchensis] >gb ABK25529.1  unknown [Picea sitchensis]                                    | 4e-46   |
| <a href="#">ABK24942.1</a>  | unknown [Picea sitchensis]                                                                               | 8e-32   |
| <a href="#">NP_568217.1</a> | BolA-like family protein [Arabidopsis thaliana] >dbj BAB09404.1  unnamed protein product [Arabidopsis t] | 2e-29   |

C

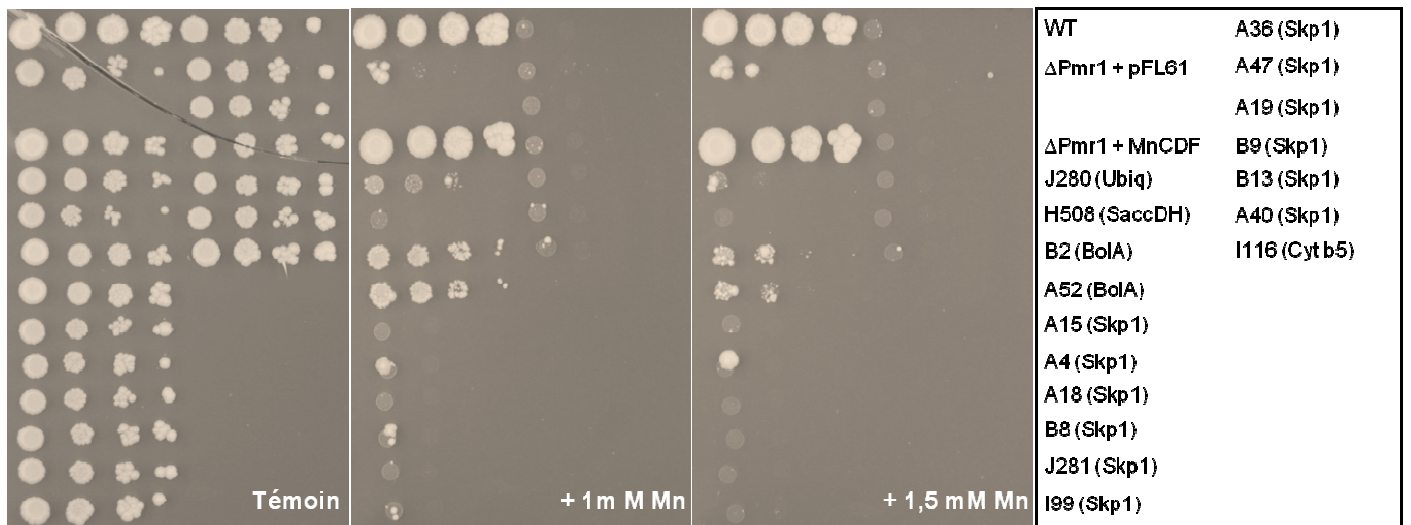
Sequences producing significant alignments:

| Accession                      | Description                                                                                         | E value |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <a href="#">XP_001605871.1</a> | PREDICTED: similar to BolA protein, putative [Nasonia vitripennis]                                  | 4e-33   |
| <a href="#">XP_002596077.1</a> | hypothetical protein BRAFLDRAFT_202892 [Branchiostoma floridae] >ref XP_002596098.1  hypothetical p | 6e-33   |
| <a href="#">XP_002732777.1</a> | PREDICTED: bolA-like 1-like [Saccoglossus kowalevskii]                                              | 1e-32   |

**Figure 39 :** Analyse des deux sous-familles de protéines BolA retrouvées lors des cribles. Les deux sous-familles de protéines BolA retrouvées dans nos banques ont des séquences divergentes. La couleur rouge indique une similarité entre les acides aminés des deux séquences protéiques, les couleurs bleu et noir une divergence (A). Les différences entre les séquences des deux sous-familles peuvent être expliquées par leurs origines différentes, les membres du groupe A52 étant apparentés aux Plantae (B) alors que les membres du second groupe seraient proches des Opisthokontes (C). L'e-value représente la probabilité de similarité; plus l'e-value est petite plus la séquence désignée est proche de celle utilisée comme matrice à ce test (la séquence blastée). Les numéros d'accèsion donnés sont ceux du site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



**Figure 40 :** Tests de tolérance au cobalt de la souche mutante  $\Delta$ Cot1 transformée par les différents plasmides issus des tests de criblage nancéien avec les banques environnementales d'ADNc. La souche sauvage BY4741 (WT) transformée par un vecteur vide sert de témoin positif alors que la souche  $\Delta$ cot1 transformée par le vecteur vide sert de témoin négatif. Sur toutes les souches testées, seules celles transformées par le plasmide contenant l'ADNc de BolA présentent une légère tolérance au cobalt. Ubiq : Ubiquitine, SaccDH : saccharopine deshydrogenase, Cytb5 : protéine proche d'une Cytochrome b5



**Figure 41 :** Test de tolérance au manganèse de la souche mutante  $\Delta$ Pmr1 transformée par les différents plasmides issus des tests de criblage nancéien avec les banques environnementales d'ADNc. La souche sauvage BY4741 (WT) transformée par un vecteur vide pFL61 et  $\Delta$ Pmr1 transformée par le vecteur pFL61-MnCDF (MnCDF est un transporteur de *Phanerochaete chrysosporium* de la famille CDF conférant une tolérance au manganèse) servent de témoins positifs alors que la souche  $\Delta$ pmr1 transformée par le vecteur vide sert de témoin négatif. Sur toutes les souches testées, seules celles transformées par le plasmide contenant l'ADNc de BolA ou de l'ubiquitine améliorent légèrement la tolérance au manganèse de la souche mutante. Ubiq : Ubiquitine, SaccDH : saccharopine deshydrogenase, Cytb5 : protéine proche d'une Cytochrome b5.



12 ADNc proches de la famille BolA ont été criblées. 8 sont issus de la banque de Lommel et 4 de celle de Balen. Les séquences protéiques correspondant à ces ADNc peuvent être séparées en deux sous-groupes suivant leur appartenance aux Plantae ou aux Opisthokontes (figure 39).

Un ADNc unique, I116, a été isolé sur la banque de Balen. Il code pour la partie C-terminale d'un cytochrome b5 d'origine inconnue. Les résultats d'analyse par BLAST les plus proches suggèrent une origine chez les Plantae (*Micromonas sp.*, *Ostreococcus sp.*) ou chez les Ascomycètes (*Tuber sp.*, *Gibberella sp.*).

### III.3.3. Tests phénotypiques de spécificité métallique :

Le but de ces tests était de vérifier la spécificité de la tolérance métallique apportée par les ADNc issus de l'étude métatranscriptomique réalisée à Nancy (criblage de clones tolérants au zinc dans la souche  $\Delta Zrc1$ ) et à Lyon (criblage de clones tolérants au cadmium dans les souches  $\Delta Ycf1$  et  $\Delta Yap1$ ).

Ces tests phénotypiques de la spécificité métallique sont réalisés à l'aide des souches  $\Delta Zrc1$  (déficiente dans la tolérance au zinc),  $\Delta Cot1$  (déficiente dans la tolérance au cobalt),  $\Delta Pmr1$  (déficiente dans la tolérance au manganèse),  $\Delta Ycf1$  (déficiente dans la tolérance au cadmium),  $\Delta Yap1$  (déficiente dans la tolérance au cadmium) et tests de résistance à un stress oxydatif dû à la ménadione (un agent oxydant).

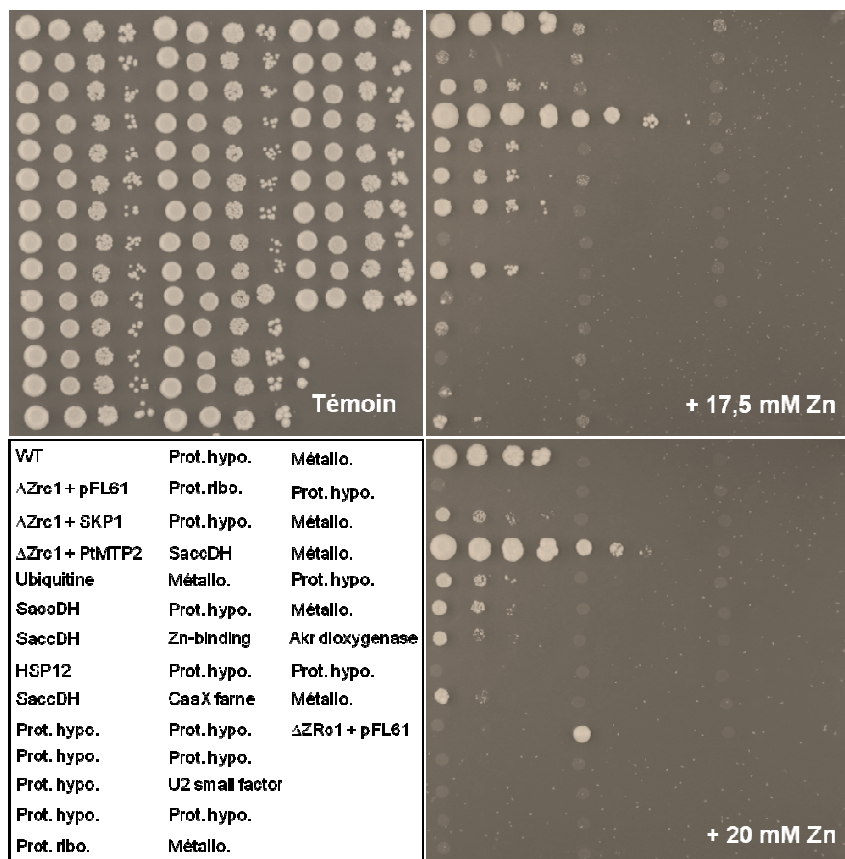
Ces tests ont été répartis entre les deux équipes du projet, l'équipe de Lyon s'occupant de l'étude de tous les clones dans les souches  $\Delta Ycf1$  et  $\Delta Yap1$  et de l'action d'un agent oxydant, la ménadione et l'équipe de Nancy s'occupant de l'étude de tous les clones dans les souches  $\Delta Zrc1$ ,  $\Delta Cot1$  et  $\Delta Pmr1$ .

Les plasmides contenant les inserts d'intérêt sont utilisés pour transformer ces souches mutantes de levure. Ces dernières sont  $\Delta Pmr1$  et  $\Delta Cot1$ , respectivement déficientes dans la tolérance au manganèse et au cobalt. Les transformants sont ensuite utilisés pour vérifier si nos inserts complémentent ces déficiences.

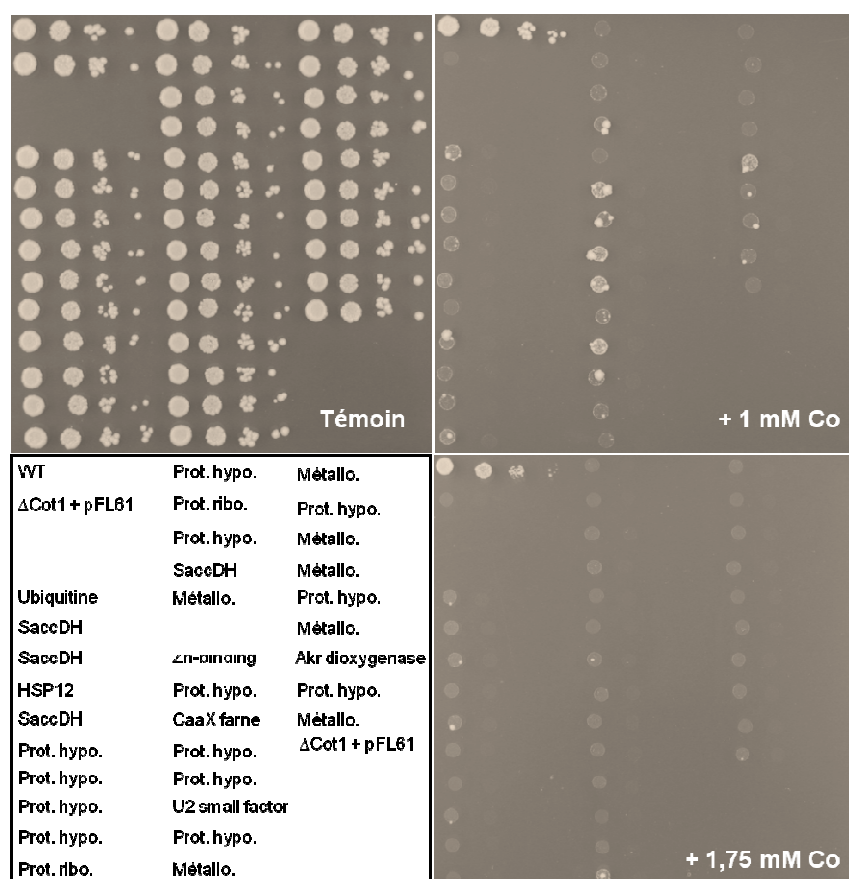
Concernant le cobalt, seuls les deux clones BolA restaurent partiellement le phénotype de la souche mutante  $\Delta Cot1$  sur un milieu contenant 1,5 mM de cobalt, cette restauration de phénotype n'est plus efficace quand la concentration de cobalt dans le milieu augmente (2 mM) (figure 40).

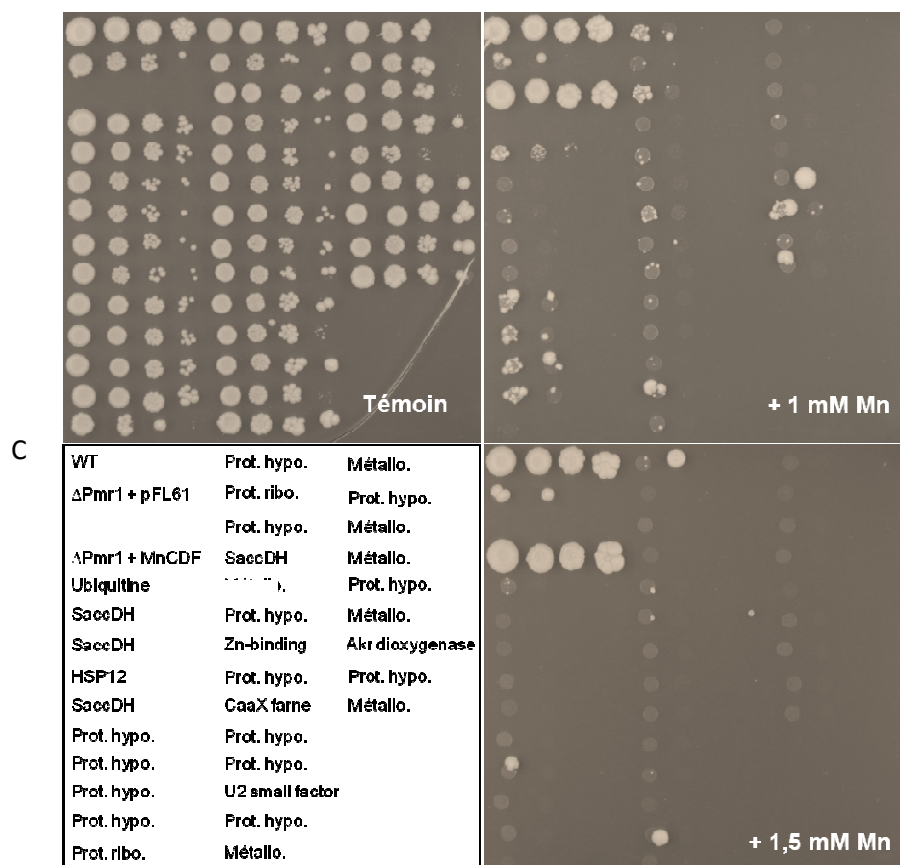
En ce qui concerne la souche  $\Delta Pmr1$  et sa déficience de croissance en présence de manganèse, le contrôle positif MnCDF, un transporteur de la famille CDF issu de *Phanerochaete chrysosporium* et conférant une résistance au manganèse, restaure complètement le phénotype

A



B





**Figure 42 :** Test de tolérance des souches  $\Delta$ Zrc1 (A),  $\Delta$ Cot1 (B) et  $\Delta$ Pmr1 (C) sur des milieux contenant respectivement du zinc, du cobalt et du manganèse. Les mutants déficients respectifs ont été transformés avec le vecteur vide pFL61 et servent de témoins négatifs. La souche sauvage, transformée par le vecteur vide sert de témoin positif. Des témoins positifs additionnels sont utilisés pour le zinc (SKP1 et PtMTP2, un CDF de peuplier conférant une tolérance au zinc) et le manganèse (MnCDF, un transporteur de *Phanerochaete chrysosporium* de la famille CDF conférant une tolérance au manganèse). Sacc. Dehydro : Saccharopine deshydrogenase ; HSP : Heat Shock Protein ; Prot. Hypo. : Protéine hypothétique ; Prot. Ribo : protéine ribosomique ; Métallo : métallothionéine ; Zn-binding : Zn-binding alcool deshydrogenase ; CaaX farne : CaaX farnesyltransférase ; U2 small factor : U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor ; Akr dioxygénase : alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase.

de la souche mutante  $\Delta Pmr1$ . La surexpression de l'ubiquitine et des clones BolA a également un effet quand la concentration de manganèse est basse dans le milieu (1mM de manganèse, figure 41) mais n'a plus qu'un effet moindre quand celle-ci augmente pour les clones BolA, alors que le clone ubiquitine ne pousse plus du tout (à partir de 1,5 mM).

En parallèle à cette étude portant sur la tolérance au zinc, nos partenaires lyonnais ont étudiés les mêmes banques mais en tentant de compléter les souches  $\Delta Yap1$  et  $\Delta Ycf1$ , déficiente dans la tolérance au cadmium. Tous les plasmides issus du criblage réalisé par l'équipe lyonnaise restaurent le phénotype de sensibilité au cadmium de la souche  $\Delta Yap1$  ou de la souche  $\Delta Ycf1$ . Néanmoins aucun n'a d'effet bénéfique sur les souches  $\Delta Cot1$  et  $\Delta Pmr1$  (figure 42, respectivement B et C). Concernant le zinc, seuls les plasmides contenant les ADNc codant l'ubiquitine et les saccharopine deshydrogenases augmentent la tolérance du mutant au zinc, comme cela avait été le cas avec les plasmides extraits des criblages nancéiens.

#### III.3.4 Analyse des banques d'ADNc par séquençage massif :

D'autres banques d'ADNc ont été construites, cette fois dans le vecteur pDNR, à partir du sol de Balen et du sol de Paal. Ces dernières ont fait l'objet d'un séquençage massif par le Génoscope (Evry, France). Un programme de séquençage de 30.000 inserts d'ADNc de ces deux banques (sites pollué et non pollué) a été réalisé. L'analyse des données a débuté dans la thèse de F. Lehembre (2009), d'autres analyses sont en cours. Les principaux résultats actuels sont cités ci-dessous.

Une différence significative de taille moyenne des ADNc est observée entre les séquences de Balen (420 pb en moyenne) et celles de Paal (480 pb en moyenne).

Les séquences ont été classées en séquences codant des protéines de fonctions connues, en séquences codant des protéines hypothétiques, soit encore en séquences sans homologues dans les bases de données (c'est-à-dire possédant une  $e\text{-value} > 1e-5$ ). Pour chacune de ces catégories, des différences significatives ont été observées entre les jeux de séquences des deux sols testés. Ainsi, un nombre plus important de nouvelles protéines potentielles est observé à Balen. Une étude plus approfondie sera nécessaire pour s'assurer que ce sont bien des séquences pleine longueur et non des séquences tronquées qu'expliquerait aisément la taille moyenne basse des séquences issues de Balen.

En ce qui concerne la catégorie des protéines de fonctions connues, les données actuelles mettent en évidence des différences significatives concernant la répartition fonctionnelle de ces protéines entre les séquences issues des deux sols. Malgré cela, aucune différence significative concernant le nombre de protéines impliquées dans la réponse au stress n'a été observée.

### III.4. Discussion

En étudiant l'ensemble des gènes exprimés par une communauté de microorganismes eucaryotes, soit son métatranscriptome, dans des conditions données (lieux, paramètres physico-chimiques, ...), nous pouvons apprécier l'état physiologique de cette dernière et les moyens qu'elle met en œuvre pour s'adapter à son environnement.

Nous nous sommes intéressés à trois sols (figure 28) : un sol pollué issu du site de Balen, un sol anciennement pollué issu de Lommel et un sol non pollué issu de Paal.

Nous allons maintenant discuter des différentes étapes et résultats de ce projet.

#### III.4.1. L'échantillonnage :

La première étape cruciale et limitante en ce qui concerne la qualité des banques obtenues est l'échantillonnage. Principale différence entre les études *in situ* et *in vitro*, cette étape peut énormément affecter la représentativité des microorganismes présents dans un échantillon environnemental. Pour notre étude, l'échantillonnage du sol sur les sites d'intérêt a été effectué en 20 points de prélèvement, sur une surface assez importante (environ 50 m<sup>2</sup>). Pour respecter la biodiversité présente sur les sites, une grande quantité de matériel a été prélevé en chaque point. Un tamisage du sol nous a permis d'écarter une majorité des macroorganismes, néanmoins, la présence de séquences de plantes supérieures, comme des membres de la famille SKP1 de *Pinus sylvestris* par exemple, nous indique un biais lié au tamisage. Néanmoins, on peut supposer qu'un tamisage plus fin, si possible dans des délais courts, entraînerait de plus fortes perturbations du sol et des communautés de microorganismes d'intérêts.

Pour limiter les modifications du profil d'expression de gènes des communautés de microorganismes de nos échantillons, une congélation du sol dans de l'azote liquide a été effectuée rapidement, elle fut suivi d'un stockage à -70°C. Pour limiter les biais liés à l'échantillonnage, tous les sols ont été traités (prélèvements, congélation, stockage) rapidement et identiquement.

#### III.4.2. L'extraction d'acides nucléiques :

L'autre étape critique lors de la construction des banques fut l'extraction des acides nucléiques. Les ARNs, intacts, d'une métacommunauté sont extrêmement difficiles à obtenir du fait de leur faible stabilité (demi-vie très courte et sensibilité extrême aux nucléases ubiquistes).

De nombreuses études ont utilisé l'extraction d'acides nucléiques pour étudier la diversité des communautés procaryotes (Nagata et al., 2010 ; Poretsky et al., 2009; Sagova-Mareckova et al., 2008). Mais, ceci est plus difficilement réalisable avec les microorganismes eucaryotes notamment à cause de la taille des génomes des eucaryotes, l'absence de protocoles permettant une séparation facile des cellules eucaryotiques et procaryotiques, ...

Nos partenaires lyonnais du projet EUMETATOX ont déjà utilisé un protocole d'extraction qui s'est avéré efficace (Bailly *et al.*, 2007). Lors de celui-ci, on limite les biais liés à la distribution hétérogène des microorganismes dans les sols en prenant une grande quantité de sol (plusieurs centaines de grammes pour les extractions). Ainsi ce protocole, détaillé dans le chapitre II.3.1.3, a permis d'extraire, indépendamment, des ADN et des ARNs à partir des sols d'intérêt ainsi que de construire les banques d'ADNc environnementales.

#### III.4.3. Etude de la diversité fonctionnelle de communautés d'intérêt :

Dans ce projet, nous avons voulu étudier la diversité fonctionnelle trouvée dans des communautés de microorganismes dans leur environnement. Une approche métatranscriptomique a alors été utilisée. Comme décrit dans l'introduction (chapitre I.3.3), cette technique d'étude est, depuis peu, utilisée pour l'étude de microorganismes procaryotes de l'environnement terrestre (Leininger et al., 2006; Urich et al., 2008) ou marin (Frias-Lopez et al., 2008; Gilbert et al., 2008; Poretsky et al., 2009). Ces études ont montrés que cette approche permet de détecter de nouveaux gènes susceptibles de coder de nouvelles fonctions.

Les banques métatranscriptomiques issues des sols d'intérêt ont été analysées suivant deux approches. La première est basée sur le séquençage aléatoire massif des banques du sol pollué (site de Balen) et du sol non pollué (site de Paal) (non étudié ici). La seconde est basée sur le criblage fonctionnel de 3 banques d'ADNc environnementaux dans un hôte hétérologue eucaryote, *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette approche originale de criblage d'une banque environnementale par complémentation fonctionnelle a déjà été testée auparavant par nos partenaires lyonnais (Bailly *et al.*, 2007). Lors de cette étude, les auteurs ont identifié deux ADNc, probablement issus d'un Basidiomycètes pour le premier et d'un Ascomycètes pour le second, qui restaurent le phénotype de la souche de levure mutante  $\Delta His3$ .

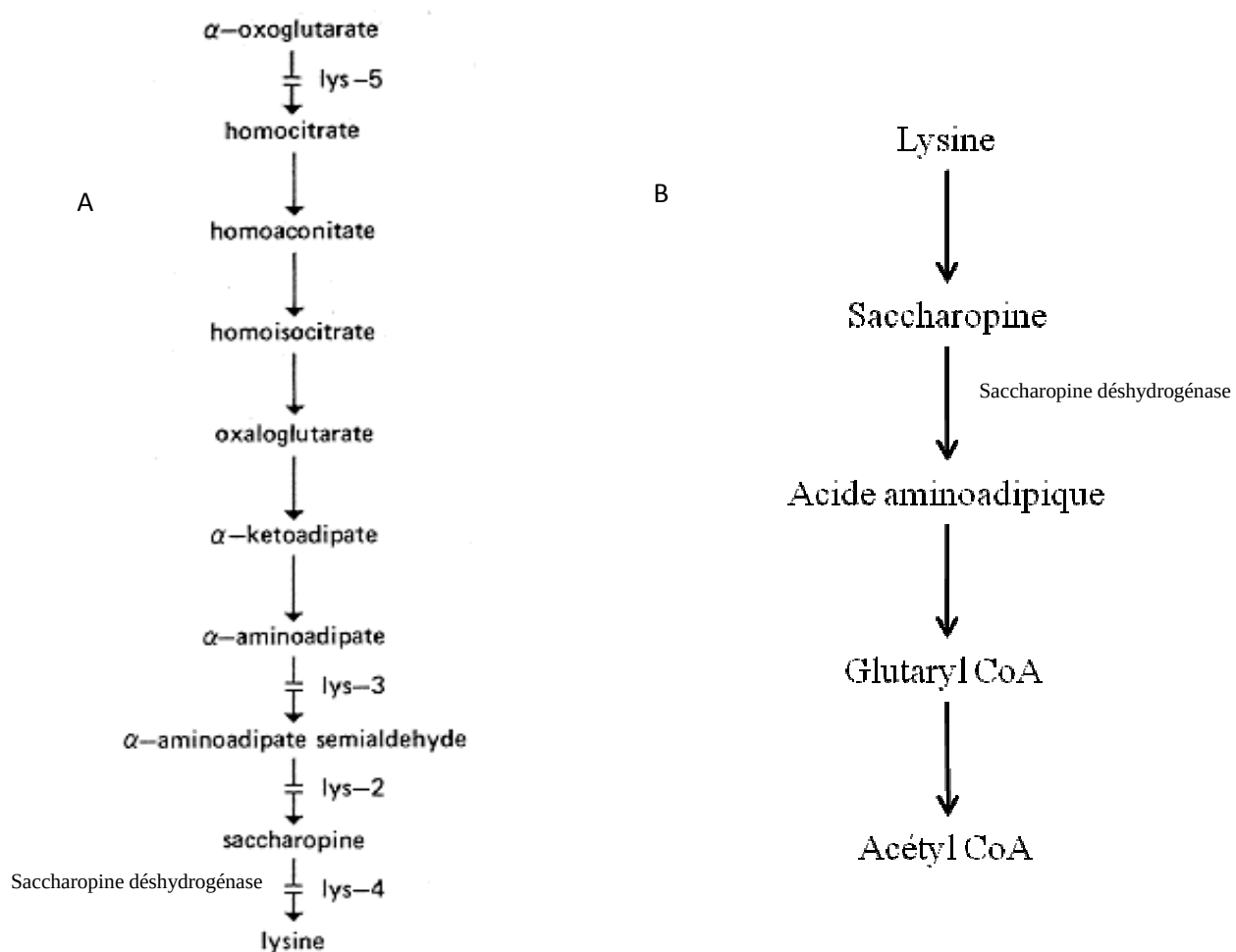
Pour l'étude de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes, le criblage fonctionnel des banques visait à sélectionner des gènes capables de compléter le phénotype de sensibilité au zinc d'une souche mutante de *S. cerevisiae*,  $\Delta Zrc1$ .

Aucun des gènes issus de notre étude n'est homologue à *Zrc1*. Ce résultat était prévisible car lors de la construction des banques, l'amplification des ARNm rétrotranscrits par PCR avec des amorces fournies par le kit a généré des ADNc de tailles comprises entre 0,1 et 2 kb pour les 3 sols (Lehembre, 2009) alors que les transporteurs sont généralement de tailles supérieures à 2kb (Migeon et al, 2010).

Les clones identifiés se divisent en 5 familles de gènes (III.3.2.2, tableau 19) : une protéine proche du cytochrome b5, une famille de saccharopines déshydrogénases, une famille proche de Skp1, une polyubiquitine et une famille nommée BolA. Nous allons émettre ici les hypothèses les plus probables quant à leur implication dans la tolérance au zinc, et suggérer des études complémentaires nécessaires afin de vérifier ces hypothèses.

#### III .4.3.1. La protéine similaire au cytochrome b5 :

La séquence du clone « I116 » correspond à la partie C terminale du cytochrome b5. Cette dernière est une protéine de transfert d'électrons qui possède un ou deux groupements hème. Ces protéines sont présentes chez les animaux, les plantes et les champignons. Le cytochrome b5 possède un large éventail de propriétés et de fonctions dans un grand nombre de différents processus d'oxydo-réduction (Arinç et Cakir, 1999). Les cytochromes P450 (P450) sont une famille d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif d'une variété de composés endogènes et exogènes lipophiles. Une mauvaise régulation du cycle catalytique des P450 entraîne une production en continu d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Zangar et al., 2004). On dénombre deux membres de la famille des cytochromes P450 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (ERG5 et ERG11) (Skaggs et al, 1996; Truan et al., 1994). Comme cela a été montré dans l'introduction, une concentration toxique de métal dans la cellule entraîne, elle aussi, la production de ROS.



**Figure 43 :** La saccharopine déshydrogénase intervient dans la synthèse (A) et la dégradation (B) de la lysine.



Le cytochrome b5 est un acteur des réactions rédox des P450, il interagit directement avec celles-ci notamment en induisant des changements conformationnels qui ont pour effet de stimuler l'action des P450 (Fin et al, 2008). La surexpression de l'ADNc du cytochrome b5 lors de nos tests a pu réguler de manière plus efficace l'action des P450 et ainsi empêcher une formation de ROS supplémentaire par cette fonction. Ce mécanisme indirect limiterait la production des ROS mais n'agirait ni sur la quantité de métal dans les différents compartiments de la cellule ni sur les effets toxiques des métaux sur les protéines cellulaires. Ce constat est cohérent avec une restauration du phénotype des mutants beaucoup moins efficace que celles des autres ADNc étudiés.

.

#### III.4.3.2. Les saccharopines déshydrogénases :

Le crible « tolérance au zinc » a permis l'identification d'une saccharopine déshydrogénase, dont l'origine est potentiellement animale. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de la lysine mais aussi dans sa dégradation (figure 43). Des analyses complémentaires permettront de mieux caractériser le rôle de cette protéine dans la réponse au stress oxydant.

5 exemplaires de cette protéine ont été séquencés dans les clones positifs issus des transformations avec la banque de Balen mais aucun sur les autres banques. Il semblerait donc qu'il y ait une spécificité de surexpression de cette protéine par des communautés de microorganismes eucaryotes liée à une contamination des sols par des métaux lourds. Ces protéines ont aussi été identifiées dans le criblage cadmium. La réponse observée n'est donc pas spécifique au zinc et concernait plutôt les effets des métaux (stress oxydant par exemple) que la présence même des métaux. Floor et al. (2006) ont montré que la lysine est une cible privilégiée des stress oxydants. Ainsi, la surexpression de l'ADNc de la saccharopine déshydrogénase aurait stimulé la biosynthèse de lysine contrant de cette manière l'altération due au stress oxydant. D'une manière plus générale, les modifications métaboliques engendrées par la surexpression de la saccharopine deshydrogénase semblent induire un « fitness » supérieur pour les cellules (croissance plus rapide) (Laurence Fraissinet-Tachet, communication personnelle). Une analyse des pools de lysine et d'autres acides aminés serait ainsi à considérer par exemple.

