

Localisation et visualisation de transcrits fongiques *in situ*

Une méthode originale qui combine biologie moléculaire et microscopie confocale

¹Christine Arnould, Marie Tollot, Pascale Seddas, Vivienne Gianinazzi-Pearson

Résumé : *Les GlomérOMycètes, formant la symbiose mycorhizienne à arbuscules, sont des champignons biotrophes obligatoires qui sont intimement associés aux tissus végétaux qu'ils colonisent. Les techniques utilisées pour suivre l'expression des gènes fongiques dans les racines mycorhizées ne permettent pas de définir le profil spatio-temporel de leur activité. Afin de tracer l'activité transcriptionnelle fongique dans les racines mycorhizées, une méthode innovante, basée sur la RT-PCR in situ, a donc été développée. Cette technique permet de localiser, en microscopie optique confocale à balayage laser, des transcrits fongiques, à l'aide d'amorces spécifiques marquées par un fluorochrome. Du fait de leur importance biologique et de la facilité de leur détection, nous avons choisi les gènes ribosomiaux du champignon Glomus intraradices pour mettre au point la méthode dans son intégralité. Nous avons ensuite étendu avec succès cette méthode à d'autres gènes fongiques incluant certains gènes dont le niveau d'expression est faible. Cette technique ouvre la possibilité de mieux comprendre les interactions existant entre les champignons, symbiotiques ou pathogènes, et leurs partenaires végétaux.*

Mots clés : RT-PCR *in situ*, microscopie optique confocale, expression de gène, champignon, mycorhize

Introduction

Les GlomérOMycètes sont des champignons symbiotiques qui s'associent aux racines d'environ 80 % des plantes terrestres pour former des structures particulières appelées mycorhizes à arbuscules. Cette association assure aux plantes un apport d'éléments nutritifs par le champignon tels que le phosphore (P), l'azote (N), l'eau et les oligo éléments, mais aussi une croissance améliorée et une bioprotection des racines vis-à-vis des agents pathogènes (Smith et Gianinazzi-Pearson, 1988).

Les GlomérOMycètes étant des symbiotes obligatoires, c'est-à-dire non cultivables sans une plante, actuellement, il n'existe pas de système de transformation stable pour ces champignons. Ceci explique que les gènes fongiques, impliqués dans les mécanismes moléculaires de la mise en place puis du fonctionnement de la symbiose, sont encore mal connus. Leur étude au niveau moléculaire et cellulaire reste donc un défi.

Si les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que la RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) en gel ou quantitative (qPCR), ou les analyses *in silico* (comparaison de séquences) offrent la possibilité de mettre en évidence des gènes impliqués dans la symbiose, elles s'adressent majoritairement aux gènes de plantes. Elles ne renseignent donc pas sur la localisation tissulaire ou cellulaire des transcrits fongiques.

¹ INRA- UMR Plante Microbe Environnement, F-20065 Dijon cedex
☎ 03 80 69 35 57 ✉ christine.arnould@dijon.inra.fr

Tous ces éléments ont conduit notre équipe de cytologie moléculaire de l'unité Plante, Microbe, Environnement du centre Inra de Dijon, à mettre au point une méthode originale, rapide et précise, afin de relier l'expression des gènes fongiques aux structures formées par les Glomérormycètes lors du développement de la symbiose mycorhizienne.

Pour cela, nous avons combiné les techniques de biologie moléculaire avec l'utilisation de la microscopie confocale pour visualiser et localiser de façon précise l'expression des gènes étudiés. Cette méthodologie innovante présente deux avantages majeurs : le premier est de visualiser des transcrits fongiques *in situ*, en microscopie confocale, grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques d'un gène d'intérêt, marquées par un fluorochrome ; le deuxième est de pouvoir analyser l'expression de gènes fongiques à différents stades de la symbiose (Seddas *et al.*, 2008). En effet, la microscopie confocale donne accès à des informations émanant de différents tissus en profondeur dans l'échantillon et, grâce au Contraste Interférentiel Différentiel, permet de préciser la localisation cellulaire du fluorochrome.

Dans un premier temps, nous avons mis au point les modalités techniques de la méthode en étudiant la localisation des transcrits de la grande sous unité ribosomique (GSU 28S), abondamment présents dans les cellules. Puis, nous nous sommes focalisés sur l'expression de quatre gènes codant pour différentes protéines fongiques : PEPISOM (peptidyl propyl isomérase) intervenant dans le métabolisme des protéines ; DESAT (stéaroyl CoA désaturase) impliquée dans le métabolisme des lipides ; SOD (Cu/Zn superoxyde dismutase) associée aux réactions au stress ; et STE12, facteur de transcription. Les transcrits ont été étudiés dans les différentes étapes du cycle biologique du *Glomus intraradices*, à partir des spores jusqu'à la colonisation des racines de *Medicago truncatula*. La technique de RT-PCR *in situ* que nous avons développée est décrite en détail par Seddas *et al.*, (2008, 2010). Les résultats présentés dans cet article concernent les gènes *DESAT* et *STE12* de *G. intraradices*.