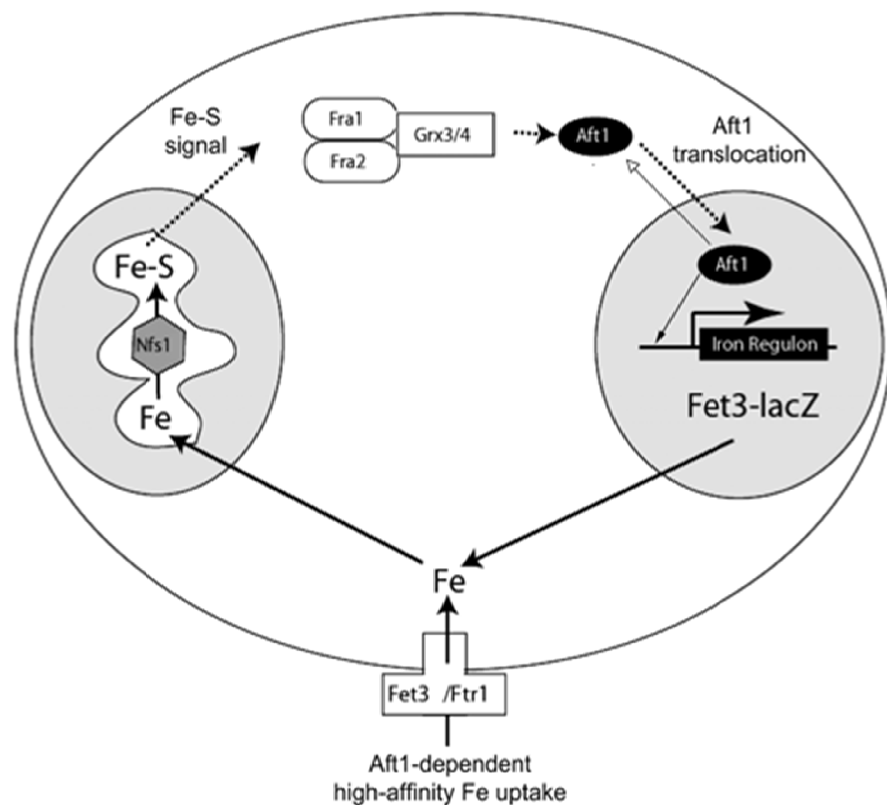


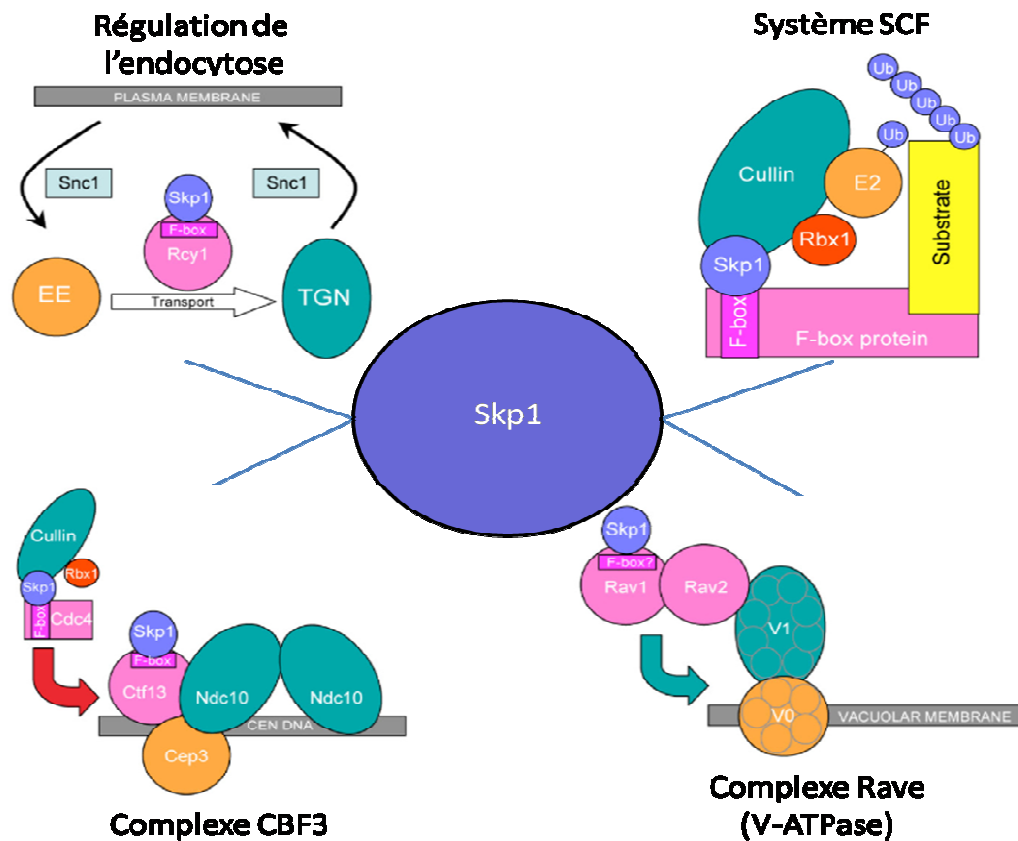
Figure 44 : Modèle pour le rôle de FRA1-FRA2 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'AFT1. En condition de carence en fer, on observe une diminution de la synthèse de centres Fe-S qui entraîne une diminution de l'activation du complexe FRA1-FRA2-Grx3-Grx4. Ce complexe inhibe la translocation d'AFT1 dans le noyau. Le complexe ne liant plus AFT1, ce dernier est transloqué dans le noyau et y induit la transcription de ses gènes cibles, comme Fet3-Ftr1. D'après Kumanovics et al. (2008)

#### III.4.3.3. Les protéines BolA :

Les membres de la famille des protéines BolA sont très répandus (Huynen et al., 2005). Chez *E.coli*, il a été démontré par Santos et al. (1999) que les niveaux d'expression des ARNm BolA augmentent largement suite à différentes contraintes, telles que la carence en carbone, un stress osmotique, un choc thermique, un stress acide ou un stress oxydatif.

A ce jour, plusieurs rôles ont été décrits dans la littérature pour les membres de la famille BolA :

- Vieira et al. (2004) ont démontré que BolA joue un rôle dans la formation de biofilm chez *E.coli*. La formation de biofilm est un moyen de protection contre les agressions extérieures très répandues chez les microorganismes.
- Santos et al. (2002) ont montré que le gène *bolA* régule les niveaux de transcription de la D, D-carboxypeptidases PBP5, de PBP6 et de la bêta-lactamase AmpC, qui sont tous impliqués dans le métabolisme de la muréine (constituant majeur de la paroi bactérienne). Ainsi, BolA a un effet majeur sur l'enveloppe bactérienne et est donc impliquée dans la protection cellulaire lors de conditions de croissances défavorables. BolA pourrait en effet conférer une protection à la cellule grâce à sa capacité à rendre la cellule plus petite et arrondie, provoquant une diminution de la surface exposée à l'environnement défavorable. Une étude envisageable serait d'exprimer l'ADNc des BolA issu des tests en système bactérien et de vérifier si on observe une action de formation de biofilm ou de réduction du stress par réduction de la taille des cellules.
- Des travaux sur FRA2 (homologue de Bol A chez la levure *S.cerevisiae*) ont montré son implication dans l'homéostasie au fer. La levure *Saccharomyces cerevisiae* exprime deux systèmes différents de transport de fer à affinité élevés. Un système est composé d'une famille de quatre transporteurs de sidérophores. Les sidérophores étant de petites molécules organiques présentant une affinité extrêmement élevée pour le fer (Van Ho et al., 2002). Bien qu'elle ne synthétise pas de sidérophores, la levure peut absorber les complexes sidérophores-fer produits par d'autres organismes. Le second système de transport de haute affinité au fer permet l'entrée du fer sous forme ionique. Il est composé d'une oxydase, Fet3, et d'une perméase transmembranaire, Ftr1. L'oxydase convertit  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ , qui est ensuite transporté par la perméase transmembranaire. AFT1 est un activateur transcriptionnel cytosolique qui, lorsque les cellules sont carencées en fer, est transloqué dans le noyau où il active la transcription



**Figure 45 :** La protéine SKP1 intervient dans de nombreux complexes en se fixant à d'autres protéines via une séquence F-box. SKP1 intervient dans la régulation de l'endocytose via Rcy1 (Galan et al., 2001; Wiederkehr et al., 2000). Le système SCF (Skp1/Cullin/F-box) est la troisième composante (E3) du système d'ubiquitination en vue de la dégradation de protéines ciblées (figure 46). Skp1 intervient aussi dans le complexe CBF3 au niveau du centromère et dans le complexe (Rave) de régulation de l'association des deux sous-unités de la V-ATPase (Seol et al., 2001). Modifié d'après Hermand (2006).

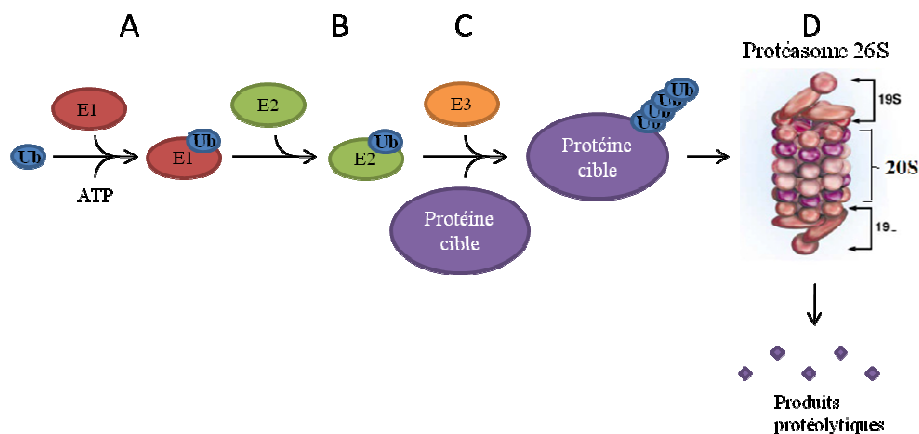


Figure 46 : Le système ubiquitine/protéasome. E1 active l'ubiquitine et la fixe par une liaison thioester (A), puis la transfère sur E2 qui la fixe également (B). E3 (ubiquitin-protein ligase) est nécessaire pour l'ubiquitinylation spécifique du substrat (C). Les protéines ubiquitinylées sont reconnues par le protéasome 26S qui les hydrolyse en oligopeptides. L'ubiquitine est recyclée.

d'une vingtaine de gènes (*Yamaguchi-Iwai et al., 2002*). Ces gènes sont organisés en régulon et comprennent notamment les transporteurs de sidérophores, le système de transport de fer de haute affinité FET3-FTR1, ainsi que les gènes impliqués dans le métabolisme du fer. AFT1 ne répond pas directement au fer, mais plutôt à la production de clusters fer-soufre dans les mitochondries (figure 44, Kumanovics et al. 2008). Ainsi, en présence de fer en quantité suffisante, des signaux ayant un complexe fer-soufre sont exportés hors des mitochondries, signaux interprétés par le complexe FRA1-FRA2-Grx3-Grx4. Ce complexe va inhiber la translocation d'AFT1 vers le noyau. En carence de fer, le signal n'est plus produit, l'inhibition disparaît, AFT1 peut donc jouer son rôle d'activateur transcriptionnel. On peut émettre l'hypothèse d'un lien (fréquent, voir chapitre IV) entre l'homéostasie au fer et celle d'autres métaux comme le zinc par exemple, ainsi la surexpression de la protéine BolA pourrait déstabiliser le complexe FRA1-FRA2-GRX3-GRX4 et entraînerait une action accrue d'AFT1. Ainsi plus de fer serait absorbé par les cellules, d'où une protection plus efficace contre les effets toxiques liés à un stress zinc.

#### III.4.3.4. Les Skp1 / Ubiquitine :

56 membres de la famille Skp1 et une ubiquitine ont été discriminés lors des criblages des trois banques. Skp1p est une protéine hautement conservée et surtout connue pour son appartenance au complexe SCF (Skp1/Cullin/F-box) (Deshaies, 1999a et b; Patton et al., 1998; Willems et al., 1999) qui est impliqué dans la dégradation de protéines (figure 45), mais Skp1 intervient aussi dans d'autres complexes tels le complexe Rave (chapitre III.3.2.2.3.1), un complexe de régulation de l'endocytose (Galan et al., 2001; Wiederkehr et al., 2000) ou le complexe CBF3 qui contribue à l'assemblage du kinétochore, la stabilité du fuseau mitotique et la coordination de la ségrégation des chromosomes (Seol et al. 2001). Notre hypothèse est qu'un de ces deux premiers complexes (SCF et Rave) serait la cause de l'augmentation de la tolérance au zinc observée chez le mutant  $\Delta Zrc1$  lors de nos criblages.

##### III.4.3.4.1. Le complexe Rave :

Les protéines Rav1, Rav2 et Skp1 s'associent en un complexe appelé RAVE (Régulateur de l'ATPase des membranes Vacuolaire et Endosomale). La V-ATPase est une pompe à protons ATP-dépendant transmembranaire (endosome et vacuole) (Kane, 1999; Kane et al, 1999). La

V-ATPase est une holoenzyme composée de deux complexes protéiques distincts, V0 et V1. Le complexe V0 est incorporé dans la membrane vacuolaire, contient cinq sous-unités et forme un canal à protons, alors que le complexe V1, présent à la surface cytosolique du complexe V0, comprend huit sous-unités (Nishi et Forgac, 2002). Le complexe RAVE favorise l'activité de la V-ATPase en stimulant l'assemblage de V1-V0. En l'absence de RAVE, V1 peut se lier à V0 (mais de manière très lente), mais le complexe assemblé est alors moins stable (Seol et al., 2001). L'importance de la vacuole pour la tolérance aux métaux lourds a été discutée dans le chapitre I.1.7.5, Skp1, qui appartient au système Rave, pourrait en agissant sur les ATPase vacuolaire agir sur la tolérance aux métaux. Le transport des cations métalliques à travers la membrane vacuolaire est médié par des transporteurs utilisant le gradient de pH entre le lumen vacuolaire et le cytosol et échangeant des cations-protons. Ce gradient de pH est alimenté par la V-ATPase (Ramsay et Gadd, 1997). En surproduisant Skp1, qui, de part ses multiples fonctions (notamment RAVE, SCF) pourrait être limitant dans le cytosol, on augmenterait l'efficacité de l'assemblage des V-ATPases, ainsi plus de transporteurs antiport  $H^+$ /Cation pourraient être actifs, ce qui résulterait en une meilleure séquestration de ces cations. Il serait intéressant de regarder si une destabilisation de RAVE contribue à une diminution de la résistance au Zn.

#### III.4.3.4.2. Le complexe SCF :

La protéolyse intracellulaire est une fonction cellulaire essentielle. Chez les eucaryotes, l'un des acteurs majeurs de la protéolyse intracellulaire est un système multi-enzymatique, le système ubiquitine/protéasome (Hershko et Ciechanover, 1998). Le système ubiquitine-protéasome implique la liaison covalente de plusieurs ubiquitines, protéines de 76 acides aminés hautement conservée, à des protéines ciblées pour leur dégradation.

Dans un premier temps, l'ubiquitine est activée et forme une liaison thioester avec une enzyme d'activation appelée aussi E1. Elle est ensuite transférée, en formant une autre liaison thioester, sur un membre d'une famille d'enzymes de conjugaison encore appelées E2. Malgré la potentialité de pouvoir transférer directement l'ubiquitine sur des protéines cibles, dans l'immense majorité des cas, un troisième composant, appelé ubiquitine ligase ou E3 est nécessaire. Ces chaînes permettent ensuite la reconnaissance et la dégradation des molécules polyubiquitinylées par le protéasome 26S (figure 46).

E3 joue un rôle primordial dans la reconnaissance des substrats. Il existe différentes classes d'E3. Ici nous nous concentrerons sur la classe SCF (Skp1/Cullin/protéine à domaine F-Box). SKP1 est en effet l'une des composantes de la SCF ubiquitine ligase (Zheng et al., 2002).

Des sous-unités adaptatrices, appelées protéines à domaine F-box reconnaissent, d'un côté, les substrats grâce à des motifs d'interaction protéine-protéine et, de l'autre, un complexe composé de trois sous-unités (Skp1, Cullin, Rbx1) grâce à une liaison entre le domaine F-box et Skp1 (figure 45).

De nombreuses études montrent qu'un rôle important est joué par le système de protéolyse ubiquitine/protéasome dans la tolérance à certains métaux, notamment le cadmium (Barbey et al., 2005; Harrison et al., 2005; Hwang et al., 2007; Hwang et al., 2008; Jungmann et al., 1993; Yen et al., 2005).

Certains transporteurs de métaux, tel Smf1 (Jensen et al., 2009) sont ubiquitinés puis dégradés quand il y a assez de substrat dans les cellules. De manière similaire, un taux suffisant de zinc dans les cellules inactive ScZRT1 (transporteur de zinc de haute affinité) en induisant l'endocytose de cette protéine puis sa dégradation par le système de protéolyse ubiquitine/protéasome (Gitan et Eide, 2000).

Lors des criblages des banques d'ADNc environnementales, un des ADNc restaurant le phénotype de la souche mutante code l'ubiquitine. Cette dernière est impliquée dans la protéolyse ubiquitine/protéasome où Skp1 intervient. Ce lien logique nous suggère que l'hypothèse selon laquelle Skp1 a permis la restauration du phénotype de la souche mutante de levure  $\Delta Zrc1$  sur un milieu contenant une concentration toxique en zinc en faisant intervenir le complexe SCF est la plus probable.

#### III.4.4. Conclusions :

Pour la première fois, des banques d'ADNc de microorganismes eucaryotes ont été construites à partir d'ARN extraits directement de sols.

Le criblage de ces banques environnementales dans des mutants de levure a été validé par complément fonctionnelle de mutants de levure. Les premiers gènes "environnementaux" conférant une résistance au Zn ont ainsi été isolés.

Notre approche innovante, la métatranscriptomique, nous a permis d'isoler 74 clones contenant des ADNc d'intérêt issus des banques créées à partir de nos sites d'étude et complétant la fonction d'un mutant de levure déficient dans la tolérance au zinc. Il est

intéressant de noter que l'approche fonctionnelle permet de sélectionner des gènes conférant une résistance au zinc aussi bien de sols contaminés que non contaminés par ce métal. Le séquençage de ces ADNc nous a permis d'identifier des familles de protéines de fonctions connues mais dont le lien avec la tolérance au zinc reste encore à approfondir (Skp1/ubiquitine, BolA, Saccharopine déshydrogenase). De même, en travaillant sur la tolérance au cadmium, l'équipe partenaire de Lyon a mis en évidence l'action de nouvelles protéines impliquées dans la résistance à ce métal (Lehembre, 2009).

D'une façon plus générale, cette stratégie devrait permettre, dans le futur, d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans des fonctions d'intérêt chez les microorganismes non-cultivables.

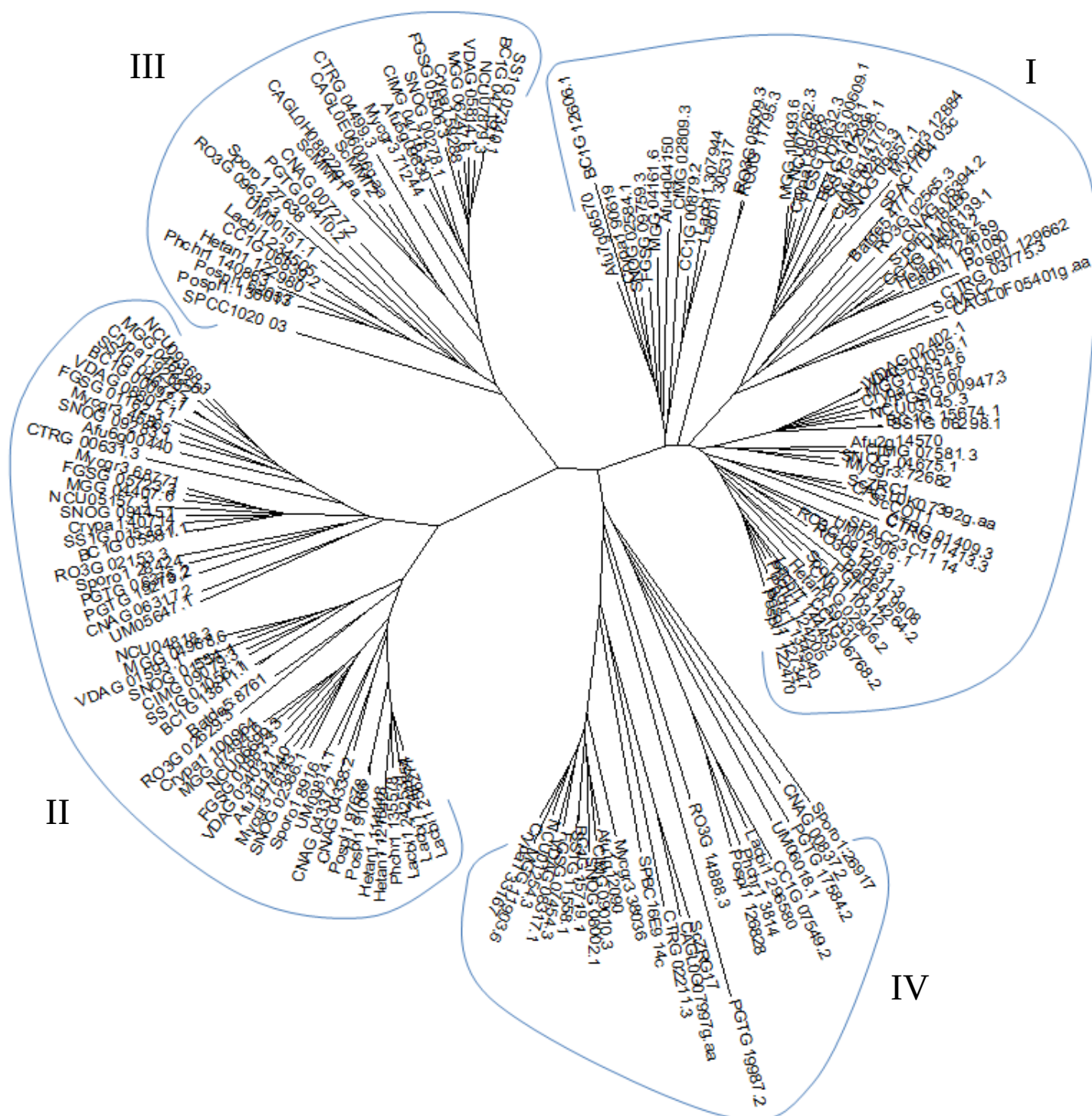




## Chapitre IV :

# Homéostasie au zinc chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

---



**Figure 47 :** Arbre phylogénétique des protéines de la famille CDF de 26 organismes fongiques. *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Candida glabrata* (CAGL), *Candida tropicalis* (CTRG), *Schizosaccharomyces pombe* (SP), *Aspergillus fumigatus* (Afu), *Coccidioides immitis* (CIMG), *Botritis cinerea* (BC1G), *Sclerotinia sclerotinium* (SS1G), *Fusarium graminearum* (FGSG), *Magnaporthe grisea* (MGG), *Neurospora crassa* (NCU), *Cryphonectria parasitica* (Crypa1), *Verticillium dahliae* (VDAG), *Stagonospora nodorum* (SNOG), *Mycosphaerella graminicola* (Mycgr3), *Puccinia graminis* (PGTG), *Sporobolomyces roseus* (Sporo1), *Ustilago maydis* (UM), *Coprinus cinereus* (CC1G), *Laccaria bicolor* (Lacbi1), *Cryptococcus neoformans* (CNAG), *Phanerochaete chrysosporium* (Phch1), *Postia placenta* (Pospl1), *Heterobasidion annosum* (Hetan1), *Rhizopus oryzae* (RO3G), *Batrachochytrium dendrobatidis* (Batde5). L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.0 après alignement des séquences protéiques avec CLUSTALX d'après la méthode du Neighbor-Joining (NJ).

Comme ce fut présenté dans l'introduction, l'import de zinc dans les cellules est principalement assuré par des transporteurs de la famille ZIP (Zrt-Irt-like Proteins), alors que les protéines de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) sont généralement impliquées dans l'homéostasie et/ou la tolérance au zinc. Ainsi, la deuxième partie de la thèse avait pour but l'étude de ces deux familles chez *Laccaria bicolor*.

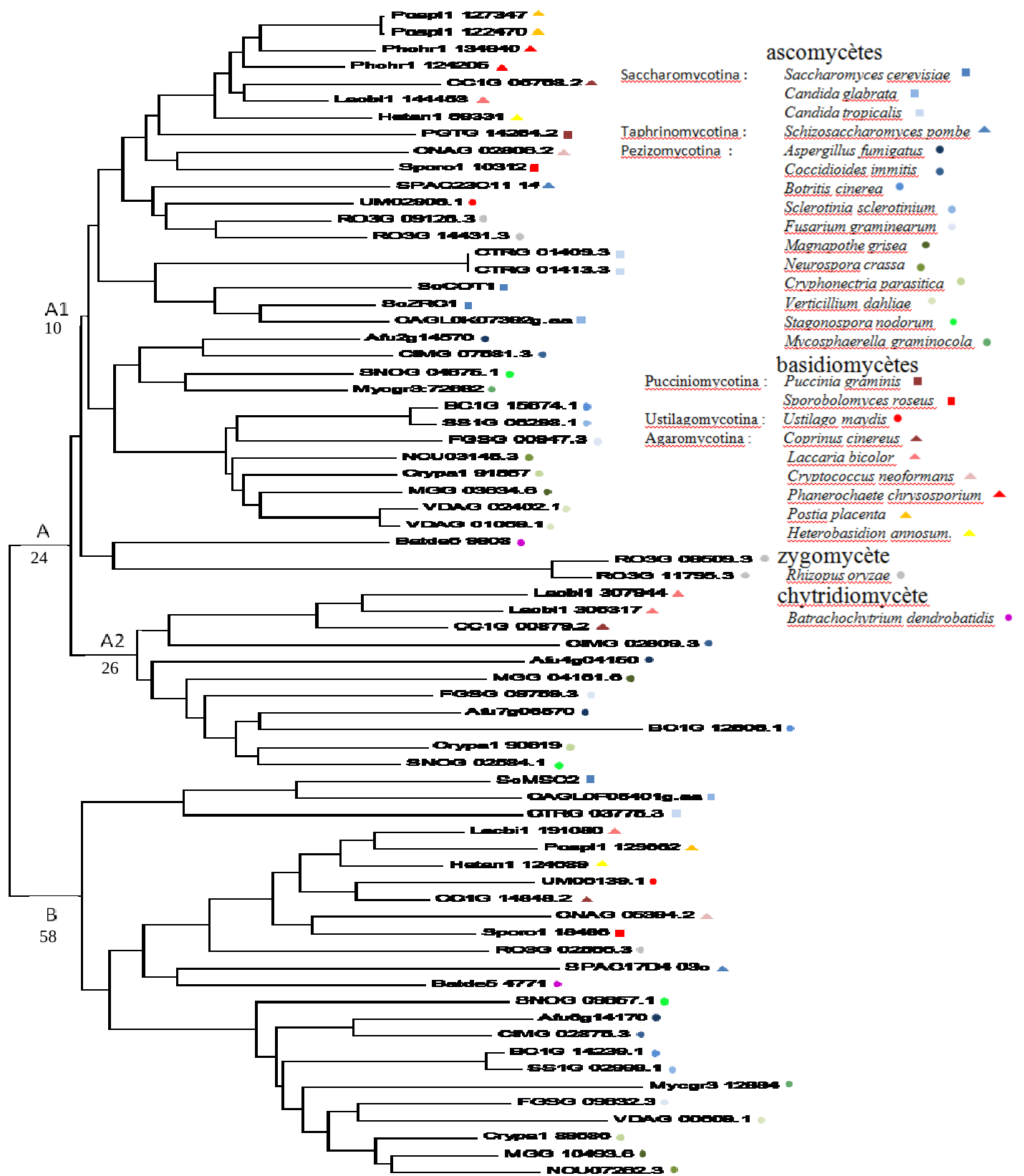
Dans une première sous-partie, nous nous proposons de caractériser la fonction des gènes CDF de *Laccaria bicolor* dans la tolérance au zinc. Ensuite, une étude similaire qui a porté sur la caractérisation des gènes ZIP est présentée.

#### IV.1. Tolérance au zinc de *Laccaria bicolor* médiée par les protéines CDF :

##### IV.1.1. Analyse phylogénétique des protéines fongiques de la famille CDF:

La présente étude considère 26 organismes : 15 Ascomycètes dont 3 Saccharomycotina (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*; 1 Taphrinomycotina (*Schizosaccharomyces pombe*), 11 Pezizomycotina (*Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Botritis cinerea*, *Sclerotinia sclerotinium*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Cryphonectria parasitica*, *Verticillium dahliae*, *Stagonospora nodorum*, *Mycosphaerella graminicola*). 9 Basidiomycètes dont 2 Pucciniomycotina (*Puccinia graminis*, *Sporobolomyces roseus*), 1 Ustilagomycotina (*Ustilago maydis*), 6 Agaromycotina (*Coprinus cinereus*, *Laccaria bicolor*, *Cryptococcus neoformans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Postia placenta*, *Heterobasidion annosum*), 1 Zygomycète (*Rhizopus oryzae*) et 1 Chytridiomycète (*Batrachochytrium dendrobatidis*). Ces organismes ont été choisis pour leur génome séquencé et leur représentativité de différents phyla fongiques.

Les séquences ont été obtenues par BLAST (en utilisant comme matrices les séquences des CDF déjà caractérisés) sur les bases de données de références de chacune de ces espèces (Annexe 1). Les séquences incomplètes (annexe 1) ont été corrigées manuellement par homologie avec les séquences déjà caractérisées, notamment celles de *S. cerevisiae*.



**Figure 48 :** Arbre phylogénétique des protéines de la famille CDF de la sous-famille I (Zn-CDF) des 26 organismes étudiés. L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.0 après alignement des séquences protéiques avec CLUSTALX d'après la méthode du Neighbor-Joining (NJ). Les Ascomycètes sont indiqués en bleu et vert, les Basidiomycètes en rouge et jaune, le Zygomycète en gris et le Chytridiomycète en violet. Dans un même phyla, les sous-phyla sont représentés par des formes différentes. Les valeurs de Bootstrap sont notées en chiffre.

L'analyse phylogénétique de cette famille révèle la présence de 4 sous-familles, numérotées de I à IV (figure 47). Ces subdivisions seraient notamment dues au substrat préférentiel du transporteur (Montanini et al., 2007) : les protéines transportant spécifiquement du zinc (sous-famille I), du manganèse (sous-famille II), du fer et du zinc (sous-famille III), et le cluster incluant ScZRG17 (sous-famille IV). Des arbres phylogénétiques ne regroupant que les membres d'une même famille ont été construits (figures 48, 49, 50 et 51).

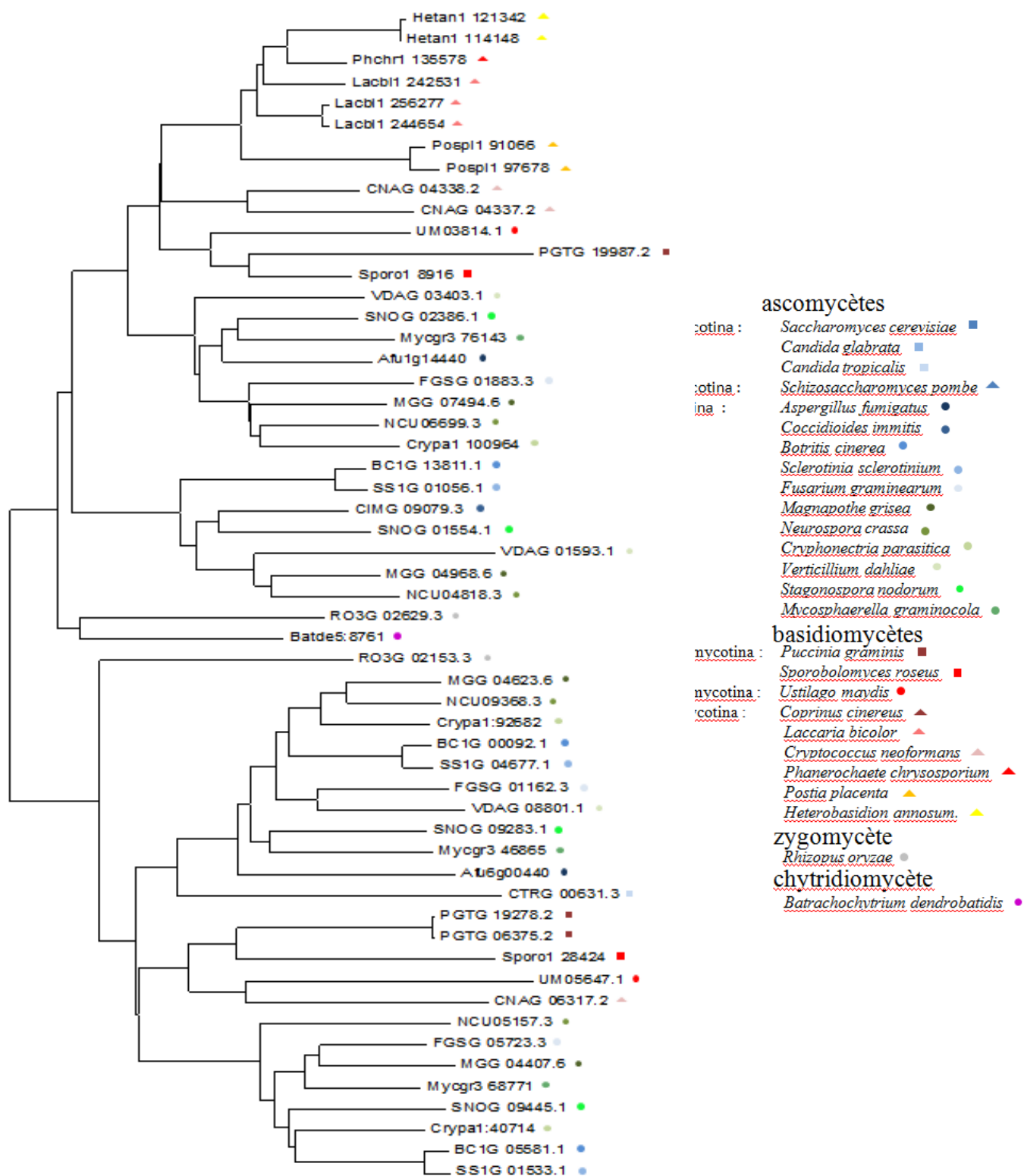
#### IV.1.1.1. Sous-famille I : Transporteurs de zinc : (figure 48)

A l'intérieur de cette sous-famille, deux clusters peuvent être identifiés. Le premier, plus important en nombre de membres, comprenant les représentants ScZRC1 et ScCOT1 de la levure (Cluster A, figure 48), le second contient ScMSC2 (Cluster B, figure 48).

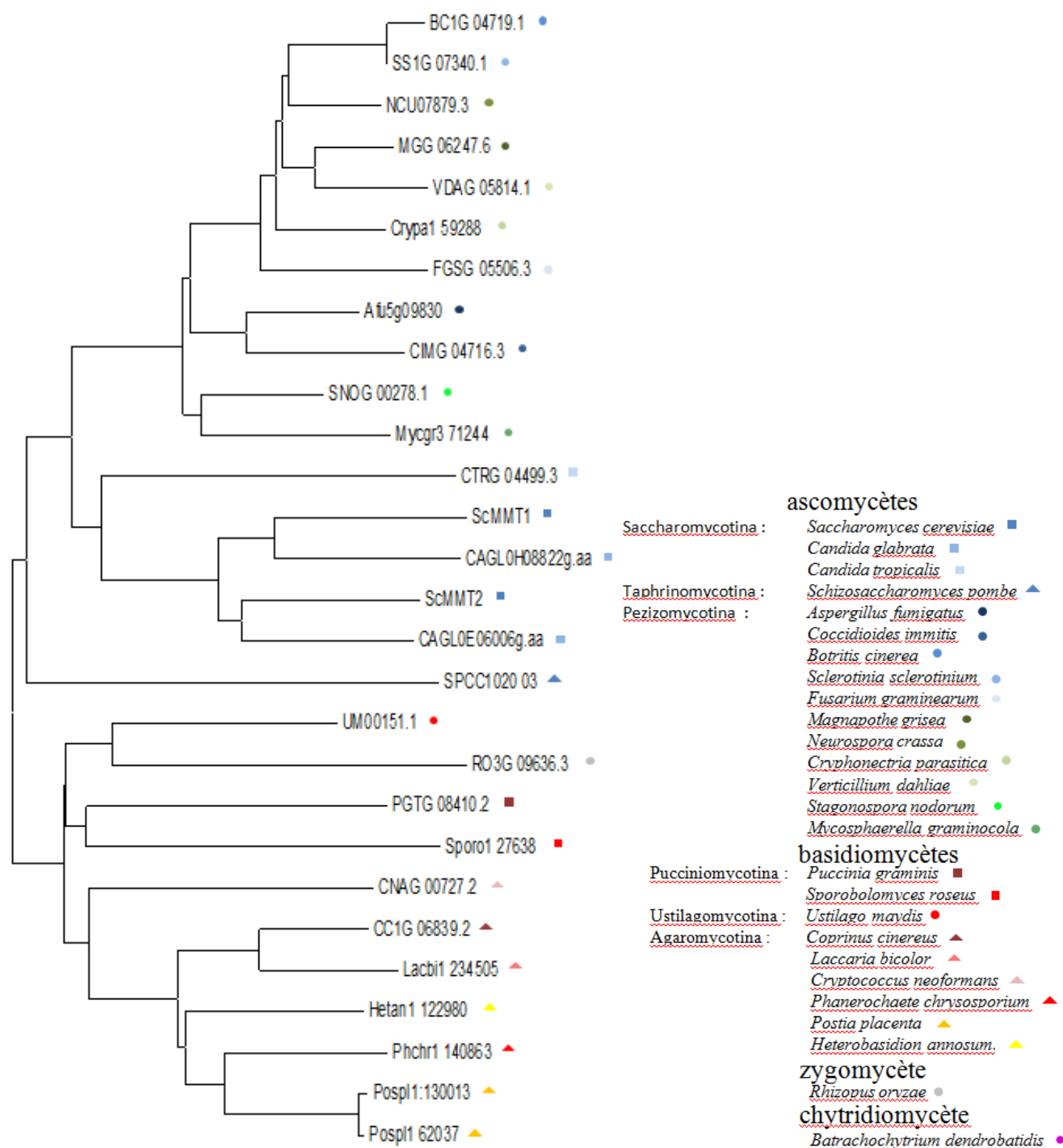
Dans le premier cluster, on retrouve les homologues ScCOT1 (MacDiarmid et al., 2000) et ScZRC1 (Kamizono et al., 1989), déjà caractérisés fonctionnellement..

De façon détaillée, 2 sous-clusters, A1 et A2 peuvent être identifiés (figure 48). Le premier comprend des transporteurs de tous les organismes étudiés, regroupés généralement par sous-phyla, alors que le second ne contient que quelques membres issus de deux des neuf basidiomycètes étudiés et 7 des 15 ascomycètes étudiés. Ce deuxième cluster semble être dû à une duplication-spéciation plutôt qu'à une perte de gène. Trois protéines CDF de *Laccaria bicolor* appartiennent à cette sous-famille. Un membre est présent dans le sous-cluster A1 (Lacbi1 14453, appelé LbCdfC dans la suite de ce mémoire) et 2 autres membres sont présents dans le sous-cluster A2 (Lacbi1 307944 et Lacbi1 305317 appelés respectivement LbCdfA et LbdfFB dans ce mémoire).

Le deuxième cluster (B) contient des protéines dont la séquence est plus longue que celle des protéines du cluster A. On y retrouve un transporteur de la levure, ScMSC2, caractérisé par Li et Kaplan (2001). La protéine ScMSC2 présente une localisation au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et nucléaire. Dans ce cluster, on observe une séparation des représentants des Saccharomycotina de ceux des Ascomycètes ainsi qu'un sous-cluster Ascomycètes – Basidiomycètes. Ce groupe comprend un gène de *Laccaria bicolor* : Lacbi1 191080 que l'on appellera LbCdfD dans la suite de ce manuscrit.

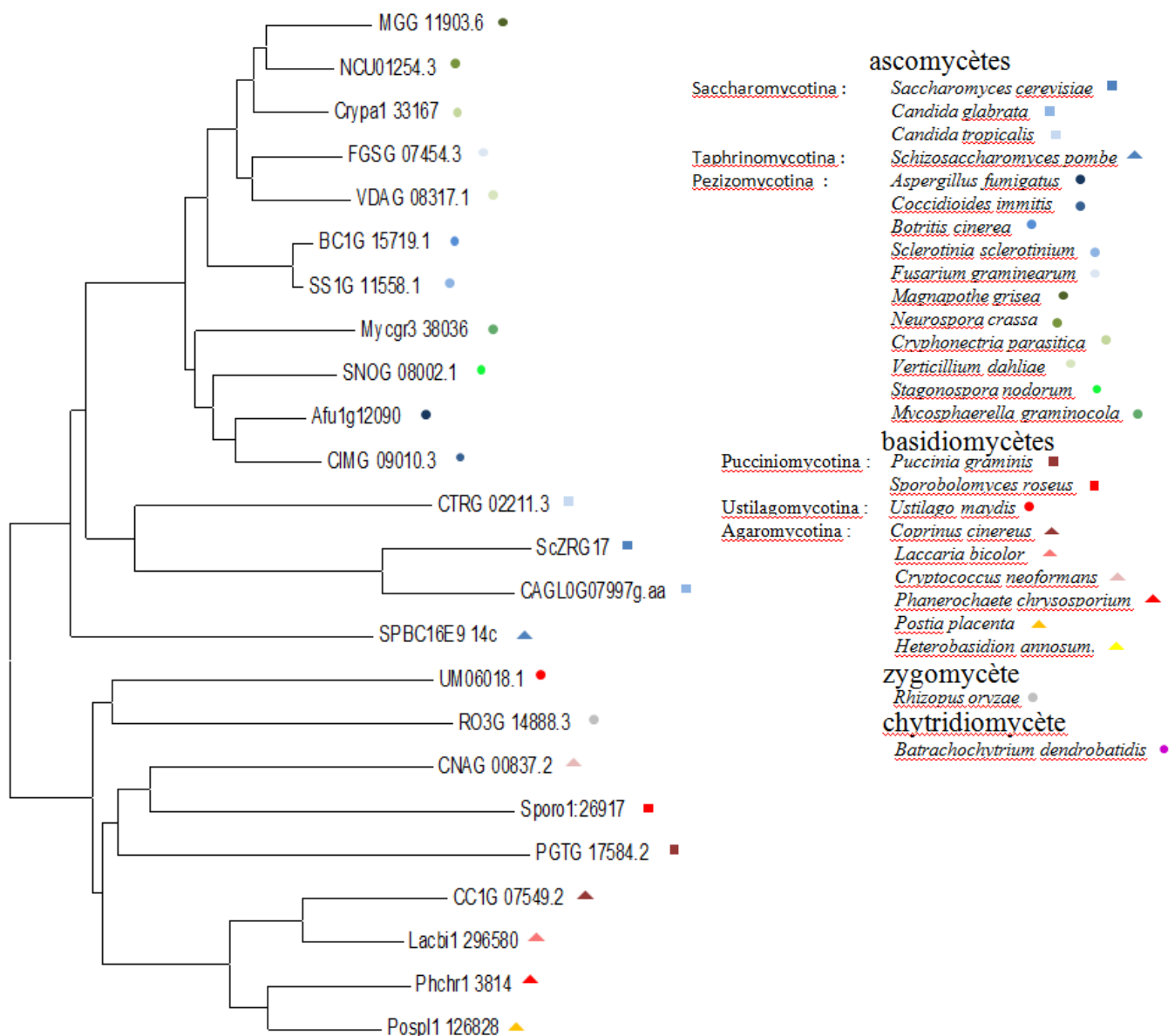


**Figure 49 :** Arbre phylogénétique des protéines de la famille CDF de la sous-famille II (Mn-CDF) des 26 organismes étudiés. L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.0 après alignement des séquences protéiques avec CLUSTALX d'après la méthode du Neighbor-Joining (NJ). Les Ascomycètes sont en bleu et vert, les Basidiomycètes en rouge et jaune, le Zygomycète en gris et le Chytridiomycète en violet. Dans un même phyla, les sous-phyla sont représentés par des formes différentes.



**Figure 50 :** Arbre phylogénétique des protéines de la famille CDF de la sous-famille III (Fe/Zn-CDF) des 26 organismes étudiés. L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.0 après alignement des séquences protéiques avec CLUSTALX d'après la méthode du Neighbor-Joining (NJ). Les Ascomycètes sont indiqués en bleu et vert, les Basidiomycètes en rouge et jaune, le Zygomycète en gris et le Chytridiomycète en violet. Dans un même phyla, les sous-phyla sont représentés par des formes différentes.





**Figure 51 :** Arbre phylogénétique des protéines de la famille CDF de la sous-famille IV (ScZRG17) des 26 organismes étudiés. L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.0 après alignement des séquences protéiques avec CLUSTALX d'après la méthode du Neighbor-Joining (NJ). Les Ascomycètes sont indiqués en bleu et vert, les Basidiomycètes en rouge et jaune, le Zygomycète en gris et le Chytridiomycète en violet. Dans un même phyla, les sous-phyla sont représentés par des formes différentes.

La présence, dans cette sous-famille, de ScCot1 et de ScZrc1 suggère que les protéines en faisant partie devraient prendre en charge le zinc. A l'instar de ce qui est observé pour ScCot1 notamment, le cadmium et le cobalt pourrait être des substrats potentiels.

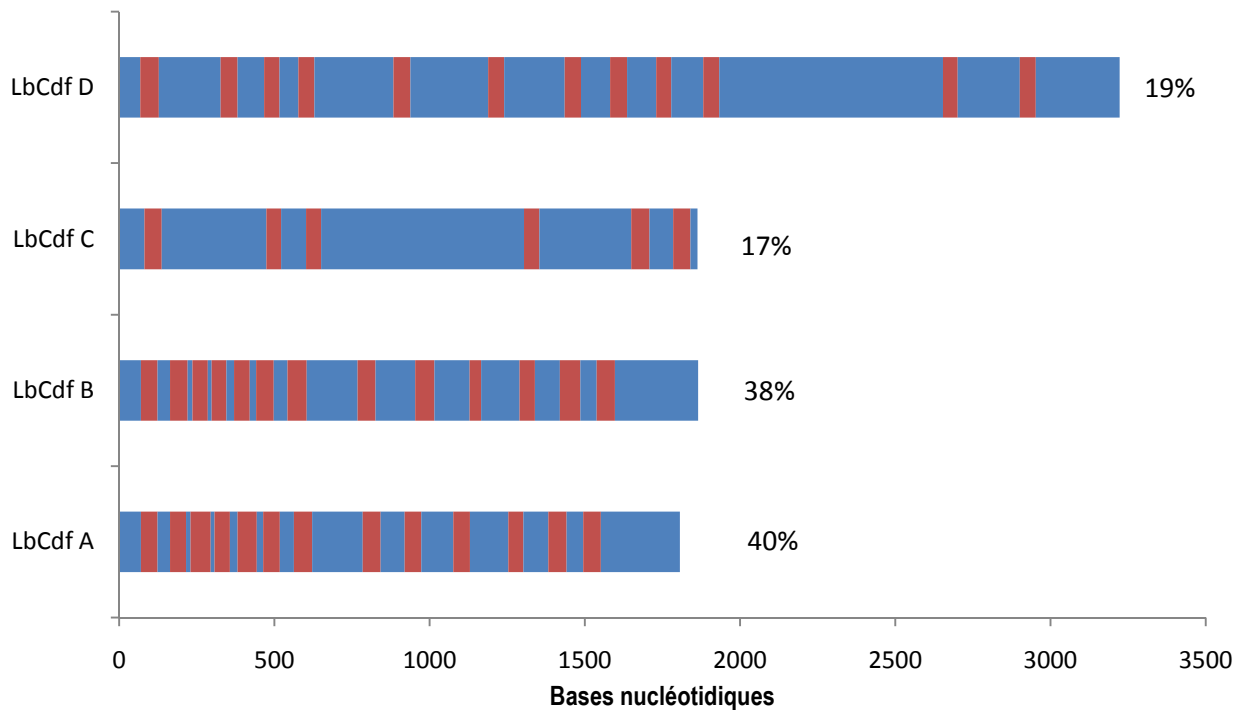
#### IV.1.1.2 Sous-famille II : Transporteurs de manganèse : (figure 49)

Cette sous-famille ne contient aucun homologue de *S. cerevisiae*. On y trouve 25 transporteurs putatifs chez les homologues d'Ascomycètes, 10 chez les Basidiomycètes et 1 chez les Zygomycètes. *Laccaria bicolor* en compte 3. En moyenne, on retrouve 3 représentants de cette sous-famille par espèce chez les Ascomycètes contre 2 chez les Basidiomycètes.

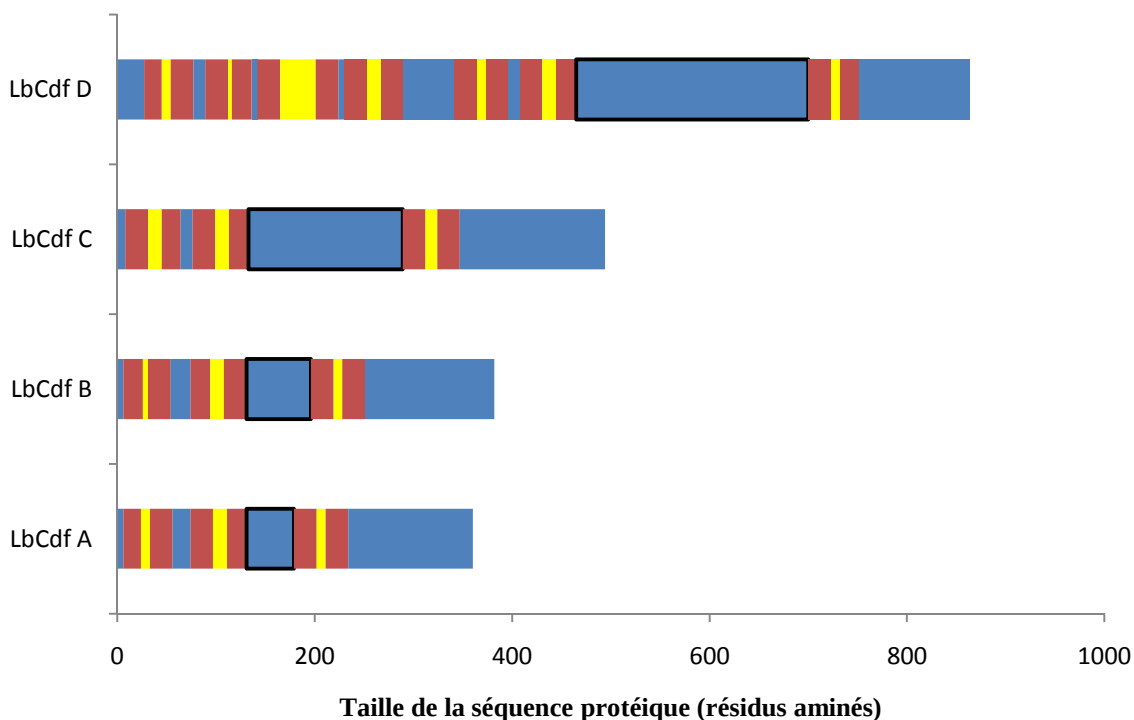
Les homologues d'Ascomycètes sont regroupés sur une même branche, il en est de même pour ceux des Basidiomycètes. Les transporteurs caractérisés de ce groupe ont été en mesure de compléter spécifiquement le défaut de croissance de la souche de levure  $\Delta$ Pmr1 même à de fortes concentrations de manganèse, mais ils ne soutiennent pas la croissance des souches hypersensibles aux autres métaux. Ceci suggère une implication spécifique dans l'homéostasie ou la tolérance au manganèse (Peiter et al., 2007). Récemment, un transporteur de manganèse de *Phanerochaete chrysosporium* appartenant à cette sous-famille a été caractérisé (Loïc Diss, communication personnelle). La disponibilité récente des génomes annotés d'espèces de *Candida* (Broad Institute of MIT and Harvard, <http://www.genome.wi.mit.edu>), a permis l'identification de membres de ce groupe également chez des Saccharomycetales. Ceci laisse à supposer que certaines levures, comme *S. cerevisiae*, ont perdu le gène et que deux événements de duplication de génome ont probablement eu lieu au cours de l'évolution des champignons filamenteux.

#### IV.1.1.3. Sous-famille III : Transporteurs de fer et de zinc : figure 50

La levure possède 2 homologues dans cette sous-famille, ScMMT1 et ScMMT2. Les membres de cette sous-famille transportent le fer et le zinc tel que cela a été démontré pour les représentants de *S. cerevisiae* (Li et Kaplan, 1997). La présence de Lacbi1 234505 (appelé LbCdf E) dans ce groupe suggère que lui aussi pourrait être impliqué dans l'influx de zinc et de fer vers les mitochondries.



**Figure 52 :** Organisation des introns et exons dans les gènes étudiés. Les introns et exons de chaque gène sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Le pourcentage d'intron de chaque gène est inscrit en vis-à-vis du gène correspondant.



**Figure 53 :** Topologie des protéines CDF : Les parties intracellulaires, transmembranaires et extracellulaires sont représentées respectivement en bleu, rouge et jaune. Les segments encadrés en noir représentent des régions riches en histidine, à savoir des régions présentant un minimum de 10% d'histidine au sein de leurs résidus totaux.

Cette sous-famille est subdivisée en 2 clusters, le premier ne contenant que des membres des Ascomycètes, le second contenant des membres des Zygomycètes, des Basidiomycètes et *Saccharomyces cerevisiae*. Dans le cluster des Ascomycètes, on peut remarquer que les séquences sont regroupées par sous-phyla : Saccharomycotina, Taphrinomycotina et Pezizomycotina.

#### IV.1.1.4. Sous-famille IV : Cluster incluant ScZRG17 : figure 51

Cette sous-famille comprend un homologue de la levure, ScZRG17. Ce dernier est localisé au niveau du réticulum endoplasmique (Ellis et al., 2005).

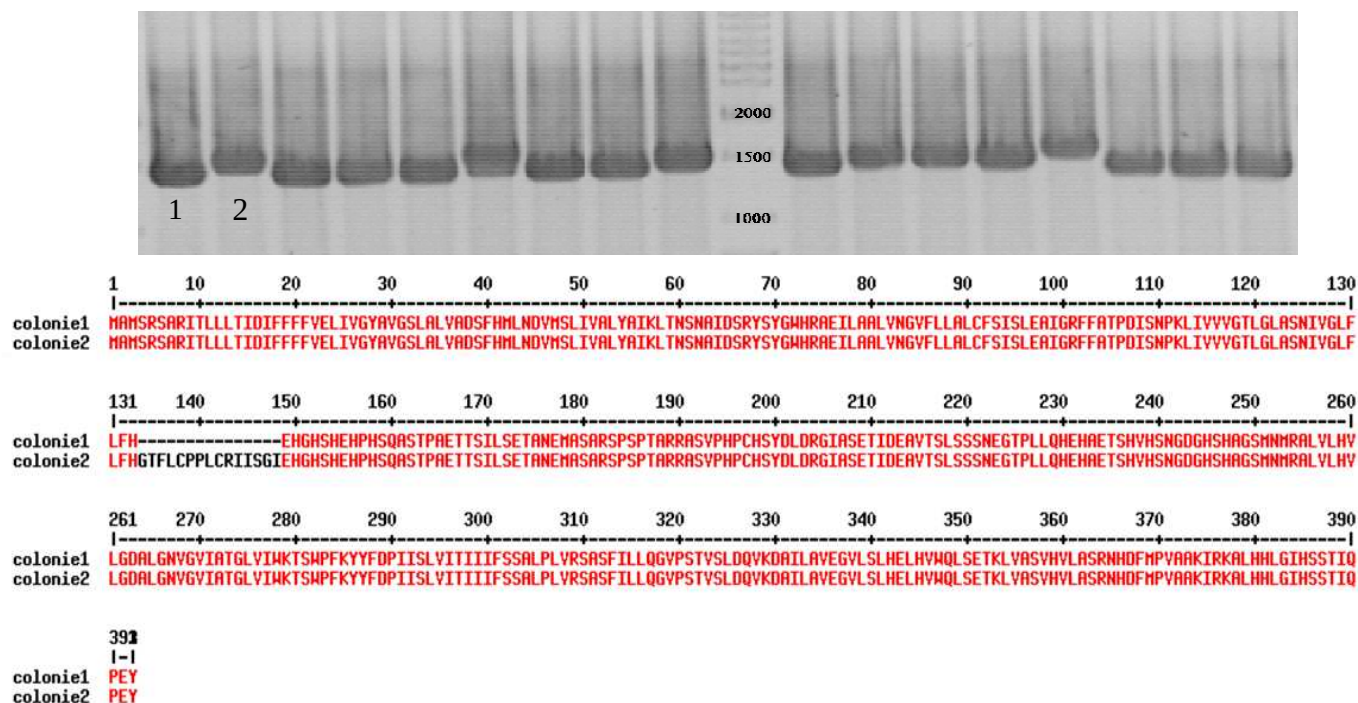
A l'instar du groupe précédent, on observe une séparation distincte entre les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ainsi qu'une séparation par sous-embranchement dans le cluster des Ascomycètes. 2 des 26 organismes ont perdu ce transporteur (*Heterobasidion annosum* et *Batrachochytrium dendrobatidis*), tous les autres en possèdent un exemplaire unique.

Pour satisfaire l'objectif fixé d'étudier la tolérance au zinc, seuls les membres de la sous-famille I (Zn-CDF) de *Laccaria bicolor* seront étudiés.

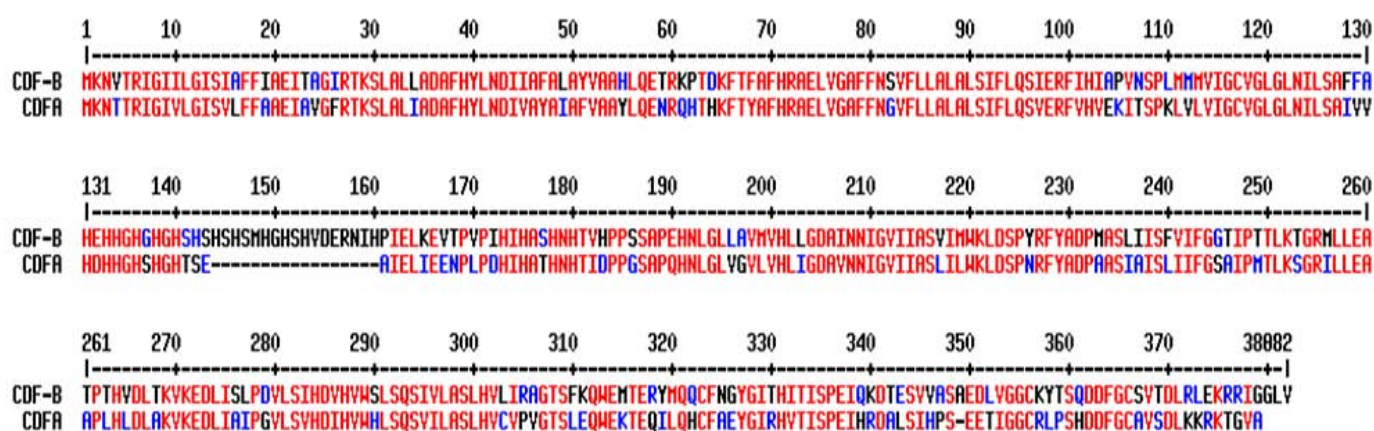
#### IV.1.2. Etude de quelques gènes CDFs de *Laccaria bicolor* :

##### IV.1.2.1. Etude de l'organisation des gènes d'intérêt :

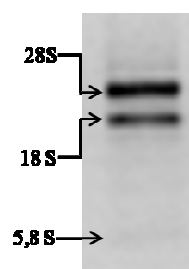
Les sites des introns sont souvent conservés entre espèces proches, facilitant leur identification par des logiciels de prédiction. De plus, chez *Laccaria bicolor*, ces sites sont majoritairement bordés par les doublets "GT" et "AG" (Lin et al., 2010). Les introns occupent une proportion forte chez LbCdfA et LbCdfB, respectivement 40 et 38% de l'ADN génomique (pris du codon start au codon stop), et une proportion plus faible chez LbCdfC et LbCdfD (17 et 19%) (Figure 52). Les séquences de LbCdfA et de LbCdfB présentent toutes deux 13 introns, contre 12 pour celle de LbCdfD et seulement 6 pour celle de LbCdfC. De plus, l'ordonnancement des introns-exons à l'intérieur des séquences de LbCdfA et LbCdfB est très similaire, comme leur proximité dans l'arbre phylogénétique le laissait supposer (figures 47 et 48).



**Figure 54 :** Intron non épissé chez LbCdfC. Plusieurs colonies d'*Escherichia coli*, contenant un plasmide résultant du clonage de l'ADNc de LbCdfC dans le vecteur pGEMT-easy, sont testées par PCR avec des amorces spécifiques du gène. Les produits PCR sont mis à migrer sur un gel d'agarose à 1% et sont ensuite révélés au bromure d'éthidium. La bande centrale du gel correspond au marqueur de taille utilisé (1 kb, Euromedex). Les différences de migrations sont dues à des tailles variables des produits PCR issus de la multiplication d'ADNc dont les ARNm ont subis des épissages alternatifs. A titre d'exemple, un alignement de 2 séquences protéiques, déduites de 2 ADNc, est proposé.



**Figure 55 :** Alignement des séquences protéiques de LbCdfA et LbCdfB. Les acides aminés sont représentés en rouge si identiques ou similaires en bleu et en noir si différents.



**Figure 56 :** Gel de vérification suivant l'extraction d'ARN.

#### IV.1.2.2. Etude de la topologie des gènes d'intérêt :

Les protéines LbCdfA et LbCdfB ont une taille similaire (respectivement 360 et 382 acides aminés). LbCdfC et LbCdfD sont de tailles supérieures (respectivement 494 et 864 acides aminés). Les protéines des CDFs étudiés ont leurs deux extrémités (N-terminale et C-terminale) localisées dans le cytosol (figure 53 réalisée d'après les prédictions du logiciel TMHMM (Krogh et al., 2001)). Les protéines LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC possèdent 6 domaines transmembranaires et une longue boucle riche en histidine entre les domaines IV et V, fait généralement observé chez les membres de la famille CDF (Montanini et al., 2007). LbCdfD diffère des autres Zn-CDFs de *Laccaria bicolor*. En effet, il présente 12 domaines transmembranaires putatifs et une région très riche en histidine (25% des résidus dans cette région) située entre les domaines transmembranaires X et XI.

#### IV.1.2.3. clonage des ADNc des protéines d'intérêt :

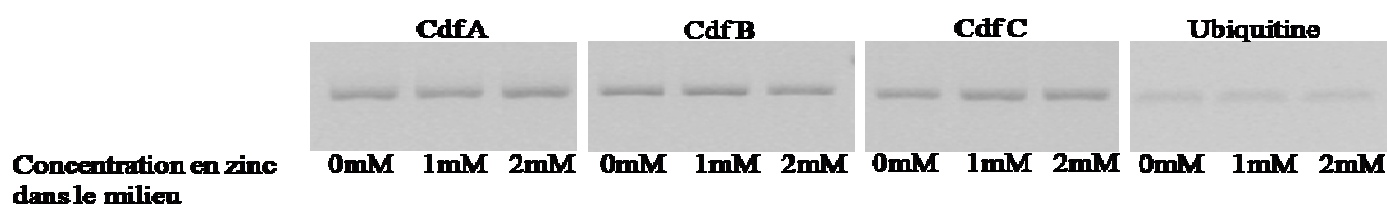
L'analyse fonctionnelle de 4 transporteurs (LbCdfA, LbCdfB, LbCdfC et LbCdfD) a été réalisée en système hétérologue (*S. cerevisiae*) en clonant les ADN complémentaires d'intérêt dans le vecteur d'expression pYES2.

Lors du clonage du gène *LbCdfC* de *Laccaria bicolor*, nous avons remarqué qu'environ une colonie testée par PCR sur deux présentait une taille d'inserts différente de celle attendue, suggérant la présence d'introns non épissés (figure 54). Les ADNc issu de ces clonages ne complémentent pas la souche mutante de levure  $\Delta zrc1$  au contraire de ceux ayant la taille attendue. *LbCdfC* présenterait des régulations mettant en jeu l'épissage des introns.

Après le séquençage, nous avons comparé les 2 LbCdfs les plus proches, LbCdfA et LbCdfB. LbCdfA et LbCdfB, bien que très proches (figure 47, 48, 52 et 53), montrent tout de même de nombreuses différences au niveau protéique avec un taux d'identité de 67,7% (figure 55). Ceci laisse penser qu'ils seraient paralogues. Une plus ample étude de ces gènes, et plus spécifiquement des régions génomiques environnantes permettrait de répondre à cette question (étude de leur sythénie).

#### IV.1.2.4. Expressions des gènes de la famille CDF :

Après extraction des ARNs, leur intégrité a été vérifiée sur gel (figure 56). Les ARNs sont



**Figure 57 :** Expression des gènes LbCdf A, LbCdf B, LbCdf C et ubiquitine détectée par RT-PCR dans des échantillons de mycélium de *Laccaria bicolor* s'étant développés 21 jours sur des milieux contenant différentes concentrations de zinc (0 ; 1mM ; 2mM)

intacts, les deux bandes majoritaires d'ARN ribosomique (18 et 28S) y apparaissant clairement, sans présence de smear. Les ARNs sont donc utilisables pour nos études de rétrotranscription. Nous avons analysé, dans un premier temps, les ESTs disponibles correspondant aux CDFs de *L.bicolor*. Dans un second temps ; nous avons étudié l'expression des LbCDFs dans le mycélium de *Laccaria bicolor* cultivé en condition de stress métallique ou non. Pour finir, l'étude s'est portée sur l'expression de ces mêmes gènes dans les différents tissus du champignon (mycélium, mycorhizes ou fructifications).

#### IV.1.2.4.1. Analyse des ESTs des gènes CDFs de *Laccaria bicolor* :

A l'aide du site du Doe Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) et du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), nous avons identifié des ESTs correspondant, seulement, à 3 des 4 gènes de la sous-famille Zn-CDF, LbCdfB, LbCdfC et LbCdfD.

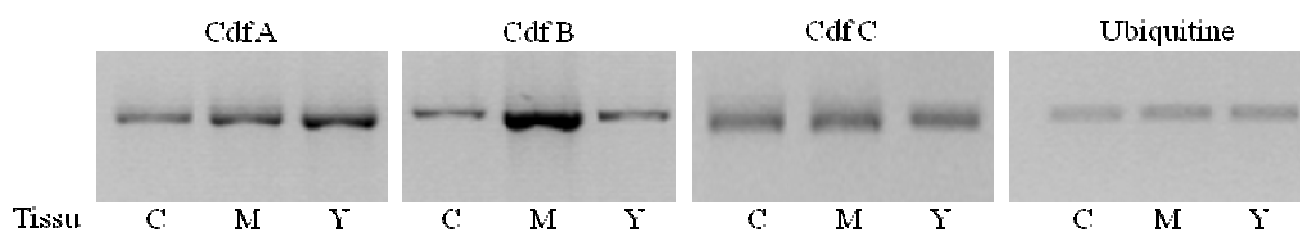
Ainsi nous avons identifié 1 EST pour LbCdfB (numéro d'accension GenBank : EX792618), 7 pour LbCdfC (numéros d'accension GenBank : EX785455, EX778174, EX793188, EX785454, EX778175, EX793187, EL739090) et 2 pour LbCdfD (numéros d'accension Genbank : EX791504 et EX791503).

Toutes les ESTs de ces 3 gènes sauf une présentent une localisation tissulaire identique (mycélium et carpophore), sauf EL739090 de LbCdfC qui n'indique qu'une localisation dans le carpophore.

#### IV.1.2.4.2. Niveau d'expression des gènes dans le mycélium soumis à un stress métallique :

Les ARNs sont extraits de mycélia cultivés dans trois conditions de culture différentes. Le milieu témoin sans ajout de zinc correspond au milieu de culture utilisé. Il contient donc environ 3,5  $\mu$ M de zinc. Deux traitements (1 mM Zn et 2mM Zn) ont également été réalisés. Après reverse transcription et donc formation des ADN complémentaires, le niveau d'expression des gènes d'intérêt est analysé à l'aide de la technique de PCR grâce à un couple d'amorces spécifiques de chaque gène. Un contrôle est effectué dans les mêmes conditions avec l'ubiquitine, gène considéré comme constitutivement exprimé. D'après la figure 57, l'ubiquitine apparait uniformément exprimée dans les trois conditions. Les trois gènes étudiés, LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC, présentent une expression inchangée quelque soit





**Figure 58 :** Expression des gènes LbCdf A, LbCdf B, LbCdf C et ubiquitine détectée par RT-PCR dans des échantillons de carpophore (C), de mycorhizes de pins de Douglas (M) et de mycélium (Y) de *Laccaria bicolor* .

|                | Tissus    |            |          | Rapports d'expression |                       |                        |
|----------------|-----------|------------|----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|                | Mycorhize | Carpophore | Mycélium | Mycélium / Mycorhize  | Mycélium / Carpophore | Mycorhize / Carpophore |
| <b>LbCdf A</b> | 11605     | 8285       | 22151    | 2                     | 2,67                  | 1,40                   |
| <b>LbCdf B</b> | 34352     | 12084      | 4009     | 0,12                  | 0,33                  | 3                      |
| <b>LbCdf C</b> | 17083     | 13997      | 14380    | 0,84                  | 1,0                   | 1,19                   |

**Tableau:** Niveaux d'expression des gènes LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC obtenus lors de l'expérience utilisant des puces à ADN. Ces niveaux d'expression correspondent, pour les mycorhizes, à la valeur moyenne d'expression dans les mycorhizes de *L. bicolor*- *P. menziesii* (2 répétitions), de mycorhizes *L. bicolor*-*P. trichocarpa* produites en serre et *L. bicolor*-*P. tremula* × *alba* produites *in vitro*. Les valeurs d'expression dans le carpophore correspondent à la valeur moyenne de plusieurs fructifications. Enfin, l'expression dans le mycélium correspond à la moyenne des taux d'expression, pour deux répétitions, dans du mycélium âgé de trois semaines. Les valeurs sont exprimées en unité arbitraire.

la condition considérée. Ces trois gènes ne semblent donc pas être régulés au niveau transcriptionnel par la concentration en zinc présente dans le milieu.

#### IV.1.2.4.3. Niveau d'expressions des gènes au sein des différents tissus de *Laccaria bicolor* :

Après extraction d'ARNs issus des trois tissus de *Laccaria bicolor*, le carpophore, la mycorhize et le mycélium, une analyse de l'expression des gènes d'intérêt est réalisée par RT-PCR semi-quantitative. Un contrôle est effectué avec l'ubiquitine, gène considéré comme constitutivement exprimé.

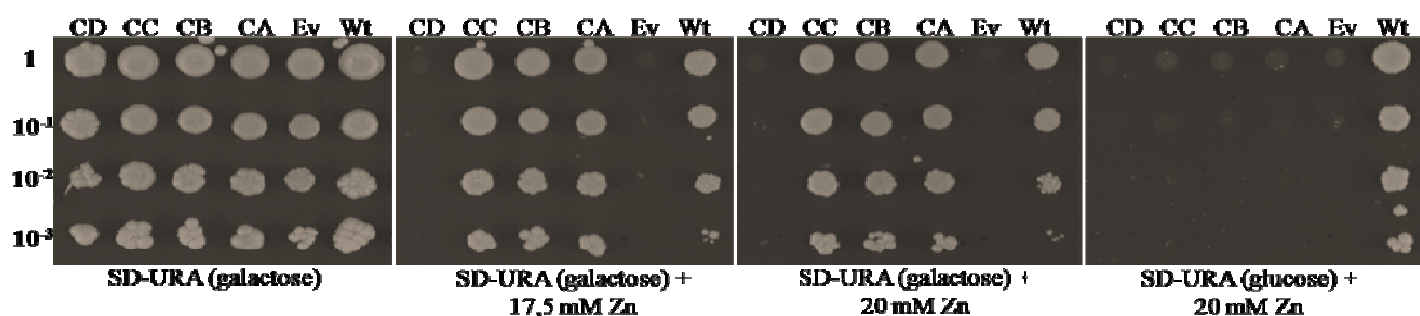
D'après la figure 58, où l'ubiquitine apparaît uniformément exprimée dans les trois tissus, nous observons des disparités d'expression de nos gènes d'intérêt suivant la localisation tissulaire considérée. En effet, LbCdfC semble être exprimé de manière uniforme dans les différents tissus (4,5 fois l'expression de l'ubiquitine), ce qui n'est pas le cas pour LbCdfA et LbCdfB. Ainsi, le gène LbCdfA est moins exprimé dans le carpophore (3 fois l'expression de l'ubiquitine) alors qu'il présente son expression la plus forte dans le mycélium (6 fois l'expression de l'ubiquitine), alors que le gène LbCdfB présente une expression uniforme pour le carpophore et le mycélium (3 fois l'expression de l'ubiquitine) et une expression plus forte au niveau de la mycorhize (10 fois l'expression de l'ubiquitine).

Les niveaux d'expression de ces gènes sont également disponibles à l'issue de l'utilisation de puces à ADN (Lucic et al., 2008; Martin et al., 2008)). D'après le tableau, LbCdf A est plus exprimé dans le mycélium (2 fois plus que dans la mycorhize et 2,7 fois plus que dans le carpophore), LbCdf B est surexprimé dans la mycorhize (8 fois plus que dans le mycélium et 3 fois plus que dans le carpophore) et LbCdf C est plus ou moins exprimé uniformément dans les trois tissus. Ces résultats corroborent ceux trouvés dans le test précédent.

#### IV.1.2.5. Caractérisation fonctionnelle de quelques transporteurs de la famille CDF :

##### IV.1.2.5.1. Tests de résistance au zinc:

L'expression hétérologue des LbCdFs testés est étudiée dans une souche de levure sensible au zinc,  $\Delta zrc1$ . La souche sauvage et la souche mutante  $\Delta zrc1$  (gène *Zrc1* délété), transformées par le vecteur vide, sont utilisées comme témoins positif et négatif, respectivement. Toutes les souches poussent de manière équivalente sur le milieu témoin (SD-URA + galactose). Nous



**Figure 59 :** Tests de résistance au zinc de la levure mutante  $\Delta zrc1$  exprimant un gène LbCDF de *Laccaria bicolor*, LbCdfA (CA), LbCdfB (CB), LbCdfC (CC) et LbCdfD (CD), ou transformé par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta zrc1$ -vecteur vide (Ev) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (Wt) sert de témoin positif. Un milieu témoin est réalisé avec du glucose, ce dernier ne permettant pas l'induction de la transcription du gène cloné dans le plasmide pYES2. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées (1 à  $10^{-3}$ ).

avons déjà observé dans le précédent chapitre que l'addition de zinc à des concentrations toxiques (ici 17,5 mM et 20 mM) dans le milieu, entraîne des perturbations de la croissance chez le mutant de levure  $\Delta zrc1$ . Les protéines LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC suppriment la sensibilité au zinc de la souche  $\Delta zrc1$ , alors que LbCdfD n'a aucun effet (figure 59). Pour s'assurer que cette restauration de phénotype est bien due à la présence de l'ADNc de ces trois LbCdfs dans les plasmides pYES2, nous avons recommencé le même test mais en remplaçant cette fois le galactose par du glucose. Cette substitution empêche l'expression des inserts du plasmide. Dans ce cas, On n'observe aucune restauration de croissance. Ainsi dans ce test, la restauration du phénotype est bien issue de la surexpression de LbCdfA, LbCdfB ou LbCdfC.

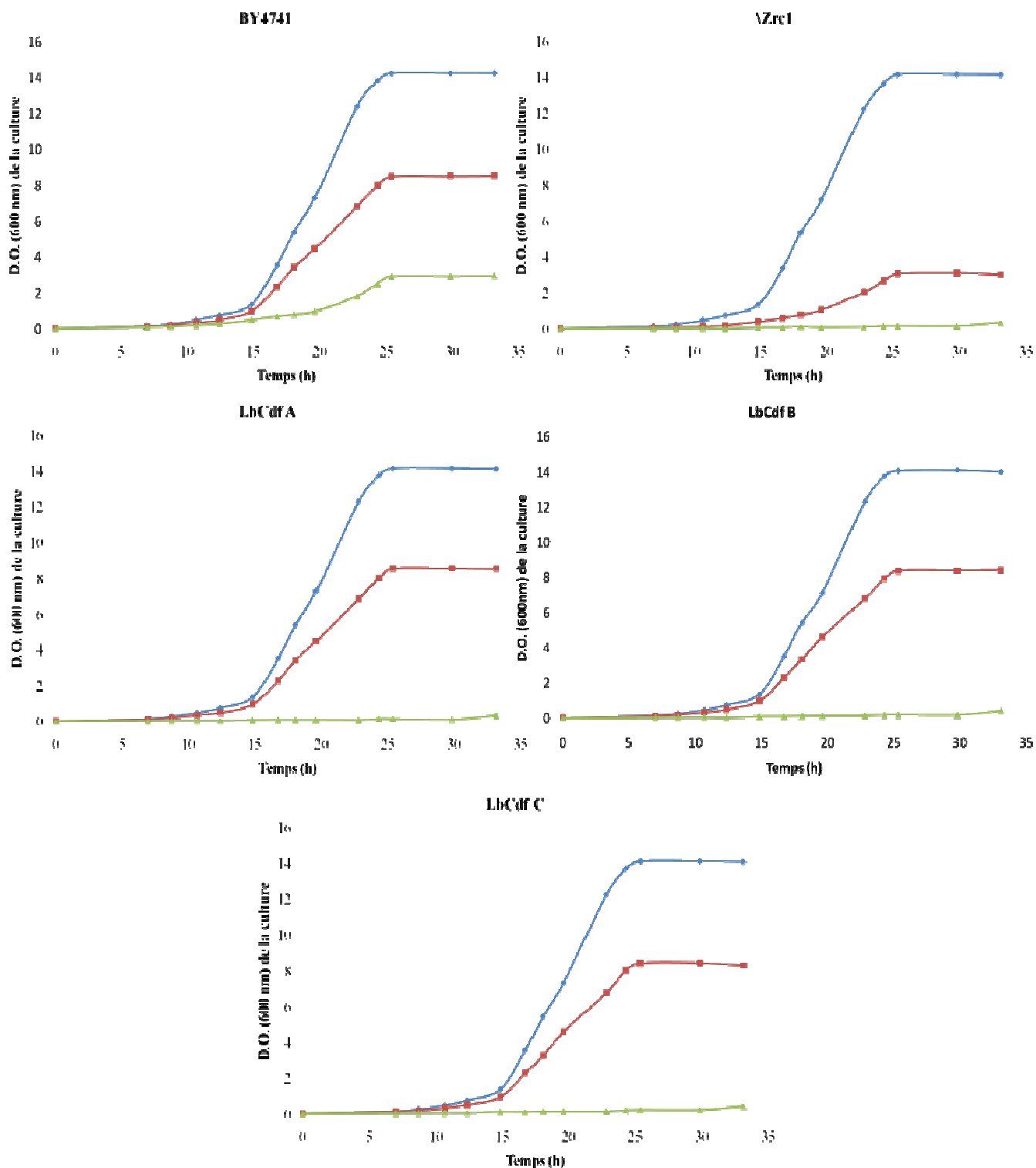
Lors d'un test sur milieu solide, la résolution de la réponse est souvent limitée. En effet, on observe souvent une croissance ou l'absence de celle-ci, sans pouvoir de définition entre les deux. Dans le but d'avoir une analyse plus fine de l'effet des LbCDFs sur le niveau de résistance au zinc conféré, nous avons entrepris une étude en milieu liquide (figure 60).

Les 3 gènes testés présentent la même courbe de croissance que la souche sauvage sur les milieux témoin et 3mM de zinc (figure 60), alors que la souche *zrc1*-vecteur vide affiche une croissance 2,5 fois moins rapide que les autres souches testées et une phase de plateau située à une D.O. 600nm de 3 contre 8 pour les autres souches. A nouveau, l'expression hétérologue de LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC a donc permis aux souches mutantes transformées de tolérer de fortes concentrations de zinc dans le milieu. Par contre, dès que la concentration dans le milieu est trop importante (ici 7mM), il apparaît que les souches contenant les gènes hétérologues, à l'instar du témoin négatif, ne poussent plus (figure 60).

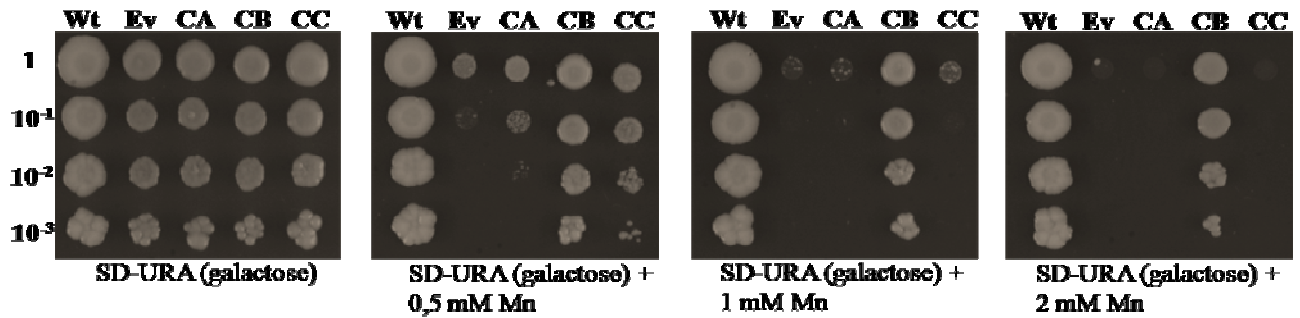
#### IV.1.2.5.2. Tests de résistances à d'autres métaux :

Plusieurs souches spécifiquement sensibles à d'autres métaux sont transformées avec nos constructions. A nouveau, les souches sauvages et les souches mutantes, transformées par le vecteur vide, sont utilisées comme témoin positifs et négatifs, respectivement.

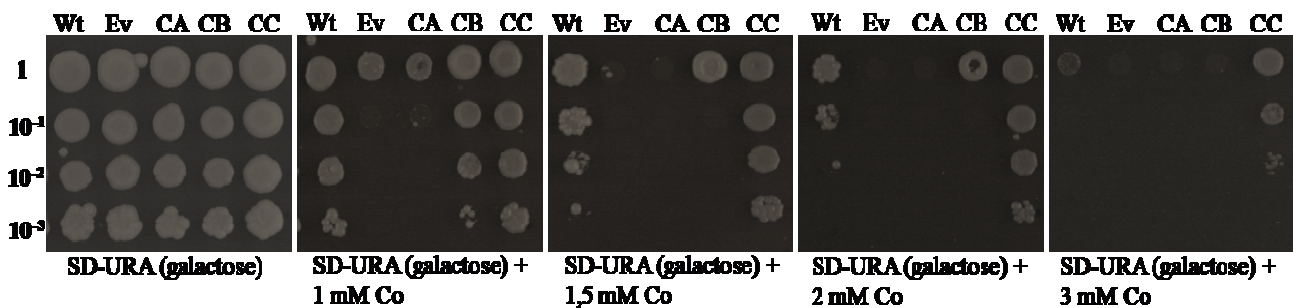
LbCdfA ne restaure que très partiellement le phénotype de la souche  $\Delta pmr1$  (figure 61), en effet, à 0,5 mM de manganèse dans le milieu, la souche transformée présente une meilleure croissance (facteur 10) par rapport au témoin négatif, mais cet effet n'est pas maintenu



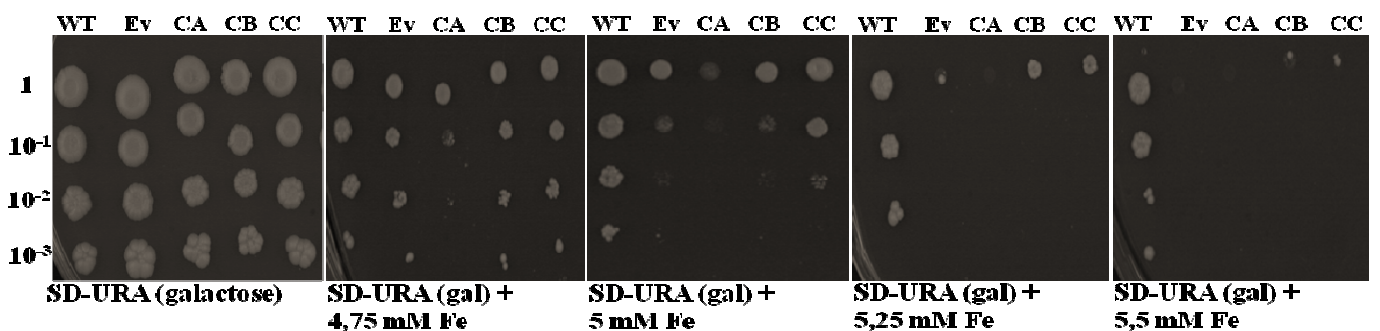
**Figure 60 :** Courbes de croissance de la souche mutante  $\Delta zrc1$  (transformée par LbCdfA, LbCdfB, LbCdfC ou par le vecteur vide pYES2) et sauvage BY4741 (transformée par le vecteur vide pYES2) sur milieu liquide SD-URA ne contenant pas de zinc (en bleu), ou contenant 3mM de zinc (en rouge) ou 7mM de zinc (en vert). La souche  $\Delta zrc1$ -vecteur vide sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (Wt) sert de témoin positif.



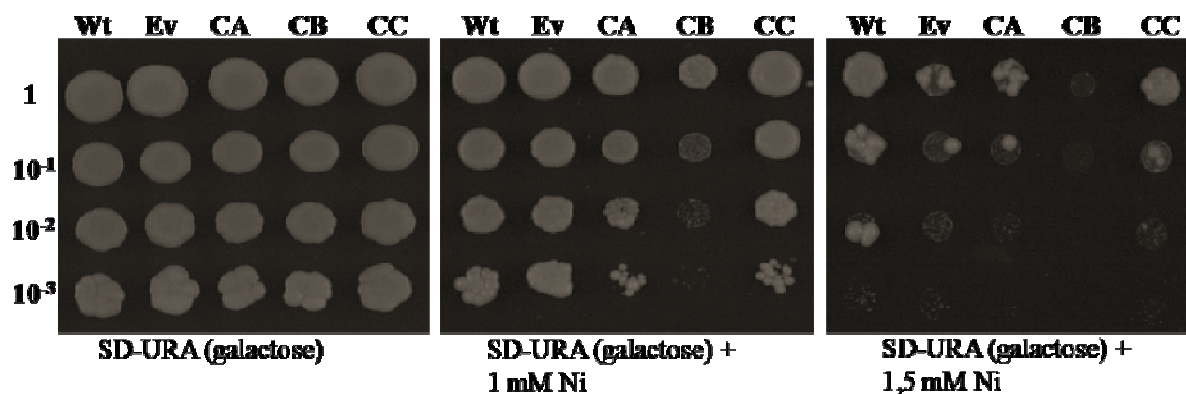
**Figure 61 :** Tests de résistance au manganèse de la levure mutante  $\Delta pmr1$  exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbCdfA (CA), LbCdfB (CB) ou LbCdfC (CC), ou transformée par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta pmr1$ -vecteur vide (Ev) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (WT) sert de témoin positif. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées (1 à  $10^{-3}$ ).



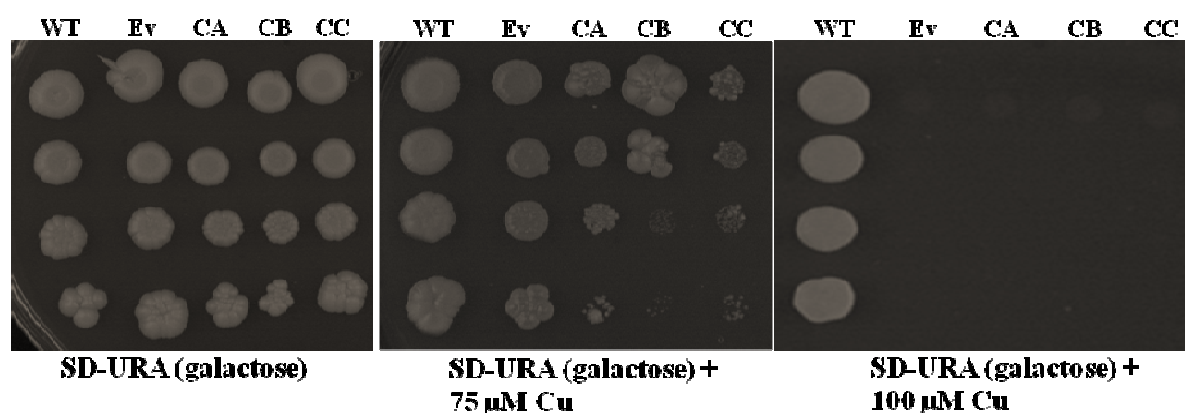
**Figure 62 :** Tests de résistance au cobalt de la levure mutante  $\Delta Cot1$  exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbCdfA (CA), LbCdfB (CB) ou LbCdfC (CC), ou transformée par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta Cot1$ -vecteur vide (Ev) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (WT) sert de témoin positif. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées (1 à  $10^{-3}$ ).



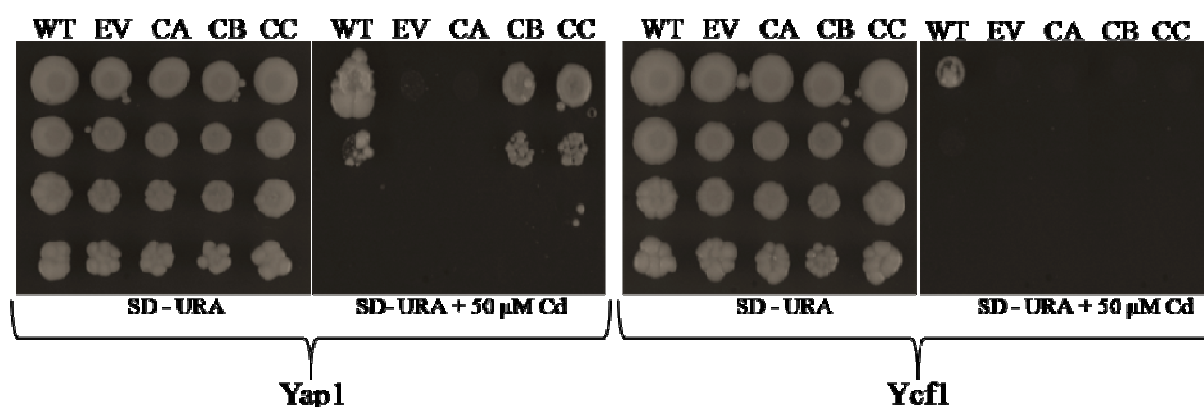
**Figure 63 :** Tests de résistance au fer de la levure mutante  $\Delta ccc1$  exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbCdfA (CA), LbCdfB (CB) ou LbCdfC (CC), ou transformée par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta ccc1$ -vecteur vide (Ev) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (WT) sert de témoin positif. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées (1 à  $10^{-3}$ ).



**Figure 64 :** Tests de résistance au nickel de la levure mutante  $\Delta smf1$  exprimant un gène 64 *Laccaria bicolor*, LbCdfA (CA), LbCdfB (CB) ou LbCdfC (CC), ou transformée par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta smf1$ -vecteur vide (Ev) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (Wt) sert de témoin positif. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées ( $1$  à  $10^{-3}$ ).



**Figure 65 :** Tests de résistance au cuivre de la levure mutante  $\Delta cup2$  exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbCdfA (CA), LbCdfB (CB) ou LbCdfC (CC), ou transformée par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta cup2$ -vecteur vide (Ev) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (WT) sert de témoin positif. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées ( $1$  à  $10^{-3}$ ).



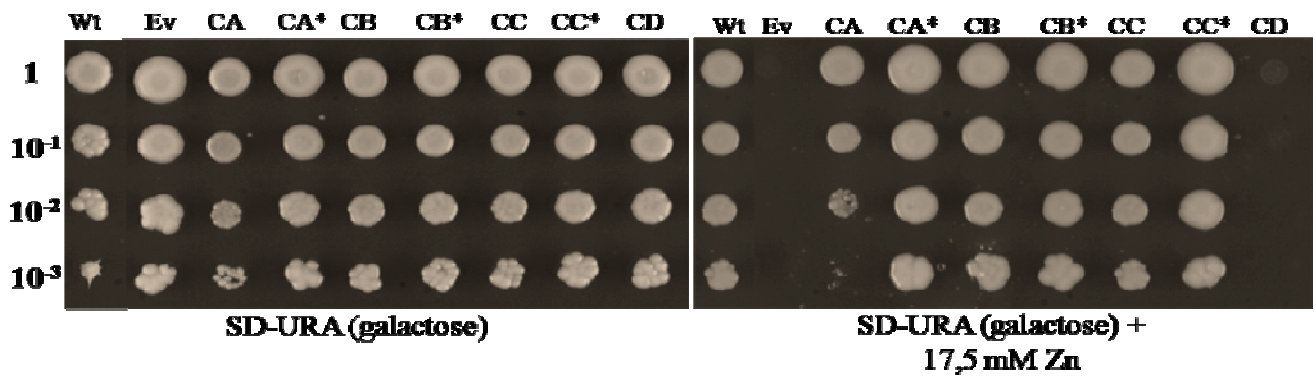
**Figure 66 :** Tests de résistance au cadmium des levures mutantes  $\Delta yap1$  et  $\Delta ycf1$  exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbCdfA (CA), LbCdfB (CB) ou LbCdfC (CC), ou transformées par le vecteur vide pYES2. Les souches  $\Delta yap1$ -vecteur vide (Ev) et  $\Delta ycf1$ -vecteur vide (Ev) servent de témoins négatifs alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (WT) sert de témoin positif. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées ( $1$  à  $10^{-3}$ ).

quand la concentration en manganèse augmente dans le milieu. LbCdfA n'a aucun effet sur la souche  $\Delta Cot1$  sur un milieu contenant du cobalt (figure 62) ni sur la souche  $\Delta smf1$  sur un milieu contenant du nickel (figure 64) quelle que soit la concentration utilisée de ces métaux. Par contre, il augmente légèrement la sensibilité au fer de la souche  $\Delta ccc1$  (figure 63) dès la plus faible concentration testée (4,75 mM Fe). Ce transporteur ne restaure ni le phénotype des souches  $\Delta yap1$  et  $\Delta ycf1$  quand celles-ci sont déposées sur des milieux contenant du cadmium (figure 66).

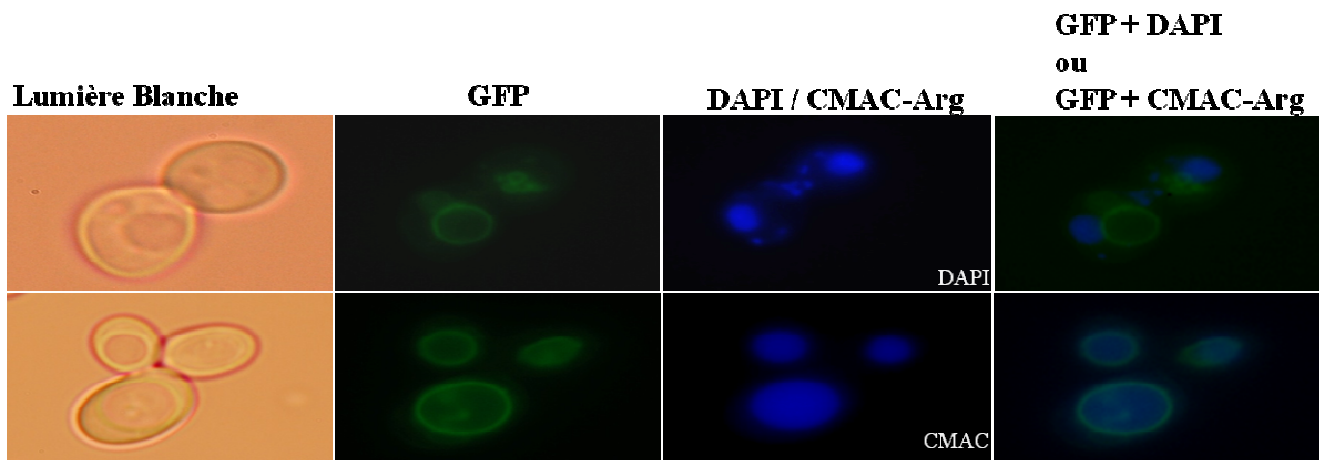
Le transporteur LbCdfB augmente fortement la tolérance au manganèse de  $\Delta pmr1$  (figure 61) sur toute la gamme de concentration de manganèse dans le milieu testée (0,5 mM à 2mM Mn), mais seulement partiellement celle au cobalt de  $\Delta Cot1$  (figure 62). L'effet est le plus visible sur la partie basse de la gamme de concentration (<1mM) mais s'estompe vite (dès 1,5 mM) pour disparaître dans la partie haute de la gamme. Cette protéine n'a aucun effet sur la croissance du mutant  $\Delta ccc1$  cultivé sur un milieu contenant du fer (figure 63). Par contre LbCdf B augmente la sensibilité de  $\Delta smf1$  au nickel dès 1 mM de Ni dans le milieu (figure 64), ainsi que celle au cuivre de la souche  $\Delta cup2$  dès la plus basse concentration utilisée (75  $\mu$ M Cu) (figure 66). LbCdfB augmente la tolérance au cadmium de la souche  $\Delta yap1$  poussant sur un milieu contenant 50  $\mu$ M de Cd mais n'a aucun effet sur la croissance de  $\Delta ycf1$  sur un milieu contenant cette même concentration de Cd (figure 66).

LbCdfC ne restaure que très partiellement le phénotype de la souche  $\Delta pmr1$  (figure 61), en effet, à 0,5 mM de manganèse dans le milieu, la souche transformée présente une meilleure croissance (facteur 10) par rapport au témoin négatif, mais cet effet n'est pas maintenu quand la concentration en manganèse augmente dans le milieu. Cette protéine ne restaure pas le phénotype de  $\Delta ccc1$  sur un milieu contenant du fer (figure 63). Alors qu'elle permet la restauration totale du phénotype de  $\Delta Cot1$  sur un milieu qui contient du cobalt (figure 62). Sur la gamme de concentrations de Co testées (1 mM à 3 mM Co), LbCdfC permet à la souche mutante  $\Delta Cot1$  une meilleure croissance que la souche sauvage. Alors que LbCdfC n'a aucun effet sur la souche  $\Delta smf1$  quelle que soit la concentration de nickel dans le milieu (figure 64), cette protéine augmente légèrement la sensibilité de la souche  $\Delta cup2$  dès 75 mM de Cu dans le milieu (figure 65). A l'instar de LbCdfB, LbCdfC améliore la tolérance du mutant  $\Delta yap1$  mais pas celle de  $\Delta ycf1$  sur un milieu contenant 50  $\mu$ M de Cd (figure 66).





**Figure 67 :** Tests de résistance au zinc de la levure mutante  $\Delta zrc1$  transformée par LbCdfA (CA), LbCdfB (CB), LbCdfC (CC) et LbCdfD (CD), et par ces mêmes gènes fusionnés à la GFP (\*) ou par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta zrc1$ -vecteur vide (Ev) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage BY4741-vecteur vide (Wt) sert de témoin positif. 2  $\mu$ l de plusieurs dilutions de la culture sont déposées (1 à  $10^{-3}$ ).



**Figure 68 :** Localisation de la protéine LbCdfA. Des cellules de levures exprimant LbCdfA-GFP sont visualisées au microscope en lumière blanche ou en épifluorescence (68 x1000). Les marquages au CMAC-Arg (fluorescence bleue du lumen de la vacuole) ou au DAPI (marquage du noyau) servent de contrôle de localisation. Une superposition d'images GFP-DAPI et GFP-CMAC-Arg a été réalisée pour s'assurer de la localisation de la protéine LbCdfA-GFP.

#### IV.1.2.6. Localisation des transporteurs de la famille CDF :

L'expression hétérologue chez la levure, bien que très utilisée, peut présenter une localisation différente entre l'organisme originel et la levure, tel que cela a été observé chez certaines plantes (Delhaize et al., 2003) ou des artefacts de localisation dus à des conditions différentes en teneur en métal (Cabantous et al., 2005). De fait, nous avons testé si la fusion de nos protéines d'intérêt à la GFP nuisait à leur fonction par complémentation fonctionnelle de la souche  $\Delta zrc1$  observée sans la fusion (figure 67)

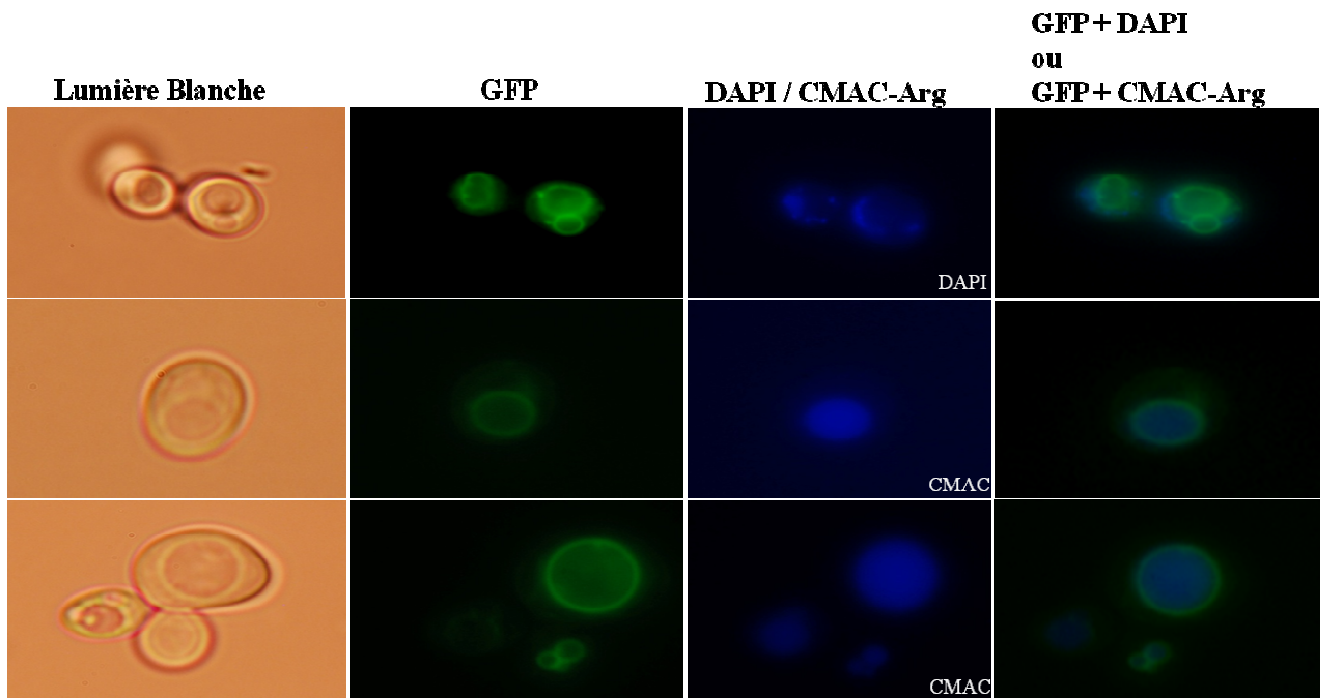
Pour réaliser cela, les ADNc de LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC ont été clonés dans le vecteur d'expression pYES2 en fusion avec la GFP, ces constructions nous permettant en outre de mettre en évidence la localisation sub-cellulaire de ces transporteurs dans les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour s'assurer que la fusion de la GFP avec les CDFs de *Laccaria bicolor* ne perturbe pas leur fonction, nous avons réalisé un test de résistance au zinc avec les souches  $\Delta zrc1$ -LbCdf d'une part et  $\Delta zrc1$ -LbCdf-GFP d'autre part (figure 67). Les souches testées présentent la même croissance sur le milieu témoin (sans zinc) et nous n'observons aucune différence entre les souches avec GFP et les souches sans en ce qui concerne leur niveau de tolérance au zinc. La présence de la GFP ne perturbe donc pas les fonctions des protéines auxquelles elle est fusionnée, il est donc possible d'utiliser nos constructions GFP pour étudier la localisation sub-cellulaire de ces transporteurs.

Dans un premier temps, la visualisation des cellules de levures en lumière blanche permet d'observer les contours des cellules et des vacuoles.

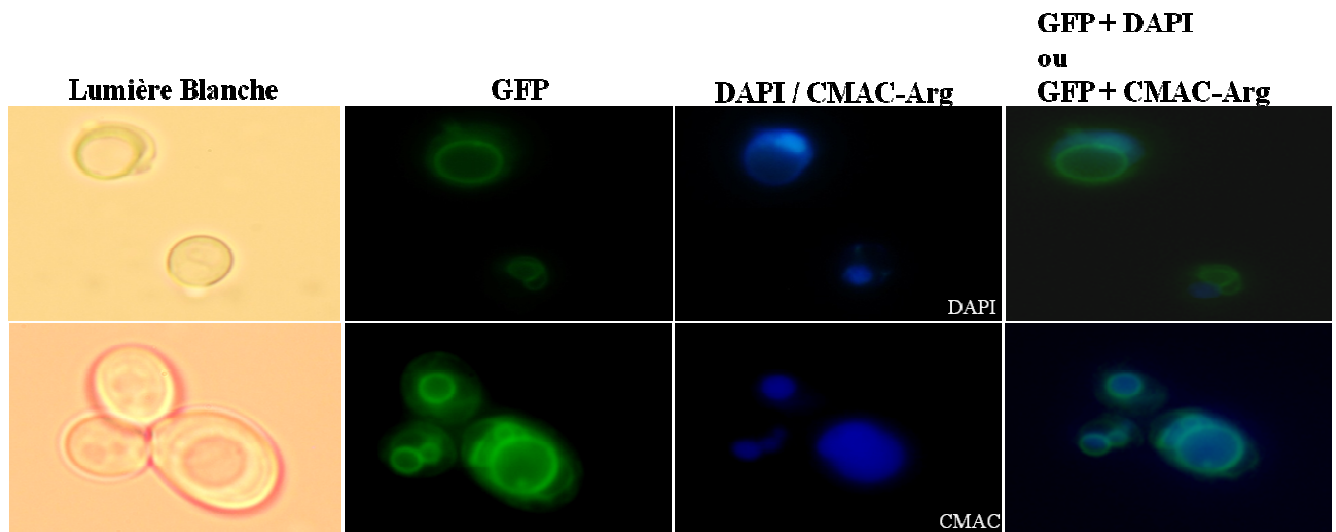
Dans un second temps, les résultats obtenus avec le filtre GFP permet d'émettre l'hypothèse d'une localisation de LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC au niveau de la membrane vacuolaire.

Dans un troisième temps, l'utilisation en parallèle de DAPI a permis de mettre en évidence le noyau. Ce dernier, en superposant les images GFP et DAPI, se situe à l'extérieur de l'anneau de fluorescence GFP, soutenant ainsi l'hypothèse d'une localisation vacuolaire de ces 3 protéines.

Enfin, ces résultats sont confortés par les colorations au CMAC-Arg. Ce colorant va pénétrer dans la vacuole et spécifiquement émettre une fluorescence bleue à l'intérieur de celle-ci (figure 68, figure 69 et figure 70). En superposant les images GFP et CMAC, on observe la fluorescence due à la GFP qui entoure la fluorescence bleue issue du CMAC-Arg à l'intérieur



**Figure 69 :** Localisation de la protéine LbCdfB. Des cellules de levures exprimant LbCdfB-GFP sont visualisées au microscope en lumière blanche ou en épifluorescence (grossissement x1000). Les marquages au CMAC-Arg (fluorescence bleue du lumen de la vacuole) ou au DAPI (marquage du noyau) servent de contrôle de localisation. Une superposition d'images GFP-DAPI et GFP-CMAC-Arg a été réalisée pour s'assurer de la localisation de la protéine LbCdfB-GFP.



**Figure 70 :** Localisation de la protéine LbCdfC. Des cellules de levures exprimant LbCdfC-GFP sont visualisées au microscope en lumière blanche ou en épifluorescence (grossissement x1000). Les marquages au CMAC-Arg (fluorescence bleue du lumen de la vacuole) ou au DAPI (marquage du noyau) servent de contrôle de localisation. Une superposition d'images GFP-DAPI et GFP-CMAC-Arg a été réalisée pour s'assurer de la localisation de la protéine LbCdfC-GFP.

de la vacuole. Ceci confirme la localisation de LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC au niveau de la membrane vacuolaire.

### V.1.3. Discussion:

L'analyse phylogénétique de la famille CDF fait apparaître 4 sous-familles. Ces transporteurs peuvent être classés selon leur affinité pour un ou plusieurs métaux (Montanini et al., 2007). Nous retrouvons des membres de la famille CDF de *Laccaria bicolor* dans chacune des quatre sous-familles (4 dans la sous-famille Zn-CDF, 3 dans sous-famille Mn-CDF, sous-famille Fe/Zn-CDF, 1 dans la sous-famille IV). Avec 9 membres de la famille CDF, *Laccaria bicolor* est l'organisme étudié le plus représenté dans cette étude (avec *Rhizopus oryzae*). Ce constat concorde avec l'expansion de gènes observée chez ce champignon (Martin et al., 2008). En effet, le génome de *L. bicolor* présente plus de gènes que tout autre basidiomycète séquencé à ce jour (Martin et Selosse, 2008).

ScZRC1, un transporteur de levure homologue de LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC présente un niveau d'expression qui augmente en situation de carence en zinc et baisse suite à un rajout de zinc dans le milieu (Miyabe, 2001). MacDiarmid et al. (2003) montrent le rôle crucial de l'activité de Zrc1, et sa régulation par Zap1, dans la tolérance à un choc en zinc. Zap1 est un facteur de transcription qui, suite à la détection d'une carence en zinc, va activer la synthèse de protéines responsable de l'homéostasie du zinc (Herbig et al., 2005; Wang et al., 2006). Le choc au zinc survient lorsque des cellules appauvries en zinc, et donc ayant une capacité élevée d'absorption de zinc, sont ravitaillées avec du zinc. De grandes quantités de zinc passent alors à travers la membrane plasmique et s'accumulent rapidement dans le cytoplasme. La cellule répond à cet excès de zinc par une baisse de la régulation de la transcription des importateurs de zinc que sont *ZRT1* et *ZRT2* (Zhao et Eide, 1996 a et b), notamment en inactivant la protéine Zrt1 par endocytose. A l'inverse, *Zrc1* sera transitoirement surexprimé suite à ce choc en zinc.

Gonzales-Guerrero et al. (2005) montrent aussi une régulation d'un Zn-CDF différent, *GintZnT1*, à un choc. Ainsi on observe une expression maximale à 12 et 6 heures après l'ajout respectif d'une quantité modérée ou forte de zinc dans le milieu. On peut noter que l'expression de *LbCdfA*, *LbCdfB* et *LbCdfC* est indépendante de la concentration de zinc dans le milieu extérieur. Il serait intéressant de tester si ces gènes sont, à l'instar de *ScZrc1* et *GintZnT1*, surexprimés en cas de choc au zinc.

Les trois CDFs étudiés (LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC) sont exprimés dans tous les tissus du champignon (figure 58 et 59). Ainsi les 3 gènes semblent exprimés à un niveau proche dans le mycélium, alors que *LbCdfB* est largement surexprimé dans la mycorhize et LbCdfA n'est que légèrement plus exprimé dans le carpophore. Les résultats en RT-PCR confirment les résultats issus de l'analyse de la lame génome entier (figure 58 et tableau 22). Ces gènes semblent donc être exprimés dans tous les tissus fongiques, suggérant un rôle important dans la tolérance au zinc de ces différents tissus. Au niveau de la mycorhize, le fort niveau d'expression de *LbCdfB* observé dans le tissu du partenaire fongique pourrait être expliqué par un rôle dans la séquestration du zinc dans le champignon, évitant ainsi un influx trop grand dans les cellules de la racine du partenaire végétal. Les carpophores de champignons ectomycorhiziens sont eux aussi confrontés à de fortes concentrations de toxiques dans les sols. En effet, des analyses du contenu en métaux révèlent souvent des accumulations importantes de zinc et de cadmium (Cayir et al., 2010; Radulescu et al., 2010).

LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC suppriment la sensibilité au zinc de la souche  $\Delta Zrc1$ . Ceci comporte les résultats de l'analyse phylogénétique et leur appartenance à la sous-famille Zn-CDF. Ainsi, à l'instar de ScZRC1 ou ScCOT1 (MacDiarmid et al., 2000), ils ont une fonction de détoxification de la cellule lors d'une augmentation de la concentration extracellulaire en zinc dans le milieu. LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC sont localisés au niveau du tonoplaste (figure 68, 69, 70). Cette localisation concorde avec celle décrite pour la protéine ZRC1 (Li & Kaplan), protéine de levure phylogénétiquement proche (membre de la sous-famille Zn-CDF) des trois LbCdf étudiés ici. Il serait maintenant intéressant de confirmer ceci en réalisant une localisation *in situ* chez *Laccaria bicolor* (comme par exemple une immuno-localisation).

ScMSC2 est un transporteur de zinc situé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et dont la fonction est le transport du zinc du cytoplasme au lumen du réticulum endoplasmique (Ellis et al., 2004). Dans la même étude, Ellis et al. montrent que la délétion du gène ScMSC2 n'entraîne aucun changement au niveau de la tolérance au zinc. ScMSC2 appartient au même cluster de la sous-famille Zn-CDF que LbCdfD. Nous n'avons pu réaliser de complémentation fonctionnelle de  $\Delta Zrc1$  ou  $\Delta Msc2$  avec LbCdfD. Néanmoins il serait intéressant de voir si ce dernier a une fonction similaire à ScMSC2. Zhf1, chez *Schizosaccharomyces pombe*, est lui aussi localisé au niveau du réticulum endoplasmique. Néanmoins, il présente une fonction différente de celle de ScMSC2. En effet, il a été

démontré par délétion que *Zhf1* a non seulement un rôle dans le stockage de zinc (comme *ScCot1* et *ScZrc1* dont il est phylogénétiquement proche) mais il a aussi un rôle important dans la détoxification (Borrelly et al., 2002, Clemens et al., 2002). Une caractérisation fonctionnelle de *LbCdfD* permettra d'apprécier si sa (ses) fonction(s) est proche de celle de *ScMSC2*.

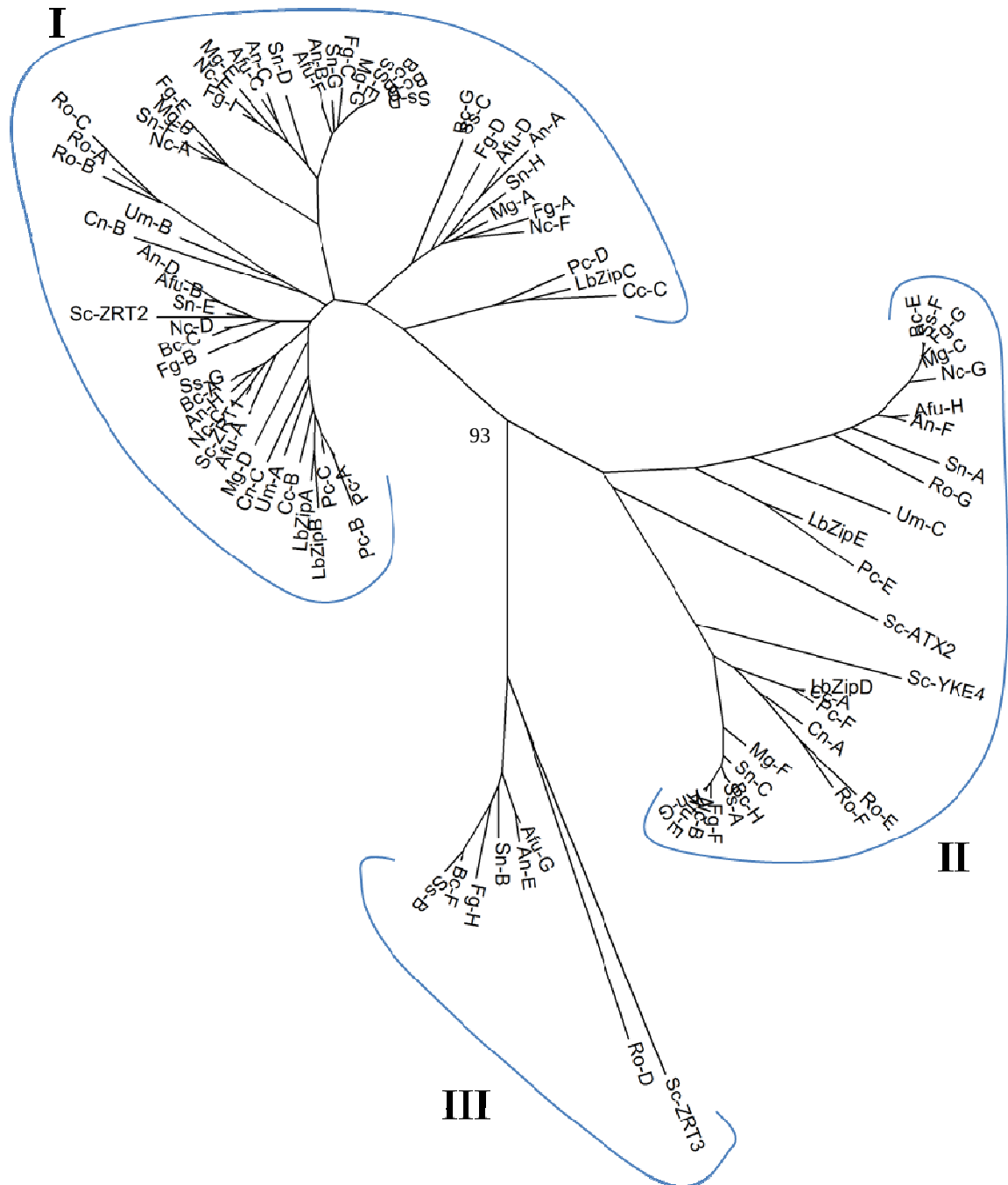
A l'instar de *ScZRC1* qui peut transporter le Zn, le Cd, mais ni le Fe ni le Mn (Lin et al., 2008), *LbCdfA*, *LbCdfB* et *LbCdfC* ne semblent pas être complètement spécifique au zinc. En effet, *LbCdfB* a un effet positif sur la tolérance au Mn, Co et Cd, tandis que *LbCdfC* semble plutôt avoir un effet sur la tolérance au Fe, Co et Cd. *LbCdfA* semble transporter le manganèse, dans une moindre mesure que *LbCdfB*. Cette restauration de la tolérance des souches mutantes spécifiques à un métal pourrait être due au transport des ions correspondants ( $Mn^{2+}$  pour  $\Delta Pmr1$ ,  $Co^{2+}$  pour  $\Delta Cot1$  et  $Fe^{2+}$  pour  $\Delta Ccc1$ ). Le cas du cadmium est particulier. En effet, aucun des gènes n'a rétabli la tolérance de la souche  $\Delta Ycf1$ , délétée pour le transporteur vacuolaire de Cd. La souche dont la tolérance au cadmium a augmenté (pour *LbCdfB* et *LbCdfC*) est  $\Delta Yap1$ . *Yap1p* est un facteur de transcription qui active la transcription de gènes « anti-oxydants » en réponse au stress oxydatif (Toone et Jones, 1999). De plus amples investigations sont nécessaires pour comprendre le(s) mécanisme(s) expliquant la restauration du phénotype sur une souche et non sur l'autre. Bien qu'un nombre croissant d'études d'interconnexion entre les réponses cellulaires à différents métaux soient réalisées, on ne comprend encore que très partiellement les interactions entre métaux. A titre d'exemple, une corrélation a été démontrée entre les mécanismes liés au cuivre et ceux liés au fer lors de la régulation du régulon cuivre (Winge et al, 1998; Gross et al. 2000). De même, des relations fer-cobalt ont été étudiées (Stadler et Schweyen, 2002). Il serait donc intéressant d'étudier et de comprendre les effets de la surexpression de *LbCdfA*, *LbCdfB* et *LbCdfC*, sur la tolérance au cuivre de la souche mutante de levure  $\Delta Cup2$ . *Cup2* est un gène régulant l'expression de *Cup1* (Buchman et al. 1989). Ce dernier code une métallothionéine liant le Cu chez la levure. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution de la concentration cytosolique d'un (ou plusieurs) métal transporté(s) par les protéines *LbCdfA*, *LbCdfB*, *LbCdfC* augmenterait l'effet de la délétion du gène *Cup2* en perturbant encore plus l'équilibre ionique de la cellule.

Quoiqu'il en soit, les restaurations de phénotype observées sur les milieux Cd, Mn, Fe ne sont que très partielles. Les 3 protéines *LbCdfA*, *LbCdfB* et *LbCdfC* sont donc essentiellement des

transporteurs de zinc (et cobalt pour LbCdfC), comme le suggérait leur positionnement sur l'arbre phylogénétique.







**Figure 71 :** Arbre phylogénétique des séquences protéiques des transporteurs de la famille ZIP de 15 organismes fongiques : *Aspergillus fumigatus* (Afu), *Aspergillus nidulans* (An), *Botrytis cinerea* (Bc), *Fusarium graminearum* (Fg), *Magnaporthe grisea* (Mg), *Neurospora crassa* (Nc), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Stagonospora nodorum* (Sn), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Coprinopsis cinerea* (Cc), *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Laccaria bicolor* (LbZip A à E), *Phanerochaete chrysosporium* (Pc), *Ustilago maydis* (Um), *Rhizopus oryzae* (Ro). Les noms des gènes de différents organismes sont indiqués Annexe 2. L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.0 après alignement des séquences avec CLUSTALX d'après la méthode du Neighbor-Joining (NJ). Les valeurs de Bootstrap sont données en chiffre.

Comme ce fut présenté dans l'introduction, l'homéostasie au zinc dans les cellules est assurée par la coordination des influx et des efflux de zinc, ainsi que par la distribution aux organites intracellulaires. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons discuté de la famille responsable de l'efflux du zinc hors du cytoplasme, la famille CDF. Cette présente partie va traiter des transporteurs de la famille ZIP dont les membres ont pour fonction l'influx de zinc dans le cytosol.

## IV.2. Analyse des transporteurs de la famille ZIP de *Laccaria bicolor* :

### IV.2.1. Analyse phylogénétique des transporteurs de la famille ZIP :

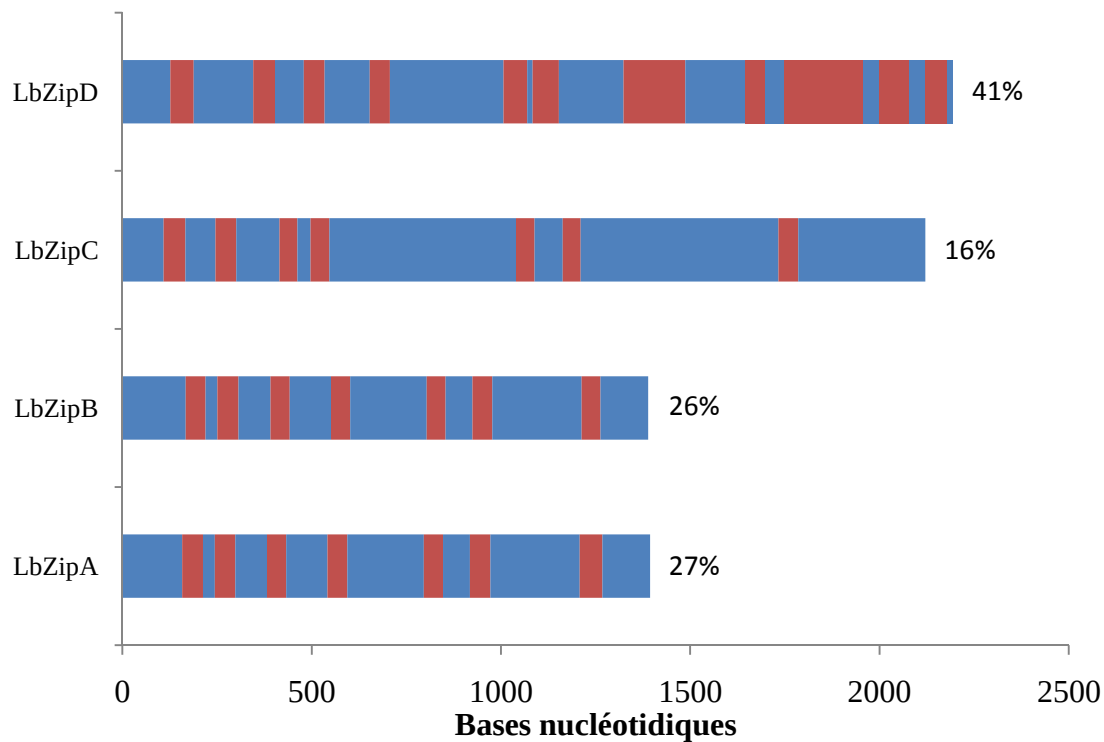
La présente étude considère 15 organismes : 9 Ascomycètes dont 1 Saccharomycotina (*Saccharomyces cerevisiae*), 8 Pezizomycotina (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Stagonospora nodorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*); 5 Basidiomycètes dont 4 Agaromycotina (*Coprinopsis cinerea*, *Cryptococcus neoformans*, *Laccaria bicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*) et 1 Ustilagomycotina (*Ustilago maydis*), 1 Zygomycètes (*Rhizopus oryzae*).

Les séquences ont été obtenues par BLAST en utilisant les séquences des protéines ZIP déjà identifiées comme matrices sur les bases de données de références de chacune de ces espèces (Annexe 2). Les séquences incomplètes (annexe 2) ont été corrigées manuellement par homologie avec les séquences déjà caractérisées, notamment celle de *S.cerevisiae*.

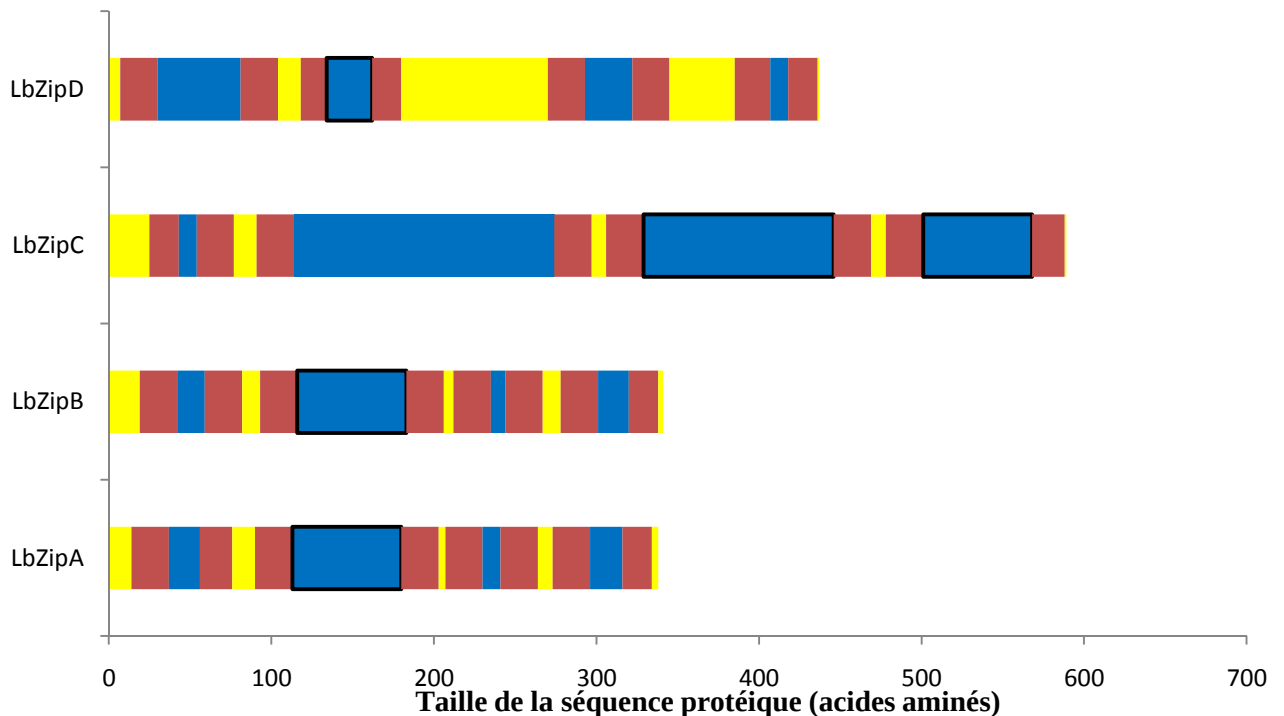
L'analyse de cette famille révèle 3 grandes sous-familles (figure 71). Les seuls membres ZIPs déjà connus et caractérisés sont ceux de *S. cerevisiae* et des champignons filamenteux *Aspergillus fumigatus* et *Neurospora crassa*. De fait, nous pouvons émettre des hypothèses sur les propriétés des transporteurs putatifs en utilisant la connaissance acquises de ces protéines de référence.

#### IV.2.1.1. Sous-famille I : Localisation putative sur la membrane plasmique :

On observe plusieurs clusters dans cette sous-famille. Chacun est spécifique soit des Ascomycètes soit des Basidiomycètes, à l'exception de celui contenant ScZRT1, ScZRT2, LbZipA et LbZipB. La présence dans ce groupe de ScZRT1 (Zhao et Eide, 1996a) et ScZRT2 (Zhao et Eide, 1996b), deux transporteurs de levure bien caractérisés, ainsi que celle de leurs homologues respectifs ZrfA et ZrfB d'*Aspergillus fumigatus* (Vicentefanqueira et al., 2005)



**Figure 72 :** Organisation des introns et exons dans les gènes étudiés. Les introns et exons de chaque gène sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Le pourcentage d'intron de chaque gène est inscrit en vis-à-vis du gène correspondant.



**Figure 73 :** Topologie des protéines ZIP : Les parties intracellulaires, transmembranaires et extracellulaires sont représentées respectivement en bleu, rouge et jaune. Les segments encadrés en noir représentent des régions riches en histidine, à savoir des régions présentant un minimum de 10% d'histidine au sein de leurs résidus totaux.

d'une part et Tzn1 et Tzn2 de *Neurospora crassa* (Kiranmayi et al., 2009) d'autre part, nous permet d'émettre l'hypothèse d'une localisation sur la membrane plasmique pour LbZipA, LbZipB voire LbZipC. Cette position phylogénétique permet d'émettre l'hypothèse d'une fonction liée l'influx de zinc dans la cellule, à l'instar des deux membres de *S. cerevisiae* sus-cités.

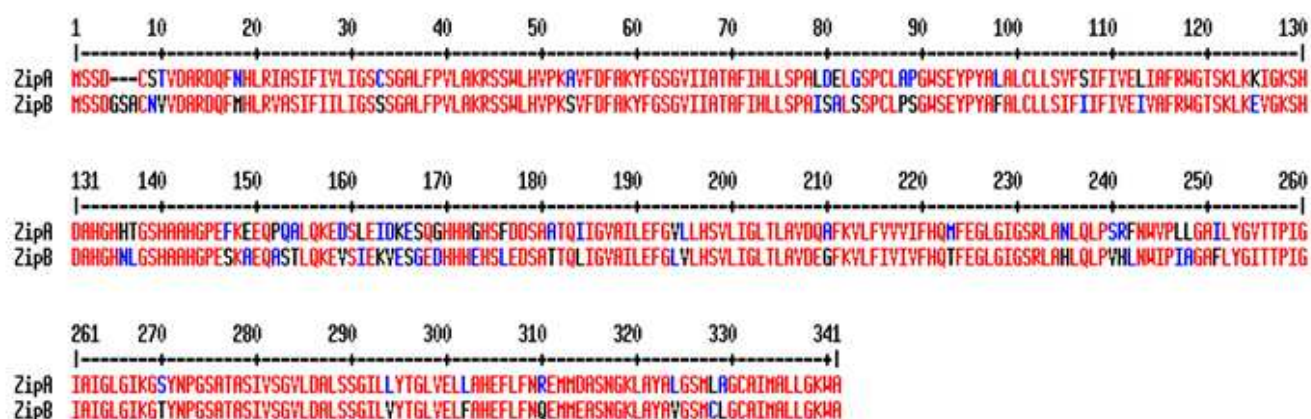
#### IV.2.1.2. Sous-famille II : Localisation putative sur les membranes internes de la cellule :

On observe, dans cette sous-famille, deux clusters constitués uniquement d'Ascomycètes. De même, les Basidiomycètes sont regroupés entre eux. Néanmoins, aux Basidiomycètes se rajoutent l'orthologue Zygomycète *R. oryzae* et les homologues de la levure. Ainsi, la protéine de levure, ScYKE4 (Kumanovics et al., 2006), est phylogénétiquement proche d'un représentant de *Laccaria bicolor*, LbZipD. De fait, on peut supposer une localisation sur la membrane du réticulum endoplasmique pour ce dernier. Pareillement, LbZipE paraît être l'orthologue de la protéine de *S.cerevisiae* ScATX2 (Lin et Culotta, 1996). Des études complémentaires sont nécessaires pour s'assurer que LbZipE partage la même localisation au niveau de l'appareil de Golgi, la même fonction ou le même substrat avec son homologue de levure, néanmoins, compte tenu de la forte probabilité d'un substrat principal différent du zinc, l'étude de cette protéine n'entre pas dans le cadre de ce manuscrit.

#### IV.2.1.3. Sous-famille III : Localisation putative sur la membrane vacuolaire :

Cette petite sous-famille contient un homologue de la levure, ZcZRT3. Ce dernier se localise dans la membrane vacuolaire et a pour fonction la remobilisation du zinc stocké dans cet organe en cas de carence (MacDiarmid et al., 2000).

On peut remarquer l'absence de protéines de Basidiomycètes parmi cette sous-famille, il n'y aurait donc pas de protéine ZIP impliquées dans la remobilisation du zinc vacuolaire dans cet embranchement.



**Figure 74 :** Alignement des séquences protéiques de LbZipA et LbZipB. Les acides aminés sont représentés en rouge si identiques ou similaires, en bleu et noir si différents.

#### IV.2.2. Etude de quelques gènes ZIPs de *Laccaria bicolor* :

##### IV.2.2.1. Etude de l'organisation des gènes d'intérêt :

Sur la figure 72, on observe que les introns occupent une proportion variable dans les ORFs des Zips étudiés de *Laccaria bicolor*. Ainsi, *LbZipA*, *LbZipB* et *LbZipC* présentent une proportion faible (respectivement 27, 26 et 16%) d'introns, contre 41% pour *LbZipD*.

*LbZipA* et *LbZipB* ont des tailles similaires (environ 1400 nucléotides) et une organisation génétique identique, leurs introns étant localisés au même niveau dans leur séquence génétique respective. Les deux autres gènes, *LbZipC* et *LbZipD*, ne présentent aucune similarité de taille ou d'organisation.

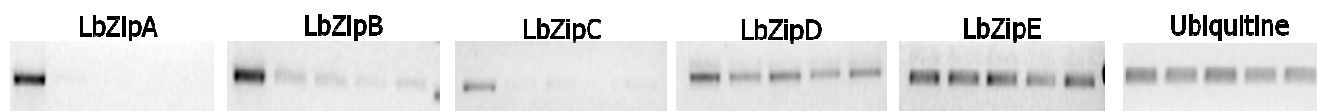
##### IV.2.2.2. Etude de la topologie des gènes:

D'après la figure 73, la topologie des protéines *LbZipA*, *LbZipB*, *LbZipC* et *LbZipD*, prédite par le logiciel TMHMM (Krogh, 2001), est similaire au modèle présenté par Eide (2006). En effet, il y a conservation du modèle à 8 domaines transmembranaires, avec les deux extrémités (N-terminale et C-terminale) localisées à l'extérieur du cytosol.

Avec respectivement 338 et 341 acides aminés, *LbZipA* et *LbZipB* présentent des tailles très similaires. *LbZipC* et *LbZipD* sont de tailles supérieures (respectivement 589 et 437 acides aminés). Les protéines *LbZipA*, *LbZipB* et *LbZipD* possèdent une région intracytoplasmique riche en histidine entre les régions transmembranaires III et IV. La protéine *LbZIPC* présente une organisation différente. En effet, elle possède deux longues boucles riches en histidine entre les domaines transmembranaires V et VI d'une part, et les domaines transmembranaires VII et VIII d'autre part.

##### IV.2.2.3. clonage des ADNc des gènes d'intérêt :

L'analyse de 4 transporteurs (*LbZipA*, *LbZipB*, *LbZipC* et *LbZipD*) a été réalisée en clonant dans le vecteur d'expression pYES2 conçu pour exprimer les ADN complémentaires d'intérêt en système hétérologue levure (*S. cerevisiae*).



**Figure 75 :** Expression des LbZips A à E et ubiquitine dans des échantillons de mycélium de *Laccaria bicolor* s'étant développés sur des milieux contenant des concentrations croissantes de zinc (respectivement 0 ; 3,7 µM ; 100 µM ; 250 µM et 500 µM de zinc). Ce travail a été réalisé en collaboration avec Laurence Lacercat (doctorante UMR 1136)

LbZipA et LbZipB, tous deux membres de la sous-famille I, sont proches phylogénétiquement (figure 71) et présentent sensiblement le même nombre de nucléotides (figure 72), le même nombre d'acides aminés (respectivement 338 et 341) et la même organisation au niveau de la structure secondaire (figure 73). Ils montrent néanmoins de nombreuses différences au niveau de la séquence protéique (figure 74). En effet, ils ont un taux d'identité de 82,8%. Ce sont vraisemblablement des paralogues.

#### IV.2.2.4. Niveau d'expression des ZIP :

##### IV.2.2.4.1. Expressions des gènes en condition de carence en zinc:

Nous avons étudié l'expression des transporteurs de *Laccaria bicolor* en condition de carence en zinc (figure 75). Les explants de mycélium sont cultivés deux semaines sur des concentrations différentes de zinc (de 0 à 500  $\mu$ M de zinc dans le milieu). D'après la figure 75, l'ubiquitine apparaît uniformément exprimée dans les différentes conditions.

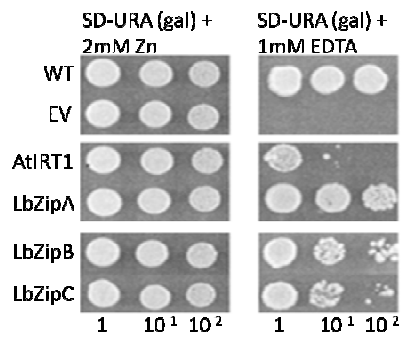
LbZip D et LbZip E présentent une expression équivalente quelque soit la concentration de zinc dans le milieu.

LbZip A, LbZip B et LbZip C présentent une forte diminution de leur expression dès que du zinc est rajouté dans le milieu (dès 3,75  $\mu$ M de zinc ajouté), leur expression semble donc être dépendante de la présence de zinc dans le milieu (figure 75).

##### IV.2.2.4.2. Analyse des ESTs des ZIPs de *Laccaria bicolor* :

A l'aide du site du Doe Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) et du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), nous avons identifié des ESTs correspondant à 3 des 4 gènes étudiés de *Laccaria bicolor*, LbZipA, LbZipC et LbZipD. Ainsi nous avons identifié 1 EST pour LbZipA (numéro d'accèsion GenBank : EX789251), 2 pour LbZipC (numéros d'accèsion GenBank : EX789937, EX789936) et 5





**Figure 76 :** Tests de complémentation de la levure mutante  $\Delta zhy3$ , exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbZipA, LbZipB ou LbZipC, ou transformée par le vecteur vide pYES2. La souche  $\Delta zhy3$ -vecteur vide (EV) sert de témoin négatif alors que la souche sauvage DY1457-vecteur vide (WT) et  $\Delta zhy3$ -AtIRT1 servent de témoins positifs. Plusieurs dilutions sont étalées (1 à  $10^{-2}$ ).

pour LbZipD (numéros d'accension Genbank : EX801326, X799387, EX801325, EX807193, EX807192).

Les ESTs de ces 3 gènes présentent une localisation tissulaire identique (mycélium et carpophore), sauf EX801326, EX801325, EX801325 et X807192 de LbZipD qui n'ont été obtenues qu'à partir du mycélium.

#### IV.2.2.5. Caractérisation fonctionnelle de quelques transporteurs de la famille ZIP :

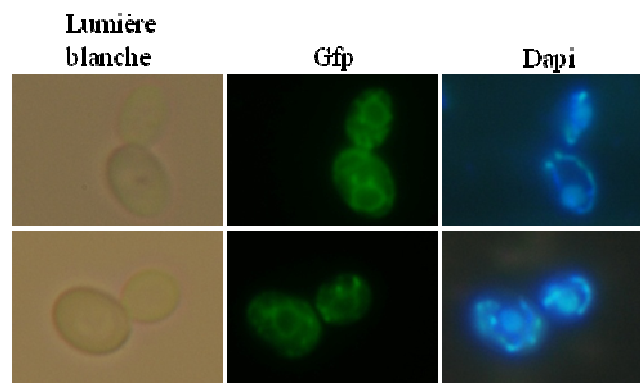
L'expression hétérologue de LbZipA, LbZipB et LbZipC, membres de la sous-famille I, est étudiée dans la souche mutante de levure  $\Delta zhy3$  où les deux principaux acteurs de l'influx de zinc dans la cellule, ScZRT1 et ScZRT2, ont été délétés. La souche sauvage et la souche mutante  $\Delta zhy3$ , transformées par le vecteur vide pYES2, sont utilisées comme témoins positif et négatif, respectivement (figure 76). AtIRT1 est le principal transporteur de fer de haute affinité chez *Arabidopsis thaliana*. Il a été démontré qu'AtIRT1, en condition de carence en fer, est surexprimé, il en résulte une augmentation de l'influx en zinc et cadmium vers le cytoplasme (Korshunova et al., 1999). AtIRT1 est utilisé ici, pour son aptitude à transporter le zinc, comme témoin positif. Toutes les souches poussent de manière équivalente sur la boîte témoin (SD-URA + galactose + Zn). L'ajout d'EDTA permet d'obtenir un milieu considéré sans zinc, l'EDTA étant un chélateur d'ions métalliques. Sur un milieu contenant 1 mM d'EDTA, la souche  $\Delta zhy3$  transformée par le vecteur vide pYES2 ne pousse pas. La souche sauvage, elle-même transformée par le vecteur vide pYES2, pousse de manière similaire sur les deux milieux. AtIRT1, témoin positif, pousse peu. LbZipA, LbZipB et LbZipC restaurent le phénotype de la souche mutante  $\Delta zhy3$ , permettant à la souche mutante d'absorber le zinc présent dans le milieu. Elles auraient donc une fonction proche de celles de ScZRT1 et ScZRT2 (Zhao et Eide, 1996a et b).



**Figure 77:** Localisation de la protéine LbZipA dans des cellules de levures exprimant LbZipA-GFP. Vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000).



**Figure 78 :** Localisation de la protéine LbZipB dans des cellules de levures exprimant LbZipB-GFP. Vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000).



**Figure 79 :** Localisation de la protéine LbZipD dans des cellules de levures exprimant LbZipD-GFP. Vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000). La coloration au Dapi (coloration du noyau en bleu) sert de contrôle de localisation.

#### IV.2.2.6. Localisation des transporteurs de la famille ZIP :

Les transporteurs de zinc LbZipA, LbZipB et LbZipD ont été clonés dans le vecteur d'expression pYES2 en fusion avec la GFP pour mettre en évidence leur localisation sub-cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

De nombreux membres de la famille ZIP sont localisés à la membrane plasmique tels ScZRT1 et ScZRT2, OsZIP4 chez le riz (Ishimaru et al., 2005).

Néanmoins des transporteurs de cette famille ont également été localisés sur d'autres membranes telles la membrane vacuolaire pour le transporteur ScZRT3 qui permet la remobilisation cytoplasmique du zinc contenu dans la vacuole (MacDiarmid et al. 2000), la membrane du réticulum endoplasmique pour la protéine ScYKE4, responsable de la remobilisation du zinc à partir du réticulum endoplasmique (Kumanovics et al., 2006) ou la membrane golgienne où ScATX2 intervient dans l'homéostasie au manganèse (Lin et Culotta, 1996).

Dans un premier temps, la visualisation des cellules de levures en lumière blanche permet de s'assurer de l'état de celles-ci.

Dans un second temps, les résultats obtenus avec le filtre GFP permettent d'émettre des hypothèses de localisation pour LbZipA, LbZipB et LbZipD

LbZipA et LbZipB semblent être localisées au niveau de la membrane plasmique (respectivement figure 77 et figure 78), à l'instar de ScZRT1 (Zhao et Eide, 1996a) et ScZRT2 (Zhao et Eide, 1996b), protéines de levure phylogénétiquement proches de ces deux ZIPs, comme nous l'avons vu précédemment (VI.1.2.1).

Pour LbZipD, la localisation à l'aide de la GFP (figure 79) montre clairement des membranes intracellulaires. L'utilisation de DAPI, un marqueur du noyau, permet de visualiser celui-ci. Grâce à ce contre-marquage, on peut observer qu'en grande partie la GFP fusionnée est présente sous forme de cercle fluorescent autour du noyau. De plus, des connexions allant du noyau à la périphérie de la cellule sont également visibles et représenteraient le réticulum endoplasmique dans ces régions. Ainsi, LbZipD, qui n'a pas encore été étudié par complémentarité de mutants de levure, serait localisé sur la membrane du réticulum endoplasmique, à l'instar de la protéine de levure phylogénétiquement la plus proche, ScYKE4 (Kumanovics et al., 2006).

#### IV.2.3 Discussions :

L'analyse phylogénétique de la famille Zip fait apparaître 3 sous-familles distinguées par leur localisation putative (en fonction de la localisation des protéines déjà caractérisées) au niveau de la membrane plasmique (sous-famille I), au niveau des membranes internes de la cellule (sous-famille II) ou au niveau de la membrane vacuolaire (sous-famille III). Il est intéressant de noter que les Basidiomycètes ne semblent pas posséder de membres de cette dernière sous-famille. Il serait intéressant d'étudier la remobilisation du zinc vacuolaire chez ces espèces.

La topologie des protéines LbZipA, LbZipB, LbZipC et LbZipD est similaire au modèle présenté par Eide (2006), avec notamment la conservation du modèle à 8 domaines transmembranaires, avec les deux extrémités (N-terminale et C-terminale) localisées à l'extérieur du cytosol.

Chez la plupart des protéines ZIP, la région située entre les domaines transmembranaires III et IV est appelée région variable et contient généralement un domaine riche en histidine (Eide, 2006). Ce domaine est, selon les prévisions, cytoplasmique. Les études sus-citées postulent que ce domaine sert de site de liaison aux ions métalliques. Néanmoins, Gitan et al. (2003) ont démontré que, dans le domaine riche en histidine de la protéine ScZRT1 de *S. cerevisiae*, le remplacement de tous les résidus histidines par des résidus glutamine n'entraîne aucun effet apparent sur la fonction de transporteur mais altère la localisation subcellulaire. Des mutations dans ce même domaine dans les protéines humaines hZIP1 et hZIP4 n'entraîne pas d'altération de la localisation mais une réduction de l'absorption du Zn (Mao et al., 2007; Milon et al., 2006). De plus, le domaine riche en histidine de hZIP4 est essentiel pour l'ubiquitination servant à la dégradation de cette protéine (Mao et al., 2007).

On observe de nombreux effets différents suite à des mutations dans cette région riche en histidine, ceci indique que le rôle de cette région ne semble pas être la même pour tous les membres de la famille ZIP.

*LbZip A*, *LbZip B* et *LbZip C* présentent une expression régulée par la concentration en zinc dans le milieu, au contraire de ce que l'on observe pour *LbZip D* et *LbZip E*. Il serait intéressant d'étudier les affinités des transporteurs codés par ces gènes, pour voir si elles pourraient correspondre ressemblent à ce que l'on peut observer chez la levure. En effet, *S. cerevisiae* possède deux systèmes distincts d'absorption du zinc de l'environnement. Un système a forte affinité pour le zinc nommé ScZRT1. Un second système est codé par le gène

*ZRT2* et a une faible affinité pour le zinc (Zhao et Eide, 1996). *ZRT1* et *ZRT2* sont régulés par la disponibilité en zinc. Ce système a deux niveaux d'affinité est retrouvé chez *Neurospora crassa* et *Aspergillus fumigatus*, les deux champignons filamenteux dont des membres de la famille ZIP ont déjà été caractérisés. Ainsi NcTzn1 et AfZrfa sont les homologues de ScZrt1 tandis NcTzn2 et AfZrfb sont les homologues de ScZrt2. Néanmoins il est intéressant de remarquer que AfZrfb, qui devrait être un transporteur de faible affinité, par homologie avec ScZrt2, est, en fait, le principal acteur de l'absorption du zinc par les cellules d'*Aspergillus fumigatus* tant sa gamme de concentration de zinc est importante en comparaison de celle de AfZrfA (Vicente-franqueira et al., 2005). Une carence en zinc induit la transcription de *ZRT1* et *ZRT2*, alors que la croissance dans des conditions d'excès en zinc réprime l'expression. Cette régulation de la transcription requiert l'activité du gène *ZAP1* (Zhao et Eide, 1997). *ZAP1* est un activateur de transcription qui contrôle directement l'expression des gènes sensibles au zinc dans la levure (Zhao et al., 1998).

Il serait intéressant de rechercher et étudier ce facteur transcriptionnel chez *L. bicolor*.

LbZipA et LbZipB sont localisés au niveau de la membrane plasmique (respectivement figure 77 et figure 78), à l'instar de ScZRT1 (Zhao et Eide, 1996a) et ScZRT2 (Zhao et Eide, 1996b), protéines de levure phylogénétiquement proches de ces deux ZIPs, comme nous l'avons vu précédemment (VI.1.2.1).

LbZipD serait localisé sur la membrane du réticulum endoplasmique, à l'instar de la protéine de levure phylogénétiquement la plus proche, ScYKE4 (Kumanovics et al., 2006). Il serait maintenant intéressant de confirmer ceci en réalisant une localisation *in situ* chez *Laccaria bicolor*.



# Conclusions générales et perspectives

---



L'impact de la pollution par les métaux lourds sur l'écosystème est indéniable avec notamment comme conséquence des changements drastiques au niveau des communautés présentes. L'objectif général des travaux de cette thèse était d'étudier les déterminants moléculaires permettant aux microorganismes eucaryotes de tolérer de fortes concentrations de métaux lourds dans le milieu environnant. Deux approches ont ainsi été mises en œuvre. D'une part une approche innovante de métatranscriptomique a été menée afin d'étudier les réponses de l'ensemble des microorganismes telluriques eucaryotes à une pollution multimétallique. D'autre part, une approche ciblée au niveau de l'organisme modèle *Laccaria bicolor* a été réalisée afin de mettre en évidence les déterminants impliqués dans l'homéostasie au zinc des cellules.

**Le premier objectif de ma thèse était d'étudier le métatranscriptome de microorganismes eucaryotes soumis à une pollution métallique, dans le cadre du projet ANR EUMETATOX.**

Dans un premier temps, des prélèvements sur trois sites d'étude (sols pollué, anciennement pollué et non pollué) ont été effectués (chapitre III.1). Les échantillons de sol ont été prélevés sur une surface importante afin de s'assurer de la meilleure représentativité possible de la microflore. Suite à des analyses des concentrations en métaux lourds dans ces sols, y compris dans la fraction échangeable de ceux-ci, mais également dans les organismes présents, le site de Paal fut considéré comme site témoin non pollué et Balen comme site pollué. Lommel, de par son passé métallurgique (une zinguerie y a exercé son activité pendant plusieurs dizaines d'années), et initialement prévu pour être le site d'étude « sol pollué », fut finalement considéré comme un site anciennement pollué au vu des mesures effectuées. La majorité de la pollution métallique constatée dans les années 1980-1990 ayant disparu des horizons superficiels du sol. La structure du sol étant très sableuse et ne contenant que très peu de matière organique, un phénomène de lessivage pourrait ainsi être la cause de la diminution de la contamination aux niveaux de ces horizons. Cet imprévu a nécessité la recherche d'un autre site pollué (Balen). Si ce point a permis d'alerter d'autres collègues effectuant des travaux sur ce site supposé pollué, il a eu pour conséquence de retarder significativement l'avancée des travaux concernant la construction des banques d'ADNc environnementaux.

L'étude de la diversité biologique présente sur les trois sites révèle une différence entre les aspects macroscopique et microscopique. En effet, d'un point de vue macroscopique (flore)

les sites de Lommel et Paal sont très proches alors que du point de vue microscopique, ils sont assez éloignés. Les analyses des séquences des ADNr et ARNr 18S nous montrent cependant une plus grande similitude entre Balen et Paal.

Ces premiers résultats soulignent l'importance d'un choix éclairé et approfondi des sites expérimentaux. Il faut noter que l'obtention de sites expérimentaux naturels complètement identiques est cependant illusoire. De petites variations dans la texture, la physico-chimie et les populations des sols seront en effet toujours présentes (de part l'historique du sol, l'influence de l'environnement, les coordonnées géographiques, l'impact de la pollution,...)

En ce qui concerne l'analyse comparative du séquençage aléatoire de banques d'ADNc du sol contaminé (Balen) et de celui non contaminé (Paal) aux métaux lourds par le Génoscope, cette partie du projet devrait apporter de plus amples renseignements et compléter cette étude sur la diversité moléculaire. Néanmoins, le nombre d'ADNc séquencés par sites avoisinant les 30000, ces résultats ne seront que parcellaires. Des méthodes de séquençage à très haut débit devront être utilisées pour répondre à ce problème. Ces données de séquençage pourront être utilisées pour rechercher de nouveaux membres de familles de gènes connues participant à la détoxification des métaux soit par une approche bioinformatique soit par une approche de biologie moléculaire, par PCR à l'aide d'amorces spécifiques obtenues à partir de régions conservées de gènes connus.

Une des étapes critiques était l'extraction des acides nucléiques, suivie d'une sélection des ARNm eucaryotes en ciblant les queues polyA pour les purifier. Nos partenaires lyonnais du projet ANR ont ainsi construit une banque d'ADN complémentaire par site étudié. Ces banques furent utilisées pour analyser la diversité fonctionnelle exprimée dans ces conditions.

Le criblage de ces banques par complémentation fonctionnelle s'est avéré être une méthode efficace bien que très coûteuse en terme de temps et de moyens. Il serait très intéressant de pouvoir automatiser cette étape, ce qui permettrait un criblage plus efficace. Un des points cruciaux à améliorer est le domaine de couverture de la banque lors du criblage. Couvrir une seule fois la banque peut ne pas être suffisant pour obtenir les réponses totales à nos hypothèses quant à la diversité des mécanismes mis en œuvre par les communautés eucaryotes pour s'adapter aux pollutions métalliques. Néanmoins, les résultats obtenus

valident la méthode de manière très satisfaisante. Cette dernière aura permis, au niveau des mécanismes de tolérance au zinc et/ou au cadmium, la détection de nouvelles protéines (Lehembre, 2009), ainsi que de nouvelles fonctions pour des protéines connues tels les membres de la famille SKP1 ou de la famille BOLA (chapitre III).

Pour les 5 familles de protéines révélées par les études de complémentation fonctionnelle d'un mutant déficient dans la tolérance au zinc réalisées lors de cette thèse, les travaux devront s'orienter maintenant vers la compréhension fine des mécanismes d'action qui restaurent la tolérance au zinc chez le mutant. Celle-ci devra s'appuyer, entre autres, sur la localisation sub-cellulaire de ces protéines grâce à des fusions avec la GFP, sur des mesures des pools de zinc dans les cellules ou dans les différents compartiments cellulaires, sur l'utilisation de différents fonds génétiques, ou encore sur une étude des partenaires interagissant avec ces protéines.

**Pour la première fois, des banques environnementales d'ADNc des organismes eucaryotes ont été construites à partir d'ARN extraits directement de sols.**

Le criblage de ces banques environnementales en mutants de levure a été validé par complémentation fonctionnelle de mutants de levure. **Les premiers gènes "environnementaux" conférant une résistance au Zn ont ainsi pu être isolés.** D'une manière plus générale, cette stratégie devrait permettre, dans le futur, la détection puis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans des fonctions d'intérêt en biotechnologie.

**Le second objectif de ce travail était d'étudier l'homéostasie et la tolérance au zinc chez le champignon modèle ectomycorhizien *Laccaria bicolor*.**

Dans cette partie, nous avons focalisé nos travaux de recherche sur quelques protéines des familles CDF et ZIP. Ces deux familles sont, chez les eucaryotes, les acteurs majeurs du trafic intracellulaire du zinc (Eide, 2006).

L'étude phylogénétique de ces deux familles nous a amené à considérer 4 sous-familles pour chacune de ces deux familles. En ce qui concerne la famille CDF, nous nous sommes intéressés à la sous-famille I (sous-famille Zn-CDF), dont font partie ScZRC1 et ScCOT1.

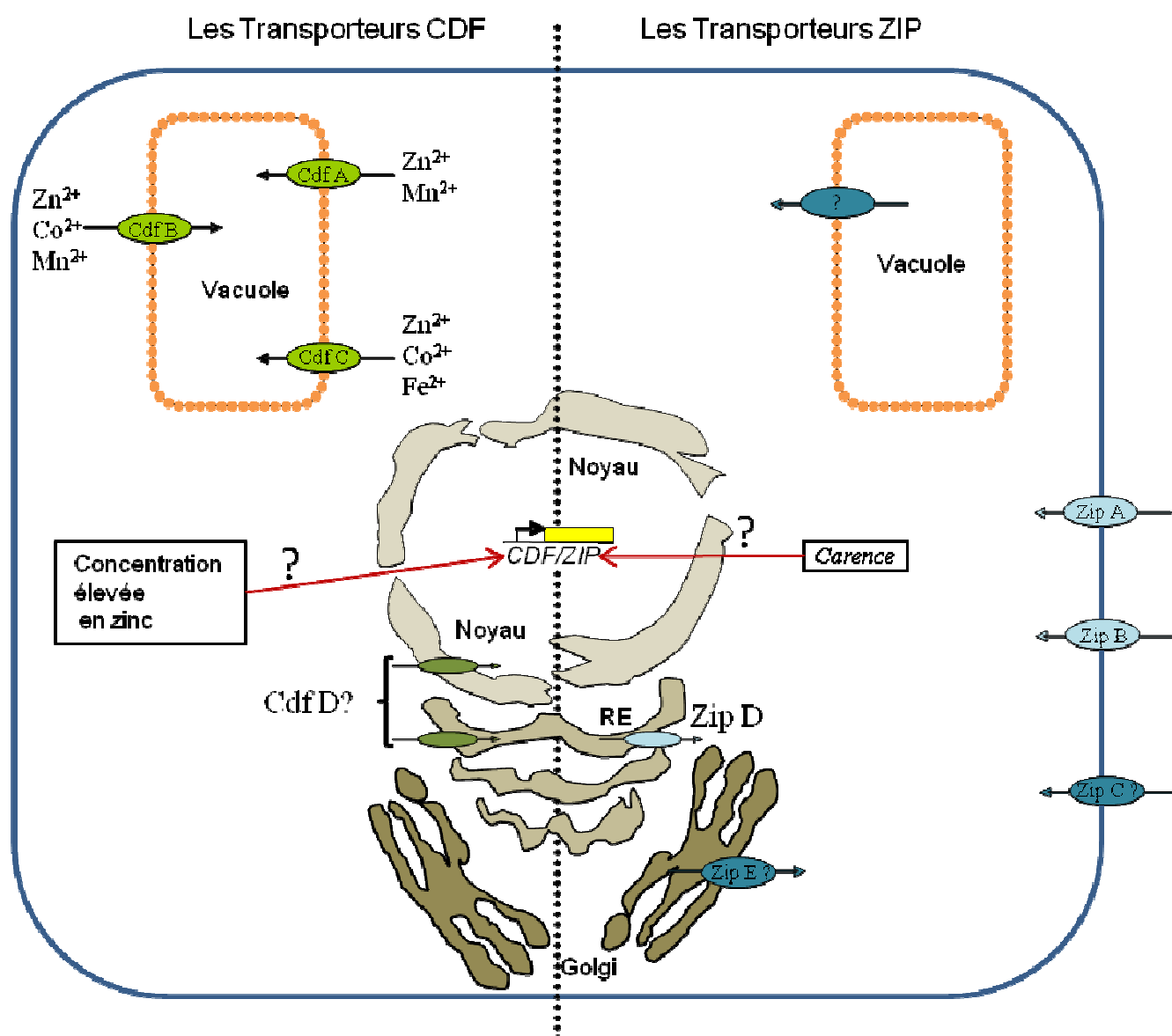
Ces deux transporteurs de *Saccharomyces cerevisiae*, localisés au niveau de la membrane vacuolaire, sont les principaux acteurs de la tolérance au zinc chez la levure. Cette tolérance au zinc étant conférée par une séquestration importante de cet élément au niveau de la vacuole. Les protéines CDF de *L. bicolor* LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC s'avèrent être les membres les plus proches des transporteurs ZRC1 et COT1. Notre étude s'est donc focalisée sur la caractérisation fonctionnelle de ces trois gènes.

Les protéines LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC sont toutes trois localisées au niveau de la membrane vacuolaire. Cette localisation commune est cohérente avec l'expansion du nombre de gènes que présente le champignon ectomycorhizien *L. bicolor* (Martin et al., 2008). Une redondance de fonction a pu être notée pour différents membres d'une même famille. Cependant cette multiplicité de gènes peut s'expliquer par des spécificités (et/ou affinités) différentes pour divers substrats métalliques. Ainsi LbCdfA est un transporteur de zinc et peut être de manganèse, LbCdfB transporte le zinc, et dans une moindre mesure le cobalt et le manganèse, tandis que LbCdfC transporte quant à lui le zinc et le cobalt. De plus, il est important de noter que le niveau d'expression de LbCdfB est très important dans la mycorhize, suggérant éventuellement un événement de néo-fonctionnalisation pour LbCdfB. Il serait tentant de lui attribuer un rôle potentiel de protection au zinc pour les tissus de la plante hôte lors de l'association symbiotique.

En ce qui concerne la famille ZIP, nous avons focalisé notre étude sur les protéines de *Laccaria bicolor* les plus proches de ScZRT1 et ScZRT2, les transporteurs de zinc de la levure, situés sur la membrane plasmique, et responsables de l'influx de ce métal dans la cellule (Zhao et Eide, 1996a et b). Nous avons pu mettre en évidence par une étude phylogénétique que ces membres ZIP de la sous-famille I sont les homologues de LbZipA et LbZipB, et dans une moindre mesure de LbZipC. LbZip A et LbZipB sont situés sur la membrane plasmalemmique et pourraient présenter des affinités différentes pour le zinc. LbZip D, dont la caractérisation (notamment les travaux sur sa fonction exacte) fera l'objet de travaux futurs, est situé au niveau du réticulum endoplasmique. Aucun LbZip n'a été détecté, pour le moment, sur la vacuole.

La figure 87 résume nos connaissances actuelles sur l'homéostasie et la tolérance au zinc chez *Laccaria bicolor*. Des travaux supplémentaires devront encore être menés pour compléter et vérifier ce modèle proposé. En plus de poursuivre l'effort de caractérisation de ces gènes, il

faudrait envisager l'étude des sites d'accumulation du zinc en réalisant des expériences de localisation de cet élément avec un marqueur fluorescent (zinquin) (Kimber et al., 2003) ou à l'aide de techniques de microscopies électroniques. Il sera également nécessaire d'étudier l'affinité de ces transporteurs, par exemple via des marquages isotopiques. Il serait intéressant de comprendre les mécanismes d'action des transporteurs, notamment leur implication dans la baisse de tolérance observée lors des tests de complémentation fonctionnelle avec d'autres mutants de levures (chapitre IV.1.2.5.1.2). Un effort particulier devra être réalisé dans l'étude de la régulation des gènes impliqués dans l'homéostasie et la tolérance au zinc chez *Laccaria bicolor* (étude des promoteurs des gènes, recherche d'éventuels facteurs de transcription tel ScZAP1 chez la levure, ...). Parallèlement, des études concernant l'utilisation d'outils de transformation de *L. bicolor*, associés à des stratégies d'obtention de mutants (souches KO ou lignées RNAi) (outils encore en phase de développement par des collègues de l'UMR) devraient à moyen terme permettre une acquisition de connaissances fondamentales plus fines au niveau de cette thématique. Enfin, une meilleure compréhension de ces mécanismes de tolérance devrait permettre à terme d'élucider le rôle exact des champignons mycorhiziens quant au degré de protection conféré à la plante hôte contre le stress métallique.



**Figure 87 :** Modèle proposé du trafic intracellulaire du zinc issu de l'activité des protéines CDF et ZIP chez *Laccaria bicolor*. Les transporteurs de la famille CDF sont représentés en vert et les transporteurs de la famille ZIP en bleu. Les localisations cellulaires des transporteurs étudiés lors de cette thèse sont déduites d'après les résultats d'analyses phylogéniques (en foncé) ou de caractérisation fonctionnelle par fusion GFP (en clair)). Les mécanismes de régulation de ces gènes sont de futurs axes de recherche. Ils sont représentés sur la figure en se référant à la régulation des gènes homologues de *Saccharomyces cerevisiae*.



## Références bibliographiques

---



- A. Minge, M., Silberman, J.D., Orr, R.J.S., Cavalier-Smith, T., Shalchian-Tabrizi, K., Burki, F., Skaveland, Å., and Jakobsen, K.S. (2009) Evolutionary position of breviate amoebae and the primary eukaryote divergence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1657), 597-604.
- Abdel-Fattah, G.M., and Shabana, Y.M. (2002) Efficacy of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in protection of cowpea plants against root rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 109(2), 207-215.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, Å., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., and Taylor, M.F.J.R. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399-451.
- Adriaensen, K., Van Der Lelie, D., Van Laere, A., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2004) A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytologist*, 161(2), 549-555.
- Adriaensen, K., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2006) Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza*, 16(8), 553-558.
- Adriaensen, K., Vralstad, T., Noben, J.P., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2005) Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. *Appl Environ Microbiol*, 71(11), 7279-7284.
- Ahonen-Jonnarth, U., Van Hees, P.A.W., Lundstrom, U.S., and Finlay, R.D. (2000) Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytologist*, 146(3), 557-567.
- Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W., and Wootton, J.C. (1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genetics*, 6(2), 119-129.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Sch  ffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Alvarez, M., Huygens, D., Olivares, E., Saavedra, I., Alberdi, M., and Valenzuela, E. (2009) Ectomycorrhizal fungi enhance nitrogen and phosphorus nutrition of *Nothofagus dombeyi* under drought conditions by regulating assimilative enzyme activities. *Physiol Plant*, 136(4), 426-436.
- Amaral Zettler, L.A., Gomez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R., and Sogin, M.L. (2002) Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature*, 417(6885), 137.
- Annesley, S.J., and Fisher, P.R. (2009) *Dictyostelium discoideum*-a model for many reasons. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 329(1-2), 73-91.
- Appenroth, K.J. (2009) What are "heavy metals" in Plant Sciences? *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), 615-619.
- Archibald, J.M. (2005) Jumping genes and shrinking genomes - Probing the evolution of eukaryotic photosynthesis with genomics. *IUBMB Life*, 57(8), 539-547.
- Arinc, E., and Cakir, D. (1999) Simultaneous purification and characterization of cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 from sheep liver. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(2), 345-362.
- Arnon, D.I., and Stout, P.R. (1939) Molybdenum as an Essential Element for Higher Plants. *Plant Physiol*, 14(3), 599-602.

- Arriagada, C., Pereira, G., García-Romera, I., and Ocampo, J.A. (2010) Improved zinc tolerance in *Eucalyptus globulus* inoculated with *Glomus deserticola* and *Trametes versicolor* or *Coriolopsis rigida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(1), 118-124.
- Audet, P., and Charest, C. (2006) Effects of AM colonization on "wild tobacco" plants grown in zinc-contaminated soil. *Mycorrhiza*, 16(4), 277-283.
- Audet, P., and Charest, C. (2008) Allocation plasticity and plant-metal partitioning: Meta-analytical perspectives in phytoremediation. *Environmental Pollution*, 156(2), 290-296.
- Aury, J.M., Jaillon, O., Duret, L., Noel, B., Jubin, C., Porcel, B.M., S gurens, B., Daubin, V., Anthouard, V., Aiach, N., Arnaiz, O., Billaut, A., Beisson, J., Blanc, I., Bouhouche, K.,  mara, F., Duharcourt, S., Guigo, R., Gogendeau, D., Katinka, M., Keller, A.M., Kissmehl, R., Klotz, C., Koll, F., Le Mou l, A., Lep re, G., Malinsky, S., Nowacki, M., Nowak, J.K., Plattner, H., Poulain, J., Ruiz, F., Serrano, V., Zagulski, M., Dessen, P., B termier, M., Weissenbach, J., Scarpelli, C., Sch chter, V., Sperling, L., Meyer, E., Cohen, J., and Wincker, P. (2006) Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*, 444(7116), 171-178.
- Bailly, J., Fraissinet-Tachet, L., Verner, M.C., Debaud, J.C., Lemaire, M., Wesolowski-Louvel, M., and Marmesse, R. (2007) Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *Isme J*, 1(7), 632-642.
- Baize, D. (1997) Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. INRA  ditions, Paris. 410 p.
- Baize, D. and Terc , M. (Coordonnateurs) (2002) Les éléments traces métalliques dans les sols – Approches fonctionnelles et spatiales. INRA  ditions, Paris. 570 p.
- Barba-Brioso, C., Fernandez-Caliani, J.C., Miras, A., Cornejo, J., and Galan, E. (2010) Multi-source water pollution in a highly anthropized wetland system associated with the estuary of Huelva (SW Spain). *Mar Pollut Bull*, 60(8), 1259-1269.
- Bargagli, R. (1998) Trace elements in terrestrial plants. An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer. 324 p.
- Barbey, R., Baudouin-Cornu, P., Lee, T.A., Rouillon, A., Zarzov, P., Tyers, M., and Thomas, D. (2005) Inducible dissociation of SCF<sup>Met30</sup> ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium. *EMBO Journal*, 24(3), 521-532.
- Battaglia-Brunet, F., Joulain, C., Garrido, F., Dictor, M.C., Morin, D., Coupland, K., Barrie Johnson, D., Hallberg, K.B., and Baranger, P. (2006) Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(1), 99-108.
- Belagyi, J., Pas, M., Raspor, P., Pesti, M., and Pali, T. (1999) Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1421(1), 175-182.
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D., and Chalot, M. (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 254(2), 173-181.
- Bending, G.D., and Read, D.J. (1995) The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. VI. Activities of nutrient mobilizing enzymes in birch litter colonized by *Paxillus involutus* (Fr.) Fr. *New Phytologist*, 130(3), 411-417.
- Bhattacharya, D., Helmchen, T., and Melkonian, M. (1995) Molecular evolutionary analyses of nuclear-encoded small subunit ribosomal RNA identify an independent rhizopod lineage containing the Euglyphina and the Chlorarachniophyta. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(1), 65-69.

- Bhavana, A., Vibha, S., Rekha, T.C., and Praveen, J. (2009) Heavy metals contamination and its potential health risk with special reference to Narmada river at Nimar Region of Madhya Pradesh. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 13(4), 23-27.
- Blaudez, D., Botton, B., and Chalot, M. (2000) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, 146 ( Pt 5), 1109-1117.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D., and Chalot, M. (2003) Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell*, 15(12), 2911-2928.
- Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*, 91 Spec No, 179-194.
- Bojarczuk, K., and Kieliszewska-Rokicka, B. Effect of ectomycorrhiza on Cu and Pb accumulation in leaves and roots of silver birch (*Betula pendula* Roth.) seedlings grown in metal-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 207(1-4), 227-240.
- Bourrelrier, P.H. and Berthelin J. (1998) Contamination des sols par les éléments traces : les risques et leur gestion. *CR Acc Sci*, 42. Ed. Lavoisier, Paris.
- Brearley, F.Q., Scholes, J.D., and Su See, L. (2005) Nitrogen nutrition and isotopic discrimination in tropical ectomycorrhizal fungi. *Res Microbiol*, 156(2), 184-190.
- Bregadze, V.G., Gelagutashvili, E.S., Tsakadze, K.J., and Melikishvili, S.Z. (2008) Metal-induced point defects in DNA: model and mechanisms. *Chem Biodivers*, 5(10), 1980-1989.
- Brun, L.A., Maillet, J., Richarte, J., Herrmann, P., and Remy, J.C. (1998) Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution*, 102(2-3), 151-161.
- Brundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2), 275-304.
- Bruneel, O., Personne, J.C., Casiot, C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Mahler, B.J., Le Fleche, A., and Grimont, P.A. (2003) Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoules, France). *J Appl Microbiol*, 95(3), 492-499.
- Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S., and Karin, M. (1989) The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*, 9(9), 4091-4095.
- Bucking, H., and Heyser, W. (2001) Microautoradiographic localization of phosphate and carbohydrates in mycorrhizal roots of *Populus tremula* x *Populus alba* and the implications for transfer processes in ectomycorrhizal associations. *Tree Physiol*, 21(2-3), 101-107.
- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., SkjÅveland, Å., Nikolaev, S.I., Jakobsen, K.S., and Pawlowski, J. (2007) Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS One*, 2(8).
- Cabantous, S., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2005) Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 23(1), 102-107.
- Carucci, D.J. (2001) Functional genomic technologies applied to the control of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Pharmacogenomics*, 2(2), 137-142.
- Cavalier-Smith, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters*, 6(3), 342-345.
- Cavalier-Smith, T. (2003) Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, 39(4), 338-348.
- Cavalier-Smith, T. (2004) Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1545), 1251-1262.

- Cavalier-Smith, T. (2009) Predation and eukaryote cell origins: A coevolutionary perspective. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(2), 307-322.
- Cavalier-Smith, T., and Chao, E.E. (1997) Sarcomonad ribosomal RNA sequences, rhizopod phylogeny, and the origin of euglyphid amoebae. *Archiv fur Protistenkunde*, 147(3-4), 227-236.
- Cavalier-Smith, T., and Chao, E.E.Y. (2003) Phylogeny and Classification of Phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*, 154(3-4), 341-358.
- Cayir, A., , Coşkun, M. (2010) The heavy metal content of wild edible mushroom samples collected in canakkale province, Turkey. *Biological Trace Element Research* 134 (2) pp. 212-219.
- Chalot, M., and Brun, A. (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol Rev*, 22(1), 21-44.
- Chalot, M., Javelle, A., Blaudez, D., Lambilliotte, R., Cooke, R., Sentenac, H., Wipf, D., and Botton, B. (2002) An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil*, 244(1-2), 165-175.
- Charitha Devi, M., and Reddy, M.N. (2002) Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and Rhizobium. *Plant Growth Regulation*, 37(2), 151-156.
- Chen, Z., Zhao, Y., Zhu, Y., Yang, X., Qiao, J., Tian, Q., and Zhang, Q. Health risks of heavy metals in sewage-irrigated soils and edible seeds in langfang of hebei province, China. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 314-320.
- Chiaverini, N., and De Ley, M. (2010) Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic Res*, 44(6), 605-613.
- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S., and Berta, G. (2005) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. *Chemosphere*, 59(1), 21-29.
- Clemens, S., and Simm, C. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: The phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. *New Phytologist*, 159(2), 323-330.
- Colpaert, J.V., Adriaensen, K., Muller, L.A., Lambaerts, M., Faes, C., Carleer, R., and Vangronsveld, J. (2005) Element profiles and growth in Zn-sensitive and Zn-resistant Suilloid fungi. *Mycorrhiza*, 15(8), 628-634.
- Colpaert, J.V., Muller, L.A.H., Lambaerts, M., Adriaensen, K., and Vangronsveld, J. (2004) Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New Phytologist*, 162(2), 549-559.
- Colpaert, J.V., Vandenkoornhuyse, P., Adriaensen, K., and Vangronsveld, J. (2000) Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytologist*, 147(2), 367-379.
- Conklin, D.S., McMaster, J.A., Culbertson, M.R., and Kung, C. (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 12(9), 3678-3688.
- Courbot, M., Diez, L., Ruotolo, R., Chalot, M., and Leroy, P. (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Appl Environ Microbiol*, 70(12), 7413-7417.
- Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M.S., August, P.R., Nalin, R., Guérineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., and Pernodet, J.L. (2003) Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol*, 69(1), 49-55.

- Courty, P.E., Hoegger, P.J., Kilaru, S., Kohler, A., Buée, M., Garbaye, J., Martin, F., and KÃ¼es, U. (2009) Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 182(3), 736-750.
- Culotta, V.C., Yang, M., and Hall, M.D. (2005) Manganese transport and trafficking: Lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(7), 1159-1165.
- Cumming, J.R., Swiger, T.D., Kurnik, B.S., and Panaccione, D.G. (2001) Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum in vitro. *Canadian Journal of Forest Research*, 31(4), 703-710.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., and Furini, A. (2008) How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol*, 50(10), 1268-1280.
- De Andrade, S.A.L., and Da Silveira, A.P.D. (2008) Mycorrhiza influence on maize development under Cd stress and P supply. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20(1), 39-50.
- De Andrade, S.A.L., Da Silveira, A.P.D., Jorge, R.A., and De Abreu, M.F. (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International Journal of Phytoremediation*, 10(1), 1-13.
- Del Val, C., Barea, J.M., and Azcon-Aguilar, C. (1999) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol*, 65(2), 718-723.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G., and Ryan, P.R. (2003) Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell*, 15(5), 1131-1142.
- Deshaies, R. (1999) Mechanism and regulation of the SCF ubiquitination pathway. *Kidney International*, 56(4), 1186-1187.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp 435-467.
- Diaz-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., and Mullany, P. (2003) Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1430-1432.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(11), 5624-5628.
- Eide, D.J. (2003) Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr*, 133(5 Suppl 1), 1532S-1535S.
- Eide, D.J. (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), 711-722.
- Ellis, C.D., Macdiarmid, C.W., and Eide, D.J. (2005) Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J Biol Chem*, 280(31), 28811-28818.
- Ernest, A.K., Nagnin, S., Gbombélé, S., Théophile, L., Solange, O.M., and Zade, P.S. (2008) Groundwater pollution in Africans biggest towns: Case of the town of Abidjan (Cote d'Ivoire). *European Journal of Scientific Research*, 20(2), 302-316.
- Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., and Chen, M. (2010) Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 151(3), 325-333.
- Faraco, V., Giardina, P., and Sannia, G. (2003) Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology*, 149(Pt 8), 2155-2162.
- Felten, J., Kohler, A., Morin, E., Bhalerao, R.P., Palme, K., Martin, F., Ditengou, F.A., and Legué, V. (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root

- formation in poplar and arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiol*, 151(4), 1991-2005.
- Fields, S., Kohara, Y., and Lockhart, D.J. (1999) Functional genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 8825-8826.
- Floor, E., Maples, A.M., Rankin, C.A., Yaganti, V.M., Shank, S.S., Nichols, G.S., O'Laughlin, M., Williams, T.D. (2006) A one-carbon modification of protein lysine associated with elevated oxidative stress in human substantia nigra. *Journal of Neurochemistry* 97 (2), pp. 504-514.
- Flora, S.J., Mittal, M., and Mehta, A. (2008) Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*, 128(4), 501-523.
- Fogarty, R.V., and Tobin, J.M. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol*, 19(4), 311-317.
- Fomina, M., Hillier, S., Charnock, J.M., Melville, K., Alexander, I.J., and Gadd, G.M. (2005) Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 371-381.
- Franklin, R.E., Duis, L., Brown, R., and Kemp, T. (2005) Trace element content of selected fertilizers and micronutrient source materials. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(11-12), 1591-1609.
- Frey, B., Zierold, K., and Brunner, I. (2000) Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies* - *Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. *Plant, Cell and Environment*, 23(11), 1257-1265.
- Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G.W., Coleman, M.L., Schuster, S.C., Chisholm, S.W., and DeLong, E.F. (2008) Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(10), 3805-3810.
- Gadd, G.M. (1990) Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46(8), 834-840.
- Gadd, G.M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124(1), 25-60.
- Gaither, L.A., and Eide, D.J. (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, 14(3-4), 251-270.
- Gaither, L.A., and Eide, D.J. (2001) The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem*, 276(25), 22258-22264.
- Galan, J.M., Wiederkehr, A., Jae Hong, S., Haguenaue-Tsapis, R., Deshaies, R.J., Riezman, H., and Peter, M. (2001) Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol Cell Biol*, 21(9), 3105-3117.
- Gasic, K., and Korban, S.S. (2007) Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta*, 225(5), 1277-1285.
- Gasic, K., and Korban, S.S. (2007) Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an *Arabidopsis* phytochelatin synthase (*AtPCS1*) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Plant Mol Biol*, 64(4), 361-369.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, 20(6), 1425.
- Gilbert, J.A., Field, D., Huang, Y., Edwards, R., Li, W., Gilna, P., and Joint, I. (2008) Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS One*, 3(8), e3042.
- Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10-11), 1389-1414.
- Gonzalez-Guerrero, M., Azcon-Aguilar, C., Mooney, M., Valderas, A., MacDiarmid, C.W., Eide, D.J., and Ferrol, N. (2005) Characterization of a *Glomus intraradices* gene

- encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genet Biol*, 42(2), 130-140.
- Grant, S., Grant, W.D., Cowan, D.A., Jones, B.E., Ma, Y., Ventosa, A., and Heaphy, S. (2006) Identification of eukaryotic open reading frames in metagenomic cDNA libraries made from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 72(1), 135-143.
- Green Iii, F., and Clausen, C.A. (2003) Copper tolerance of brown-rot fungi: Time course of oxalic acid production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(2), 145-149.
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V.R., Brown, P.O., Winge, D.R. (2000) Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry* 275 (41), pp. 32310-32316.
- Grzymski, J.J., Murray, A.E., Campbell, B.J., Kaplarevic, M., Gao, G.R., Lee, C., Daniel, R., Ghadiri, A., Feldman, R.A., and Cary, S.C. (2008) Metagenome analysis of an extreme microbial symbiosis reveals eurythermal adaptation and metabolic flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(45), 17516-17521.
- Gueldry, O., Lazard, M., Delort, F., Dauplais, M., Grigoras, I., Blanquet, S., and Plateau, P. (2003) Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 270(11), 2486-2496.
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1465(1-2), 190-198.
- Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., and Chowdhuri, D.K. (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci*, 86(11-12), 377-384.
- Gurer, H., and Ercal, N. (2000) Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med*, 29(10), 927-945.
- Haferburg, G., and Kothe, E. (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol*, 47(6), 453-467.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot*, 53(366), 1-11.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10), 3859-3864.
- Harrison, C., Katayama, S., Dhut, S., Chen, D., Jones, N., Bähler, J., and Toda, T. (2005) SCF<sup>Pof1</sup>-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast. *EMBO Journal*, 24(3), 599-610.
- Hasan, S.A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., and Ahmad, A. (2009) Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J Environ Biol*, 30(2), 165-174.
- Hatvani, N., and Mecs, I. (2003) Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 55(2), 199-203.
- Hegde, P.S., White, I.R., and Debouck, C. (2003) Interplay of transcriptomics and proteomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 647-651.
- Hermans, D. (2006) F-box proteins: More than baits for the SCF? *Cell Division*, 1.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. In *Annual Review of Biochemistry*, pp 425-479.
- Hieter, P., and Boguski, M. (1997) Functional genomics: It's all how you read it. *Science*, 278(5338), 601-602.
- Hodson, M.E. (2004) Heavy metals--geochemical bogey men? *Environ Pollut*, 129(3), 341-343.

- Högberg, M.N., and Högberg, P. (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist*, 154(3), 791-795.
- Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., and Van Vark, W. (2000) Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(9-10), 1299-1396.
- Huang, J.W., Pellet, D.M., Papernik, L.A., and Kochian, L.V. (1996) Aluminum Interactions with Voltage-Dependent Calcium Transport in Plasma Membrane Vesicles Isolated from Roots of Aluminum-Sensitive and -Resistant Wheat Cultivars. *Plant Physiol*, 110(2), 561-569.
- Hugenholtz, P., and Pace, N.R. (1996) Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol*, 14(6), 190-197.
- Huynen, M.A., Spronk, C.A.E.M., Gabald, T., and Snel, B. (2005) Combining data from genomes, Y2H and 3D structure indicates that BolA is a reductase interacting with a glutaredoxin. *FEBS Lett*, 579(3), 591-596.
- Hwang, G.W., Furuchi, T., and Naganuma, A. (2007) Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates cadmium resistance in budding yeast through ubiquitination of the transcription factor Met4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), 873-878.
- Hwang, G.W., Furuchi, T., and Naganuma, A. (2008) The ubiquitin-conjugating enzymes, Ubc4 and Cdc34, mediate cadmium resistance in budding yeast through different mechanisms. *Life Sci*, 82(23-24), 1182-1185.
- Innes, E.A. (2010) A brief history and overview of toxoplasma gondii. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 1-7.
- Isarankura-Na-Ayudhya, P., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Treeratanapaiboon, L., Kasikun, K., Thipkeaw, K., and Prachayasittikul, V. (2009) Proteomic profiling of Escherichia Coli in response to heavy metals stress. *European Journal of Scientific Research*, 25(4), 679-688.
- Islam, F.S., Gault, A.G., Boothman, C., Polya, D.A., Chamok, J.M., Chatterjee, D., and Lloyd, J.R. (2004) Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature*, 430(6995), 68-71.
- Jacob, C., Courbot, M., Martin, F., Brun, A., and Chalot, M. (2004) Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus Paxillus involutus. *FEBS Lett*, 576(3), 423-427.
- Javelle, A., Chalot, M., Soderstrom, B., and Botton, B. (1999) Ammonium and methylamine transport by the ectomycorrhizal fungus Paxillus involutus and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol Ecol*, 30(4), 355-366.
- Jentschke, G., Winter, S., and Godbold, D.L. (1999) Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. *Tree Physiol*, 19(1), 23-30.
- Jungmann, J., Reins, H.A., Schobert, C., and Jentsch, S. (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature*, 361(6410), 369-371.
- Kalis, E.J., Temminghoff, E.J., Visser, A., and van Riemsdijk, W.H. (2007) Metal uptake by Lolium perenne in contaminated soils using a four-step approach. *Environ Toxicol Chem*, 26(2), 335-345.
- Kamizono, A., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1989) Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Gen Genet*, 219(1-2), 161-167.
- Kane, P.M. (1999) Biosynthesis and regulation of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(1), 49-56.



- Kane, P.M., Tarsio, M., and Jianzhong, L. (1999) Early steps in assembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17275-17283.
- Kapuscinski, J. (1995) DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(5), 220-233.
- Karagiannidis, N., and Nikolaou, N. (2000) Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Pb and Cd) uptake, growth, and chemical composition of *Vitis vinifera* L. (cv. Razaki). *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(3), 269-275.
- Keeling, P.J. (2001) Foraminifera and Cercozoa are related in actin phylogeny: Two orphans find a home? *Molecular Biology and Evolution*, 18(8), 1551-1557.
- Kennelly, M.M., Gadoury, D.M., Wilcox, W.F., Magarey, P.A., and Seem, R.C. (2007) Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, 97(4), 512-522.
- Kimber, M.C., Geue, J.P., Lincoln, S.F., Ward, A.D., and Tiekink, E.R.T. (2003) A preparative and preliminary spectroscopic study of analogues of a Zinquin-related fluorophore. *Australian Journal of Chemistry*, 56(1), 39-44.
- Kinniburgh, D.G., and Kosmus, W. (2002) Arsenic contamination in groundwater: some analytical considerations. *Talanta*, 58(1), 165-180.
- Kinraide, T.B., Parker, D.R., and Zobel, R.W. (2005) Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer. *J Exp Bot*, 56(417), 1853-1865.
- Kiranmayi, P., Tiwari, A., Sagar, K.P., Haritha, A. et Mohan, P.M. (2009) Functional characterization of *tzn1* and *tzn2*-zinc transporter genes in *Neurospora crassa*. *Biometals*, 22 (3), pp. 411-420.
- Klaassen, C.D., Liu, J., and Diwan, B.A. (2009) Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 215-220.
- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Gueriot, M.L., and Pakrasi, H.B. (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol*, 40(1), 37-44.
- Kozdroj, J., Piotrowska-Seget, Z., and Krupa, P. (2007) Mycorrhizal fungi and ectomycorrhiza associated bacteria isolated from an industrial desert soil protect pine seedlings against Cd(II) impact. *Ecotoxicology*, 16(6), 449-456.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567-580.
- Kumanovics, A., Chen, O.S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E.M., Lin, H., Dingra, N.N., Outten, C.E., Keller, G., Winge, D., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2008) Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10276-10286.
- Kumanovics, A., Poruk, K.E., Osborn, K.A., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2006) YKE4 (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 281(32), 22566-22574.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 299-306.
- Labbé, J., Zhang, X., Yin, T., Schmutz, J., Grimwood, J., Martin, F., Tuskan, G.A., and Le Tacon, F. (2008) A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies. *New Phytologist*, 180(2), 316-328.

- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., and van Breemen, N. (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol*, 16(5), 248-254.
- Lanfranco, L., Balsamo, R., Martino, E., Perotto, S., and Bonfante, P. (2002) Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. *Eur J Histochem*, 46(4), 341-350.
- Lehembre, F.(2009) Réponses adaptatives des microorganismes eucaryotes du sol aux pollutions métalliques. Thèse Université Lyon 1.
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., and Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806-809.
- Lejeune, M., Rybicka, J.M., and Chadee, K. (2009) Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiology*, 4(1), 105-116.
- Leonard, S.S., Bower, J.J., and Shi, X. (2004) Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol Cell Biochem*, 255(1-2), 3-10.
- Leonard, S.S., Harris, G.K., and Shi, X. (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 37(12), 1921-1942.
- Lepage, B.A., Currah, R.S., Stockey, R.A., and Rothwell, G.W. (1997) Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. *American Journal of Botany*, 84(3), 410-412.
- Lepper, T.W., Oliveira, E., Koch, G.D., Berlese, D.B., and Feksa, L.R. Lead inhibits in vitro creatine kinase and pyruvate kinase activity in brain cortex of rats. *Toxicol In Vitro*, 24(3), 1045-1051.
- Li, L., and Kaplan, J. (1997) Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *J Biol Chem*, 272(45), 28485-28493.
- Li, L., and Kaplan, J. (1998) Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22181-22187.
- Li, L., and Kaplan, J. (2001) The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem*, 276(7), 5036-5043.
- Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele, D.J., and Rea, P.A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(1), 42-47.
- Lin, C.F., Mount, S.M., Jarmowski, A. and Makaowski, W. (2010) Evolutionary dynamics of U12-type spliceosomal introns. *BMC Evolutionary Biology*, 10:47.
- Lin, S.J., and Culotta, V.C. (1996) Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* *ATX2*, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Mol Cell Biol*, 16(11), 6303-6312.
- Liu, J., Qu, W., and Kadiiska, M.B. (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 209-214.
- Liu, Z.Y., Tian, Y.W., and Chen, G.Z. (2010) Accumulation of heavy metals in rice growing around mining area and its human health risk analysis. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 26(1), 35-40.
- Llamas, A., Ullrich, C.I., and Sanz, A. (2000)  $\text{Cd}^{2+}$  effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L) roots. *Plant and Soil*, 219(1-2), 21-28.

- Loganathan, P., Hedley, M.J., and Grace, N.D. (2008) Pasture soils contaminated with fertilizer-derived cadmium and fluorine: livestock effects. *Rev Environ Contam Toxicol*, 192, 29-66.
- Lopez-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramirez-Rodriguez, V.V., and Herrera-Estrella, L. (2000) Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci*, 160(1), 1-13.
- Lopez-Garcia, P., and Moreira, D. (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Res Microbiol*, 159(1), 67-73.
- Lopez-Millan, A.F., Ellis, D.R., and Grusak, M.A. (2004) Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol*, 54(4), 583-596.
- Louche, J., Ali, M.A., Cloutier-Hurteau, B., Sauvage, F.X., Quiquampoix, H., and Plassard, C. (2010) Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiol Ecol*, 73(2), 323-335.
- Lucic, E., Fourrey, C., Kohler, A., Martin, F., Chalot, M., and Brun-Jacob, A. (2008) A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 180(2), 343-364.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., and Delhaize, E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*, 6(6), 273-278.
- MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., and Eide, D. (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 19(12), 2845-2855.
- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., and Eide, D.J. (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 277(42), 39187-39194.
- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., and Eide, D.J. (2003) Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *J Biol Chem*, 278(17), 15065-15072.
- Magrini, K.D., Basu, A., Spotila, J.R., Avery, H.W., Bergman, L.W., Hammond, R., and Anandan, S. (2008) DNA microarrays detect effects of soil contamination on *Arabidopsis thaliana* gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(12), 2476-2487.
- Mao, X., Kim, B.E., Wang, F., Eide, D.J., and Petris, M.J. (2007) A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. *J Biol Chem*, 282(10), 6992-7000.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E.G.J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H.J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P.E., Coutinho, P.M., Delaruelle, C., Detter, J.C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P.J., Jain, P., Kilaru, S., Labbé, J., Lin, Y.C., Legué, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Secq, M.P.O.L., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kües, U., Lucas, S., Van De Peer, Y., Podila, G.K., Polle, A., Pukkila, P.J., Richardson, P.M., Rouzé, P., Sanders, I.R., Stajich, J.E., Tunlid, A., Tuskan, G., and Grigoriev, I.V. (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452(7183), 88-92.
- Martin, F., Kohler, A., and Duplessis, S. (2007) Living in harmony in the wood underground: ectomycorrhizal genomics. *Curr Opin Plant Biol*, 10(2), 204-210.

- Martino, E., Coisson, J.D., Lacourt, I., Favaron, F., Bonfante, P., and Perotto, S. (2000) Influence of heavy metals on production and activity of pectinolytic enzymes in ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104(7), 825-833.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., and Guerinot, M.L. (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126(4), 1646-1667.
- McKusick, V.A. (1997) Genomics: Structural and functional studies of genomes. *Genomics*, 45(2), 244-249.
- Menzies, N.W., Donn, M.J., and Kopittke, P.M. (2007) Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution*, 145(1), 121-130.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaeys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Van Der Lelie, D., and Wattiez, R. (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: Towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev*, 27(2-3), 385-410.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., and Blaudez, D. (2009) Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water, Air, and Soil Pollution*, 204(1-4), 89-101.
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M.M., Richaud, P., Thomine, S., and Chalot, M. (2010) Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cell Mol Life Sci*, 67(22), 3763-3784.
- Milon, B., Wu, Q., Zou, J., Costello, L.C., and Franklin, R.B. (2006) Histidine residues in the region between transmembrane domains III and IV of hZip1 are required for zinc transport across the plasma membrane in PC-3 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1758(10), 1696-1701.
- Mirete, S., De Figueras, C.G., and González-Pastor, J.E. (2007) Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol*, 73(19), 6001-6011.
- Miyabe, S., Izawa, S., and Inoue, Y. (2001) The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(1), 79-83.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., and Chalot, M. (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, 8, 107.
- Morel, M., Kohler, A., Martin, F., Gelhaye, E., and Rouhier, N. (2008) Comparison of the thiol-dependent antioxidant systems in the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor* and the saprotrophic *Phanerochaete chrysosporium*. *New Phytologist*, 180(2), 391-407.
- Morel, J.L. (1997) Bioavailability of Trace Elements to Terrestrial Plants. Tarradellas J., Bitton D. (Eds). *Soil Ecotoxicology*. CRC. Lewis Publishers, Boca Raton 6. 141-175.
- Morselt, A.F.W., Smits, W.T.M., and Limonard, T. (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 96(3), 417-420.
- Muller, L.A., Vangronsveld, J., and Colpaert, J.V. (2007) Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and nonpolluted habitats. *Mol Ecol*, 16(22), 4728-4737.
- Nagata, T., Tamburini, C., ArÃ-stegui, J., Baltar, F., Bochdansky, A.B., Fonda-Umani, S., Fukuda, H., Gogou, A., Hansell, D.A., Hansman, R.L., Herndl, G.J., Panagiotopoulos, C., Reinthaler, T., Sohrin, R., Verdugo, P., Yamada, N., Yamashita, Y., Yokokawa, T., and Bartlett, D.H. (2010) Emerging concepts on microbial processes in the

- bathypelagic ocean - Ecology, biogeochemistry, and genomics. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(16), 1519-1536.
- Nesbo, C.L., Dlutek, M., Zhaxybayeva, O., and Doolittle, W.F. (2006) Evidence for existence of "mesotogas," members of the order Thermotogales adapted to low-temperature environments. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 5061-5068.
- Nguyen, N.T., Nakabayashi, K., Thompson, J., and Fujita, K. (2003) Role of exudation of organic acids and phosphate in aluminum tolerance of four tropical woody species. *Tree Physiol*, 23(15), 1041-1050.
- Nies, D.H., and Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol*, 14(2), 186-199.
- Nikolaev, S.I., Berney, C., Fahrni, J.F., Bolivar, I., Polet, S., Mylnikov, A.P., Aleshin, V.V., Petrov, N.B., and Pawlowski, J. (2004) The twilight of Heliozoa and rise of Rhizaria, an emerging supergroup of amoeboid eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(21), 8066-8071.
- Novoa, D.M., Palma, S.S., and Gaete, H.O. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus* spp. inoculation on alfalfa growth in soils with copper. Efecto de la inoculacion con hongos micorrizicos arbusculares *Glomus* spp. sobre el crecimiento de alfalfa en suelos con cobre, 70(2), 259-265.
- Ogane, K., Tuji, A., Suzuki, N., Kurihara, T., and Matsuoka, A. (2009) First application of PDMPO to examine silicification in polycystine radiolaria. *Plankton and Benthos Research*, 4(3), 89-94.
- Oliveira, F., Jochim, R.C., Valenzuela, J.G., and Kamhawi, S. (2009) Sand flies, Leishmania, and transcriptome-borne solutions. *Parasitology International*, 58(1), 1-5.
- Oremland, R.S., and Stolz, J.F. (2003) The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621), 939-944.
- Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G., and Ow, D.W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J*, 11(10), 3491-3499.
- Ott, T., Fritz, E., Polle, A., and Schutzendubel, A. (2002) Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium. *FEMS Microbiol Ecol*, 42(3), 359-366.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., and Sannia, G. (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*, 66(3), 920-924.
- Patton, E.E., Willems, A.R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K.L., and Tyers, M. (1998) Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes and Development*, 12(5), 692-705.
- Pawlowski, J., and Burki, F. (2009) Untangling the phylogeny of amoeboid protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(1), 16-25.
- Pawlowski, J., and Holzmann, M. (2002) Molecular phylogeny of Foraminifera - A review. *European Journal of Protistology*, 38(1), 1-10.
- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F.J., Blaudez, D., Chalot, M., and Sanders, D. (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(20), 8532-8537.
- Pellet, D.M., Papernik, L.A., and Kochian, L.V. (1996) Multiple Aluminum-Resistance Mechanisms in Wheat (Roles of Root Apical Phosphate and Malate Exudation). *Plant Physiol*, 112(2), 591-597.
- Pfeiler, E.A., and Klaenhammer, T.R. (2007) The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15(12), 546-553.

- Plum, L.M., Rink, L., and Haase, H. (2010) The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health*, 7(4), 1342-1365.
- Pocsi, I., Prade, R.A., and Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol*, 49, 1-76.
- Poretsky, R.S., Gifford, S., Rinta-Kanto, J., Vila-Costa, M., and Moran, M.A. (2009) Analyzing gene expression from marine microbial communities using environmental transcriptomics. *J Vis Exp*(24).
- Poretsky, R.S., Hewson, I., Sun, S., Allen, A.E., Zehr, J.P., and Moran, M.A. (2009) Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. *Environ Microbiol*, 11(6), 1358-1375.
- Portnoy, M.E., Jensen, L.T., and Culotta, V.C. (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochemical Journal*, 362(1), 119-124.
- Potter, S.Z., and Valentine, J.S. (2003) The perplexing role of copper-zinc superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's disease). *J Biol Inorg Chem*, 8(4), 373-380.
- Punamiya, P., Datta, R., Sarkar, D., Barber, S., Patel, M., and Das, P. (2010) Symbiotic role of *Glomus mosseae* in phytoextraction of lead in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)]. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 465-474.
- Radulescu, C., Stihl, C., Busuioc, G., Gheboianu, A.I., Popescu, I.V. (2010) Studies concerning heavy metals bioaccumulation of wild edible mushrooms from industrial area by using spectrometric techniques. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84 (5), pp. 641-646.
- Ralston, K.S., Kabututu, Z.P., Melehan, J.H., Oberholzer, M., and Hill, K.L. (2009) The *Trypanosoma brucei* flagellum: Moving parasites in new directions. In *Annual Review of Microbiology*, pp 335-362.
- Rappe, M.S., and Giovannoni, S.J. (2003) The Uncultured Microbial Majority. In *Annual Review of Microbiology*, pp 369-394.
- Read, D.J., Duckett, J.G., Francis, R., Ligron, R., and Russell, A. (2000) Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355(1398), 815-830; discussion 830-811.
- Redon, P.O., Béguiristain, T., and Leyval, C. (2008) Influence of *Glomus intraradices* on Cd partitioning in a pot experiment with *Medicago truncatula* in four contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(10), 2710-2712.
- Reich, M., Göbel, C., Kohler, A., Buée, M., Martin, F., Feussner, I., and Polle, A. (2009) Fatty acid metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 182(4), 950-964.
- Reyes-Prieto, A., Weber, A.P.M., and Bhattacharya, D. (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. In *Annual Review of Genetics*, pp 147-168.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman, R.M. (2000) Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 66(6), 2541-2547.
- Rusyniak, D.E., Arroyo, A., Acciani, J., Froberg, B., Kao, L., and Furbee, B. Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. *Exs*, 100, 365-396.
- Saber, N.E., Abdel-Moneim, A.M., and Barakat, S.Y. (1999) Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals. *Biologia Plantarum*, 42(1), 65-73.

- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhachova, K., Forstova, J., and Kopecky, J. (2008) Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl Environ Microbiol*, 74(9), 2902-2907.
- Saiki, R.K., Scharf, S., and Faloona, F. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Puerta, M.V., Lippmeier, J.C., Apt, K.E., and Delwiche, C.F. (2007) Plastid Genes in a Non-Photosynthetic Dinoflagellate. *Protist*, 158(1), 105-117.
- Santos, J.M., Freire, P., Vicente, M., and Arraiano, C.M. (1999) The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Mol Microbiol*, 32(4), 789-798.
- Santos, J.M., Lobo, M., Matos, A.P.A., De Pedro, M.A., and Arraiano, C.M. (2002) The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 45(6), 1729-1740.
- Sanz, A., Llamas, A., and Ullrich, C.I. (2009) Distinctive phytotoxic effects of Cd and Ni on membrane functionality. *Plant Signal Behav*, 4(10), 980-982.
- Selosse, M.A., and Le Tacon, F. (1998) The land flora: A phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution*, 13(1), 15-25.
- Senger, M.R., Rosemberg, D.B., Seibt, K.J., Dias, R.D., Bogo, M.R., and Bonan, C.D. (2010) Influence of mercury chloride on adenosine deaminase activity and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neurotoxicology*, 31(3), 291-296.
- Seol, J.H., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Deshaies, R.J. (2001) Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nature Cell Biology*, 3(4), 384-391.
- Serhal, H., Bernard, D., Khattabi, J.E., Sabine, B.L., and Shahrour, I. (2009) Impact of fertilizer application and urban wastes on the quality of groundwater in the Cambrai Chalk aquifer, Northern France. *Environmental Geology*, 57(7), 1579-1592.
- Sezgin, N., Ozcan, H.K., Demir, G., Nemlioglu, S., and Bayat, C. (2004) Determination of heavy metal concentrations in street dusts in Istanbul E-5 highway. *Environ Int*, 29(7), 979-985.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., and Rufty, T.W. (2001) Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Physiol Plant*, 112(2), 200-210.
- Silver, S., and Phung le, T. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32(11-12), 587-605.
- Silver, S., and Phung, L.T. (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol*, 71(2), 599-608.
- Simon, L., Levesque, R.C., and Lalonde, M. (1993) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 59(12), 4211-4215.
- Singh, A., Sharma, R.K., Agrawal, M., and Marshall, F.M. (2010) Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India. *Food Chem Toxicol*, 48(2), 611-619.
- Sinicropi, M.S., Amantea, D., Caruso, A., and Saturnino, C. (2010) Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Arch Toxicol*, 84(7), 501-520.
- Skaggs, B.A., Alexander, J.F., Pierson, C.A., Schweitzer, K.S., Chun, K.T., Koegel, C., Barbuch, R., and Bard, M. (1996) Cloning and characterization of the *Saccharomyces*

- cerevisiae C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene*, 169(1), 105-109.
- Sneller, F.E., van Heerwaarden, L.M., Koevoets, P.L., Vooijs, R., Schat, H., and Verkleij, J.A. (2000) Derivatization of phytochelatin from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J Agric Food Chem*, 48(9), 4014-4019.
- Stadler, J.A., Schweyen, R.J., 2002, The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance, *Journal of Biological Chemistry* 277 (42), pp. 39649-39654.
- Sterckeman, T., Douay, F., Baize, D., Fourier, H., Proix, N., and Schwartz, C. (2006) Trace elements in soils developed in sedimentary materials from Northern France. *Geoderma*, 136(3-4), 912-929.
- Sterckeman, T., Douay, F., Baize, D., Fourier, H., Proix, N., Schwartz, C., and Carignan, J. (2006) Trace element distributions in soils developed in loess deposits from northern France. *European Journal of Soil Science*, 57(3), 392-410.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Médigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E., Op Den Camp, H.J.M., Van Der Drift, C., Cirpus, I., Van De Pas-Schoonen, K.T., Harhangi, H.R., Van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., Van De Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H.W., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Wagner, M., and Le Paslier, D. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 440(7085), 790-794.
- Tamas, L., Huttova, J., Mistrik, I., Simonovicova, M., and Siroka, B. (2006) Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. *J Plant Physiol*, 163(7), 781-784.
- Tanaka, T., and Watanabe, T. (2003) DNA replication and transcription in new macronuclei of *Paramecium caudatum* exconjugants. *Chromosome Research*, 11(8), 787-795.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Todaka, N., Moriya, S., Saita, K., Hondo, T., Kiuchi, I., Takasu, H., Ohkuma, M., Piero, C., Hayashizaki, Y., and Kudo, T. (2007) Environmental cDNA analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus*. *FEMS Microbiol Ecol*, 59(3), 592-599.
- Toone, W.M., Jones, N. (1999) AP-1 transcription factors in yeast. *Current Opinion in Genetics and Development* 9 (1), pp. 55-61.
- Trotter, E.W., and Grant, C.M. (2002) Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 46(3), 869-878.
- Truan, G., Epinat, J.C., Rougegeulle, C., Cullin, C. and Pompom. (1994) Cloning and characterization of a yeast cytochrome b5-encoding gene which suppresses ketoconazole hypersensitivity in a NADPH-P-450 reductase-deficient strain. *Gene*, 142(1), 123-127.
- Tsuda, T., Yorifuji, T., Takao, S., Miyai, M., and Babazono, A. (2009) Minamata disease: catastrophic poisoning due to a failed public health response. *J Public Health Policy*, 30(1), 54-67.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., and Banfield, J.F. (2004) Community



- structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(6978), 37-43.
- Urich, T., Lanzen, A., Qi, J., Huson, D.H., Schleper, C., and Schuster, S.C. (2008) Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS One*, 3(6), e2527.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M.T.D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A., and Hooykaas, P.J. (1999) Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol*, 119(3), 1047-1055.
- van Hees, P.A., Tipping, E., and Lundstrom, U.S. (2001) Aluminium speciation in forest soil solution--modelling the contribution of low molecular weight organic acids. *Sci Total Environ*, 278(1-3), 215-229.
- Van Ho, A., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2002) Transition metal transport in yeast. In *Annual Review of Microbiology*, pp 237-261.
- Van Tichelen, K.K., Colpaert, J.V., and Vangronsveld, J. (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist*, 150(1), 203-213.
- Vance, C.P. (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiol*, 127(2), 390-397.
- Vangronsveld, J., Colpaert, J.V., and Van Tichelen, K.K. (1996) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: Physico-chemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. *Environmental Pollution*, 94(2), 131-140.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett Jr, D.E., Hieter, P., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, 88(2), 243-251.
- Vicentefranqueira, R., Moreno, M.A., Leal, F., and Calera, J.A. (2005) The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot Cell*, 4(5), 837-848.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., and Labarre, J. (2001) A Proteome Analysis of the Cadmium Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8469-8474.
- Vieira, H.L.A., Freire, P., and Arraiano, C.M. (2004) Effect of *Escherichia coli* morphogene *bolA* on biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 70(9), 5682-5684.
- Villeneuve, N., Le Tacon, F., and Bouchard, D. (1991) Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglasfir seedlings. *Plant and Soil*, 135(1), 95-107.
- Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.E., and Streit, W.R. (2003) Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. *Appl Environ Microbiol*, 69(10), 6235-6242.
- Waldron, P.J., Wu, L., Van Nostrand, J.D., Schadt, C.W., He, Z., Watson, D.B., Jardine, P.M., Palumbo, A.V., Hazen, T.C., and Zhou, J. (2009) Functional gene array-based analysis of microbial community structure in groundwaters with a gradient of contaminant levels. *Environmental Science and Technology*, 43(10), 3529-3534.
- Wang, A., and Crowley, D.E. (2005) Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3259-3266.
- Wang, J., and Chen, C. (2006) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnol Adv*, 24(5), 427-451.

- Wang, S., Deng, K., Zaremba, S., Deng, X., Lin, C., Wang, Q., Tortorello, M.L., and Zhang, W. (2009) Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*, 75(19), 6110-6123.
- Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenaue-Tsapis, R., and Riezman, H. (2000) The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 149(2), 397-410.
- Willems, A.R., Goh, T., Taylor, L., Chernushevich, I., Shevchenko, A., and Tyers, M. (1999) SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1389), 1533-1550.
- Winge, D.R., Jensen, L.T., Srinivasan, C. (1998) Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Current Opinion in Chemical Biology* 2 (2), pp. 216-221.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dréano, S., and Gloux, S. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), 871-880.
- Wu, C.Y., Lu, L.L., Yang, X.E., Feng, Y., Wei, Y.Y., Hao, H.L., Stoffella, P.J., and He, Z.L. Uptake, translocation, and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. *J Agric Food Chem*, 58(11), 6767-6773.
- Yadav, S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167-179.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., and Sasaki, R. (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18914-18918.
- Yao, Q., Zhu, H.H., and Zeng, R.S. (2007) Role of phenolic compounds in plant defence: Induced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Allelopathy Journal*, 20(1), 1-14.
- Yen, J.L., Su, N.Y., and Kaiser, P. (2005) The yeast ubiquitin ligase SCF<sup>Met30</sup> regulates heavy metal response. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 1872-1882.
- Yilmaz, S., and Zengin, M. (2004) Monitoring environmental pollution in Erzurum by chemical analysis of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Environment International*, 29(8), 1041-1047.
- Yun, J., Kang, S., Park, S., Yoon, H., Kim, M.J., Heu, S., and Ryu, S. (2004) Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol*, 70(12), 7229-7235.
- Zarei, M., Hempel, S., Wubet, T., Schafer, T., Savaghebi, G., Jouzani, G.S., Nekouei, M.K., and Buscot, F. (2010) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation

- to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environ Pollut*, 158(8), 2757-2765.
- Zeller, T., and Klug, G. (2006) Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften*, 93(6), 259-266.
- Zhang, X.H., Lin, A.J., Chen, B.D., Wang, Y.S., Smith, S.E., and Smith, F.A. (2006) Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. *Journal of Environmental Sciences*, 18(4), 721-726.
- Zhao, H., and Eide, D. (1996) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6), 2454-2458.
- Zhao, H., and Eide, D. (1996) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271(38), 23203-23210.
- Zhao, H., and Eide, D.J. (1997) Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 17(9), 5044-5052.
- Zhao, H., Butler, E., Rodgers, J., Spizzo, T., Duesterhoeft, S., and Eide, D. (1998) Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem*, 273(44), 28713-28720.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W., and Pavletich, N.P. (2002) Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box<sup>Skp2</sup> SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416(6882), 703-709.
- Zheng, N., Wang, Q., Liang, Z., and Zheng, D. (2008) Characterization of heavy metal concentrations in the sediments of three freshwater rivers in Huludao City, Northeast China. *Environ Pollut*, 154(1), 135-142.
- Zheng, Y.M., Liu, Y.R., Hu, H.Q., and He, J.Z. (2008) Mercury in soils of three agricultural experimental stations with long-term fertilization in China. *Chemosphere*, 72(9), 1274-1278.
- Zhou, J., and Goldsbrough, P.B. (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 6(6), 875-884.
- Zhou, J., and Goldsbrough, P.B. (1995) Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet*, 248(3), 318-328.
- Zhou, J., and Thompson, D.K. (2002) Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 204-207.



**Annexe I :** Protéines utilisées lors de l'analyse phylogénétique de la famille CDF. Les séquences sont issues des sites du JGI (<http://www.jgi.doe.gov/>), du Broad instiute (<http://www.broadinstitute.org/>), de la base de données Candida (<http://www.candidagenome.org/>), de la base de données Fusarium (GenRE) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/fusarium>). Les séquences qui ont été corrigée manuellement sont indiquées par une croix. Cette correction a été réalisée en se basant sur les données de séquençage et l'homologie aux séquences de gènes proches et déjà caractérisés.

| Organisme                        | Groupe     | gène         | protéine ID  | Provenance      | Correction ? |
|----------------------------------|------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | Groupe I   | YMR243c      | ScZRC1       | SGD             |              |
|                                  | Groupe I   | YOR316c      | ScCOT1       | SGD             |              |
|                                  | Groupe I   | YDR205w      | ScMSC2       | SGD             |              |
|                                  | Groupe III | YMR177w      | ScMMT1       | SGD             |              |
|                                  | Groupe III | YPL224c      | ScMMT2       | SGD             |              |
|                                  | Groupe IV  | YNR039c      | ScZRG17      | SGD             |              |
| <i>Candida glabrata</i>          | Groupe I   | CAGL0K07392g | CAGL0K07392g | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe I   | CAGL0F05401g | CAGL0F05401g | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe III | CAGL0H08822g | CAGL0H08822g | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe III | CAGL0E06006g | CAGL0E06006g | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe IV  | CAGL0G07997g | CAGL0G07997g | CandidaDB       |              |
| <i>Candida tropicalis</i>        | Groupe I   | CTRG_01409.3 | CTRG_01409.3 | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe I   | CTRG_01413.3 | CTRG_01413.3 | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe I   | CTRG_03775.3 | CTRG_03775.3 | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe II  | CTRG_00631.3 | CTRG_00631.3 | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe III | CTRG_04499.3 | CTRG_04499.3 | CandidaDB       |              |
|                                  | Groupe IV  | CTRG_02211.3 | CTRG_02211.3 | CandidaDB       |              |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | Groupe I   | SPAC23C11_14 | SPAC23C11_14 | Sanger          |              |
|                                  | Groupe I   | SPAC17D4_03c | SPAC17D4_03c | Sanger          |              |
|                                  | Groupe III | SPCC1020_03  | SPCC1020_03  | Sanger          |              |
|                                  | Groupe IV  | SPBC16E9_14c | SPBC16E9_14c | Sanger          |              |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>     | Groupe I   | Afu2g14570   | Afu2g14570   | Sanger          |              |
|                                  | Groupe I   | Afu7g06570   | Afu7g06570   | Sanger          |              |
|                                  | Groupe I   | Afu4g04150   | Afu4g04150   | Sanger          |              |
|                                  | Groupe I   | Afu6g14170   | Afu6g14170   | Sanger          |              |
|                                  | Groupe II  | Afu1g14440   | Afu1g14440   | Sanger          |              |
|                                  | Groupe II  | Afu6g00440   | Afu6g00440   | Sanger          |              |
|                                  | Groupe III | Afu5g09830   | Afu5g09830   | Sanger          |              |
|                                  | Groupe IV  | Afu1g12090   | Afu1g12090   | Sanger          |              |
| <i>Coccidioides immitis</i>      | Groupe I   | CIMG_07581.3 | CIMG_07581.3 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe I   | CIMG_02809.3 | CIMG_02809.3 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe I   | CIMG_02875.3 | CIMG_02875.3 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe II  | CIMG_03183.3 | CIMG_03183.3 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe II  | CIMG_09079.3 | CIMG_09079.3 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe III | CIMG_04716.3 | CIMG_04716.3 | Broad Institute |              |
| <i>Botrytis cinerea</i>          | Groupe I   | BC1G_15674.1 | BC1G_15674.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe I   | BC1G_12606.1 | BC1G_12606.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe I   | BC1G_14239.1 | BC1G_14239.1 | Broad Institute | x            |
|                                  | Groupe II  | BC1G_13811.1 | BC1G_13811.1 | Broad Institute | x            |
|                                  | Groupe II  | BC1G_00092.1 | BC1G_00092.1 | Broad Institute | x            |
|                                  | Groupe II  | BC1G_05581.1 | BC1G_05581.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe III | BC1G_04719.1 | BC1G_04719.1 | Broad Institute | x            |
|                                  | Groupe IV  | BC1G_15719.1 | BC1G_15719.1 | Broad Institute |              |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>  | Groupe I   | SS1G_06298.1 | SS1G_06298.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe I   | SS1G_02998.1 | SS1G_02998.1 | Broad Institute | x            |
|                                  | Groupe II  | SS1G_04677.1 | SS1G_04677.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe II  | SS1G_01533.1 | SS1G_01533.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe II  | SS1G_01056.1 | SS1G_01056.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe III | SS1G_07340.1 | SS1G_07340.1 | Broad Institute |              |
|                                  | Groupe IV  | SS1G_11558.1 | SS1G_11558.1 | Broad Institute |              |
| <i>Fusarium graminearum</i>      | Groupe I   | FGSG_00947.3 | FGSG_00947.3 | GenRE           |              |
|                                  | Groupe I   | FGSG_09759.3 | FGSG_09759.3 | GenRE           |              |
|                                  | Groupe I   | FGSG_09632.3 | FGSG_09632.3 | GenRE           |              |
|                                  | Groupe II  | FGSG_01162.3 | FGSG_01162.3 | GenRE           |              |
|                                  | Groupe II  | FGSG_05723.3 | FGSG_05723.3 | GenRE           |              |
|                                  | Groupe II  | FGSG_01883.3 | FGSG_01883.3 | GenRE           |              |
|                                  | Groupe III | FGSG_05506.3 | FGSG_05506.3 | GenRE           |              |
|                                  | Groupe IV  | FGSG_07454.3 | FGSG_07454.3 | GenRE           |              |

| Organisme                         | Groupe     | gène                              | protéine ID   | Provenance      | Correction ? |
|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|--------------|
| <i>Magnaporthe grisea</i>         | Groupe I   | MGG_03634.6                       | MGG_03634.6   | Broad Institute | x            |
|                                   | Groupe I   | MGG_04161.6                       | MGG_04161.6   | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe I   | MGG_10493.6                       | MGG_10493.6   | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | MGG_04407.6                       | MGG_04407.6   | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | MGG_04623.6                       | MGG_04623.6   | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | MGG_04968.6                       | MGG_04968.6   | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | MGG_07494.6                       | MGG_07494.6   | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe III | MGG_06247.6                       | MGG_06247.6   | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe IV  | MGG_11903.6                       | MGG_11903.6   | Broad Institute |              |
| <i>Neurospora crassa</i>          | Groupe I   | NCU03145.3                        | NCU03145.3    | Broad Institute | x            |
|                                   | Groupe I   | NCU07262.3                        | NCU07262.3    | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | NCU09368.3                        | NCU09368.3    | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | NCU05157.3                        | NCU05157.3    | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | NCU04818.3                        | NCU04818.3    | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | NCU06699.3                        | NCU06699.3    | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe III | NCU07879.3                        | NCU07879.3    | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe IV  | NCU01254.3                        | NCU01254.3    | Broad Institute |              |
| <i>Cryphonectria parasitica</i>   | Groupe I   | estExt_Genewise1Plus.C_41638      | Crypa1 91567  | JGI             | x            |
|                                   | Groupe I   | estExt_Genewise1Plus.C_32500      | Crypa1 90619  | JGI             |              |
|                                   | Groupe I   | estExt_Genewise1Plus.C_30461      | Crypa1 89586  | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | estExt_fgenes1_kg.C_10595         | Crypa1 100964 | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | estExt_Genewise1Plus.C_60353      | Crypa1 92682  | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | e_gw1.3.1680.1                    | Crypa1 40714  | JGI             |              |
|                                   | Groupe III | fgenes1_pm.C_scaffold_1000525     | Crypa1 59288  | JGI             |              |
|                                   | Groupe IV  | e_gw1.1.2642.1                    | Crypa1 33167  | JGI             |              |
| <i>Verticillium dahliae</i>       | Groupe I   | VDAG_02402.1                      | VDAG_02402.1  | Broad Institute | x            |
|                                   | Groupe I   | VDAG_01059.1                      | VDAG_01059.1  | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe I   | VDAG_00609.1                      | VDAG_00609.1  | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | VDAG_08801.1                      | VDAG_08801.1  | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | VDAG_03403.1                      | VDAG_03403.1  | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe II  | VDAG_01593.1                      | VDAG_01593.1  | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe III | VDAG_05814.1                      | VDAG_05814.1  | Broad Institute |              |
|                                   | Groupe IV  | VDAG_08317.1                      | VDAG_08317.1  | Broad Institute |              |
| <i>Stagonospora nodorum</i>       | Groupe I   | SNOG_04675.1                      | SNOG_04675.1  | JGI             | x            |
|                                   | Groupe I   | SNOG_02584.1                      | SNOG_02584.1  | JGI             |              |
|                                   | Groupe I   | SNOG_09657.1                      | SNOG_09657.1  | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | SNOG_09445.1                      | SNOG_09445.1  | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | SNOG_09283.1                      | SNOG_09283.1  | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | SNOG_01554.1                      | SNOG_01554.1  | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | SNOG_02386.1                      | SNOG_02386.1  | JGI             |              |
|                                   | Groupe III | SNOG_00278.1                      | SNOG_00278.1  | JGI             |              |
|                                   | Groupe IV  | SNOG_08002.1                      | SNOG_08002.1  | JGI             |              |
| <i>Mycosphaerella graminicola</i> | Groupe I   | estExt_Genewise1Plus.C_chr_51597  | 72682         | JGI             | x            |
|                                   | Groupe I   | gw1.6.228.1                       | 12884         | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | estExt_Genewise1Plus.C_chr_21662  | 68771         | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | estExt_Genewise1Plus.C_chr_100264 | 76143         | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | e_gw1.8.222.1                     | 46865         | JGI             |              |
|                                   | Groupe III | estExt_Genewise1Plus.C_chr_40991  | 71244         | JGI             |              |
| <i>Ustilago maydis</i>            | Groupe IV  | e_gw1.3.1505.1                    | 38036         | JGI             | x            |
| <i>Ustilago maydis</i>            | Groupe I   | UM02906.1                         | UM02906.1     | JGI             |              |
|                                   | Groupe I   | UM06139.1                         | UM06139.1     | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | UM03814.1                         | UM03814.1     | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | UM05647.1                         | UM05647.1     | JGI             |              |
|                                   | Groupe III | UM00151.1                         | UM00151.1     | JGI             |              |
|                                   | Groupe IV  | UM06018.1                         | UM06018.1     | JGI             |              |
| <i>Coprinus cinereus</i>          | Groupe I   | CC1G_00879.2                      | CC1G_00879.2  | JGI             |              |
|                                   | Groupe I   | CC1G_06768.2                      | CC1G_06768.2  | JGI             |              |
|                                   | Groupe I   | CC1G_14848.2                      | CC1G_14848.2  | JGI             |              |
|                                   | Groupe II  | CC1G_00523.2                      | CC1G_00523.2  | JGI             |              |
|                                   | Groupe III | CC1G_06839.2                      | CC1G_06839.2  | JGI             |              |
|                                   | Groupe IV  | CC1G_07549.2                      | CC1G_07549.2  | JGI             |              |

| Organisme                             | Groupe     | gène                              | protéine ID   | Provenance      | Correction ? |
|---------------------------------------|------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|--------------|
| <i>Laccaria bicolor</i>               | Groupe I   | eu2.Lbscf0038g00260               | Lacbi1 307944 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe I   | gww1.1.385.1                      | Lacbi1 144453 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe I   | eu2.Lbscf0002g03750               | Lacbi1 305317 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe I   | estExt_GeneWisePlus_worm.C_220012 | Lacbi1 191080 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | e_gww1.75.46.1                    | Lacbi1 256277 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | e_gww1.9.136.1                    | Lacbi1 248983 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | e_gww1.1.466.1                    | Lacbi1 242531 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | e_gww1.2.941.1                    | Lacbi1 244654 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe III | e_gwh1.10.327.1                   | Lacbi1 234505 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe IV  | eu2.Lbscf0010g03890               | Lacbi1 296580 | JGI             |              |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i>    | Groupe I   | e_gww2.11.228.1                   | Phchr1 134940 | JGI             |              |
|                                       | Groupe I   | e_gwh2.12.153.1                   | Phchr1 124205 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | e_gww2.13.213.1                   | Phchr1 135578 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe III | e_gww2.15.88.1                    | Phchr1 140863 | JGI             |              |
|                                       | Groupe IV  | fgenes1_pg.C_scaffold_5000376     | Phphr1 3814   | JGI             | x            |
| <i>Postia placenta</i>                | Groupe I   | estExt_fgenes3_pg.C_560081        | Pospl1 127347 | JGI             |              |
|                                       | Groupe I   | estExt_Genewise1.C_1110007        | Pospl1 122470 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe I   | estExt_fgenes3_pg.C_40034         | Pospl1 129662 | JGI             |              |
|                                       | Groupe II  | fgenes3_pg.8__68                  | Pospl1 91066  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | fgenes3_pg.302__9                 | Pospl1 97678  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe III | estExt_fgenes3_pg.C_1950012       | Pospl1 130013 | JGI             |              |
|                                       | Groupe III | e_gw1.195.7.1                     | Pospl1 62037  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe IV  | estExt_fgenes3_pg.C_760036        | Pospl1 126828 | JGI             |              |
| <i>Heterobasidion annosum</i>         | Groupe I   | estExt_Genewise1Plus.C_11375      | Hetan1 59331  | JGI             |              |
|                                       | Groupe I   | fgenes2_pm.C_scaffold_6000198     | Hetan1 124689 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | fgenes2_pm.C_scaffold_1000163     | Hetan1 121342 | JGI             | x            |
|                                       | Groupe III | fgenes2_pm.C_scaffold_3000183     | Hetan1 122980 | JGI             |              |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>        | Groupe I   | CNAG_02806.2                      | CNAG_02806.2  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe I   | CNAG_05394.2                      | CNAG_05394.2  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe II  | CNAG_06317.2                      | CNAG_06317.2  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe II  | CNAG_04338.2                      | CNAG_04338.2  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe II  | CNAG_04337.2                      | CNAG_04337.2  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe III | CNAG_00727.2                      | CNAG_00727.2  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe IV  | CNAG_00837.2                      | CNAG_00837.2  | Broad Institute |              |
| <i>Puccinia graminis</i>              | Groupe I   | PGTG_14264.2                      | PGTG_14264.2  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | PGTG_19278.2                      | PGTG_19278.2  | JGI             |              |
|                                       | Groupe II  | PGTG_06375.2                      | PGTG_06375.2  | JGI             |              |
|                                       | Groupe II  | PGTG_19987.2                      | PGTG_19987.2  | JGI             |              |
|                                       | Groupe III | PGTG_08410.2                      | PGTG_08410.2  | JGI             |              |
|                                       | Groupe IV  | PGTG_17584.2                      | PGTG_17584.2  | JGI             |              |
| <i>Sporobolomyces roseus</i>          | Groupe I   | e_gw1.2.471.1                     | Sporo1 10312  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe I   | estExt_Genewise1.C_50673          | Sporo1 18486  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | fgenes1_pg.C_scaffold_7000329     | Sporo1 28424  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe II  | e_gw1.1.636.1                     | Sporo1 8916   | JGI             |              |
|                                       | Groupe III | fgenes1_pg.C_scaffold_5000527     | Sporo1 27638  | JGI             | x            |
|                                       | Groupe IV  | fgenes1_pg.C_scaffold_4000396     | Sporo1 26917  | JGI             |              |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                | Groupe I   | RO3G_09126.3                      | RO3G_09126.3  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe I   | RO3G_14431.3                      | RO3G_14431.3  | Broad Institute | x            |
|                                       | Groupe I   | RO3G_08509.3                      | RO3G_08509.3  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe I   | RO3G_11795.3                      | RO3G_11795.3  | Broad Institute | x            |
|                                       | Groupe I   | RO3G_02565.3                      | RO3G_02565.3  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe II  | RO3G_02153.3                      | RO3G_02153.3  | Broad Institute | x            |
|                                       | Groupe II  | RO3G_02629.3                      | RO3G_02629.3  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe III | RO3G_09636.3                      | RO3G_09636.3  | Broad Institute |              |
|                                       | Groupe IV  | RO3G_14888.3                      | RO3G_14888.3  | Broad Institute |              |
| <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> | Groupe I   | e_gw1.3.220.1                     | Batde5 9908   | JGI             |              |
|                                       | Groupe I   | gw1.1.945.1                       | Batde5 4771   | JGI             |              |
|                                       | Groupe II  | e_gw1.1.600.1                     | Batde5 8761   | JGI             | x            |

**Annexe II :** Protéines utilisées lors de l'analyse phylogénétique de la famille ZIP. Les séquences sont issues des sites du JGI (<http://www.jgi.doe.gov/>), du Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/>), de la base de données Candida (<http://www.candidagenome.org/>), de la base de données Fusarium (GenRE) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/fusarium>).

| Organisme                       | Groupe     | gène         | protéine ID | provenance      |
|---------------------------------|------------|--------------|-------------|-----------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Groupe I   | YGL255W      | ScZRT1      | SGD             |
|                                 | Groupe I   | YLR130C      | ScZRT2      | SGD             |
|                                 | Groupe III | YKL175W      | ScZRT3      | SGD             |
|                                 | Groupe II  | YOR079C      | ScATX2      | SGD             |
|                                 | Groupe II  | YIL023C      | ScYKE4      | SGD             |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>    | Groupe I   | Afu1g01550   | Afu-A       | Sanger          |
|                                 | Groupe I   | Afu2g03860   | Afu-B       | Sanger          |
|                                 | Groupe I   | Afu6g00470   | Afu-C       | Sanger          |
|                                 | Groupe I   | Afu4g09560   | Afu-D       | Sanger          |
|                                 | Groupe II  | Afu2g01460   | Afu-E       | Sanger          |
|                                 | Groupe II  | Afu8g04010   | Afu-F       | Sanger          |
|                                 | Groupe III | Afu2g08740   | Afu-G       | Sanger          |
|                                 | Groupe II  | Afu2g12050   | Afu-H       | Sanger          |
| <i>Aspergillus nidulans</i>     | Groupe I   | AN1833.2     | An-A        | Sanger          |
|                                 | Groupe I   | AN1410.2     | An-B        | Sanger          |
|                                 | Groupe I   | AN3772.2     | An-C        | Sanger          |
|                                 | Groupe II  | AN3799.2     | An-D        | Sanger          |
|                                 | Groupe III | AN6122.2     | An-E        | Sanger          |
|                                 | Groupe II  | AN6216.2     | An-F        | Sanger          |
|                                 | Groupe II  | AN7673.2     | An-G        | Sanger          |
|                                 | Groupe I   | AN8337.2     | An-H        | Sanger          |
| <i>Botrytis cinerea</i>         | Groupe I   | BC1G_09440.1 | Bc-A        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | BC1G_01610.1 | Bc-B        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | BC1G_08887.1 | Bc-C        | Broad Institute |
|                                 | Groupe II  | BC1G_16199.1 | Bc-D        | Broad Institute |
|                                 | Groupe II  | BC1G_16199.1 | Bc-E        | Broad Institute |
|                                 | Groupe III | BC1G_10415.1 | Bc-F        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | BC1G_02167.1 | Bc-G        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | BC1G_10118.1 | Bc-H        | Broad Institute |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | Groupe II  | SS1G_13762.1 | Ss-A        | Broad Institute |
|                                 | Groupe III | SS1G_13572.1 | Ss-B        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | SS1G_08529.1 | Ss-C        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | SS1G_05825.1 | Ss-D        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | SS1G_00860.1 | Ss-E        | Broad Institute |
|                                 | Groupe II  | SS1G_09628.1 | Ss-F        | Broad Institute |
|                                 | Groupe I   | SS1G_05582.1 | Ss-G        | Broad Institute |
| <i>Fusarium graminearum</i>     | Groupe I   | FG02248.1    | Fg-A        | GenRE           |
|                                 | Groupe I   | FG02589.1    | Fg-B        | GenRE           |
|                                 | Groupe I   | FG00768.1    | Fg-C        | GenRE           |
|                                 | Groupe I   | FG06331.1    | Fg-D        | GenRE           |
|                                 | Groupe I   | FG03987.1    | Fg-E        | GenRE           |
|                                 | Groupe I   | FG05293.1    | Fg-F        | GenRE           |
|                                 | Groupe II  | FG05456.1    | Fg-G        | GenRE           |
|                                 | Groupe III | FG06685.1    | Fg-H        | GenRE           |
|                                 | Groupe I   | FG09303.1    | Fg-I        | GenRE           |



| Organisme                          | Groupe     | gène            | protéine ID | provenance      |
|------------------------------------|------------|-----------------|-------------|-----------------|
| <i>Magnaporthe grisea</i>          | Groupe I   | MG01862.4       | Mg-A        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | MG04967.4       | Mg-B        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | MG06374.4       | Mg-C        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | MG05056.4       | Mg-D        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | MG05905.4       | Mg-E        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | MG06060.4       | Mg-F        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | MG10867.4       | Mg-G        | Broad Institute |
| <i>Neurospora crassa</i>           | Groupe I   | NCU04819.2      | Nc-A        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | NCU04818.2      | Nc-B        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | NCU07621.2      | Nc-C        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | NCU07651.2      | Nc-D        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | NCU09655.2      | Nc-E        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | NCU02879.2      | Nc-F        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | NCU06473.2      | Nc-G        | Broad Institute |
| <i>Stagonospora nodorum</i>        | Groupe I   | SNU13740.1      | Sn-A        | JGI             |
|                                    | Groupe III | SNU13864.1      | Sn-B        | JGI             |
|                                    | Groupe II  | SNU10808.1      | Sn-C        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | SNU00841.1      | Sn-D        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | SNU00809.1      | Sn-E        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | SNU01555.1      | Sn-F        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | SNU04766.1      | Sn-G        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | SNU02995.1      | Sn-H        | JGI             |
| <i>Ustilago maydis</i>             | Groupe I   | UM00096.1       | Um-A        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | UM03110.1       | Um-B        | JGI             |
|                                    | Groupe II  | UM04096.1       | Um-C        | JGI             |
| <i>Coprinus cinereus</i>           | Groupe II  | CC1G_11161T0    | CC-A        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | CC1G_08989T0    | CC-B        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | CC1G_15793T0    | CC-C        | JGI             |
| <i>Laccaria bicolor</i>            | Groupe I   | LacBi1 : 180140 | LbZipA      | JGI             |
|                                    | Groupe I   | Lacbi1 : 305445 | LbZipB      | JGI             |
|                                    | Groupe I   | LacBi1 : 309863 | LbZipC      | JGI             |
|                                    | Groupe II  | LacBi1 : 189929 | LbZipD      | JGI             |
|                                    | Groupe II  | LacBi1 : 309134 | LbZipE      | JGI             |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Groupe I   | gwh2.3.392.1    | Pc-A        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | Phchr1:129030   | Pc-B        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | Phchr1:127853   | Pc-C        | JGI             |
|                                    | Groupe I   | Phchr1:6051     | Pc-D        | JGI             |
|                                    | Groupe II  | Phchr1:5191     | Pc-E        | JGI             |
|                                    | Groupe II  | Phchr1:140218   | Pc-F        | JGI             |
| <i>Rhizopus oryzae</i>             | Groupe I   | RO3G_09126.3    | Ro-A        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | RO3G_14431.3    | Ro-B        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | RO3G_08509.3    | Ro-C        | Broad Institute |
|                                    | Groupe III | RO3G_11795.3    | Ro-D        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | RO3G_02565.3    | Ro-E        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | RO3G_02153.3    | Ro-F        | Broad Institute |
|                                    | Groupe II  | RO3G_02629.3    | Ro-G        | Broad Institute |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>     | Groupe I   | CNAG_02993T0    | Cn-A        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | CNAG_03398T0    | Cn-B        | Broad Institute |
|                                    | Groupe I   | CNAG_00895T0    | Cn-C        | Broad Institute |



## Résumé

La pollution par les métaux lourds entraîne des conséquences néfastes pour les sols et pour les communautés qui les colonisent. Afin d'étudier la diversité des mécanismes moléculaires mis en jeu par ces organismes en réponse au stress métallique, deux approches différentes ont été menées.

Premièrement, une approche ciblée de caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans l'homéostasie et la tolérance au zinc a été menée chez *Laccaria bicolor*, un champignon ectomycorhizien modèle à forte valeur économique ajoutée. L'homéostasie et la tolérance au zinc sont essentiellement liées à l'activité des transporteurs des familles ZIP (Zrt-, Irt- related Protein) et CDF (Cation Diffusion Facilitator). Une étude phylogénétique a permis de mettre en évidence une expansion du nombre de gènes appartenant à ces deux familles dans le génome de *L. bicolor*, comparé à celui de *S. cerevisiae*. Le niveau d'expression de ces différents gènes a ensuite été étudié dans différents tissus fongiques ou en présence de différentes concentrations en zinc. L'étude s'est poursuivie par la caractérisation fonctionnelle et la localisation subcellulaire de plusieurs membres CDF et ZIP. L'ensemble de ces analyses ont permis d'affiner fortement les connaissances dans le domaine de l'homéostasie et de la tolérance au zinc chez les champignons ectomycorhiziens.

Enfin, une approche expérimentale innovante de métatranscriptomique a également été utilisée. Cette étude du métatranscriptome a permis la comparaison de fonctions exprimées au sein de communautés de microorganismes eucaryotes colonisant des sols d'intérêt (contaminé, anciennement contaminé et non contaminé par des métaux lourds). Des banques environnementales d'ADNc construites à partir des ARN messagers extraits directement de ces sols ont été criblées par complémentation fonctionnelle de mutants de levures sensibles au zinc. Cette étude a permis l'identification de nouveaux gènes et de nouveaux mécanismes impliqués dans la résistance au zinc. La mise au point de cette approche ouvre de nouvelles perspectives intéressantes au niveau de la recherche fondamentale mais aussi de la recherche appliquée en permettant la détection de gènes d'intérêt, que l'organisme soit cultivable ou non.

**Mots-clés :** diversité moléculaire, métatranscriptome, métaux lourds, homéostasie, *Laccaria bicolor*, tolérance au zinc.

## Abstract

Heavy metal pollution leads to harmful impacts on lands and their associated communities. In order to study the diversity of the molecular determinants involved in metal tolerance by these organisms, two different strategies were employed.

First, the mechanisms involved in zinc homeostasis and tolerance were studied by functional characterization of selected genes in *Laccaria bicolor*, an ectomycorrhizal model fungus with high economic value. Zinc homeostasis and tolerance mechanisms are mainly achieved through the intracellular traffic of zinc mediated by transporters belonging to the ZIP (Zrt-, Irt- related Protein) and CDF (Cation Diffusion Facilitator) families. Phylogenetic analyses revealed an expansion of both CDF and ZIP gene numbers in the genome of *L. bicolor*, when compared to that of *S. cerevisiae*. Gene expression was also studied in different fungal tissues or under different zinc concentrations in the culture medium. Moreover, the functional characterization of several CDF and ZIP members was performed, as well as their subcellular localization. These data allowed us to refine the knowledge on the molecular mechanisms involved in both zinc homeostasis and tolerance in ectomycorrhizal fungi.

Finally, an innovative experimental approach of metatranscriptomics was used. The study of the soil metatranscriptome from eukaryotes allows the comparison of functions expressed in eukaryotic communities colonizing different types of soil (contaminated, formerly contaminated, or non-contaminated by heavy metals). Environmental cDNA libraries constructed from mRNA extracted directly from these soils were screened by functional complementation of yeast mutants sensitive to zinc. This study allowed the identification of new genes and new mechanisms involved in zinc resistance. The development of this approach opens new insights into both fundamental and applied research for the detection of genes of interest, whatever the organism is cultivable or not.

**Keywords:** molecular diversity, metatranscriptome, heavy metal, homeostasis, *Laccaria bicolor*, zinc tolerance.