1. Matériels biologiques

1.1 *Medicago truncatula* Gaertn (figure 1) est une plante modèle choisie pour étudier les interactions entre plantes et micro-organismes. Son génome de 450Mb est largement séquencé. C'est une légumineuse qui forme des associations symbiotiques aussi bien avec des bactéries du sol (rhizobia), en formant des nodules racinaires, qu'avec des champignons symbiotiques pour établir la mycorhize à arbuscules.

Les graines (fournies par G. Duc, Inra-Dijon) sont mises à germer puis cultivées en présence ou non du champignon *G. intraradices* dans les conditions décrites par Weidmann *et al.* (2004). Les plantes sont prélevées après trois semaines de culture et les racines lavées à l'eau osmosée à 4°C.



Figure 1 : *Medicago truncatula*

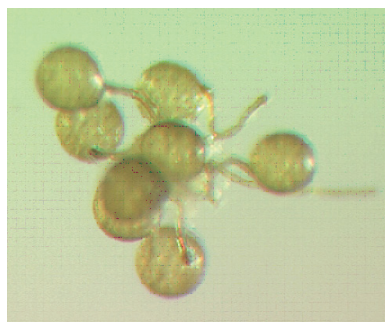


Figure 2 : *Glomus intraradices*

1.2 *Glomus intraradices* est un champignon symbiotique qui appartient à la famille des Glomérormycètes. Dans le sol et les racines, il forme des spores d'un diamètre de 80-100µm (**figure 2**). Sous influence des racines, il développe différentes structures qui interviennent dans la mise en place de la symbiose : hyphe de germination, appressoria, hyphes intercellulaires, vésicules et arbuscules (**figure 3**). Le génome de *G. intraradices* DAOM 197198 (Premier Tech Ltd, Canada) est en cours de séquençage. Les spores de *G. intraradices* sont mises à germer selon la méthode de Seddas *et al.* (2009). Les spores sont prélevées au bout de 7 jours de germination

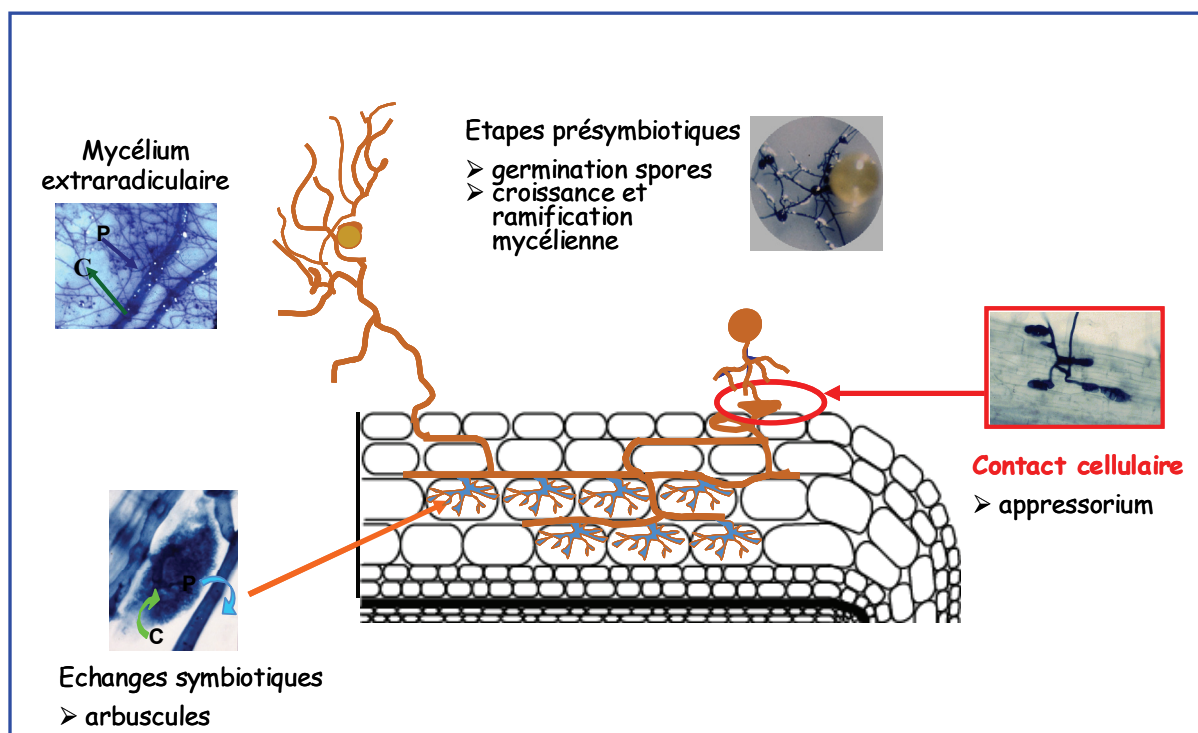


Figure 3 : Cycle biologique d'un champignon mycorrhizogène à arbuscules (d'après V. Gianinazzi-Pearson)

2. Choix des gènes fongiques et d'amorces pour PCR

Les gènes ribosomaux de la grande sous-unité ont été choisis pour la mise au point de la méthode du fait de l'abondance de leur transcrits au niveau cellulaire et de la disponibilité des séquences pour les amorces spécifiques (Tuinen *et al.*, 1998). Ils serviront ensuite de contrôle positif dans toutes les expériences et pour chaque gène étudié. Les amorces pour le gène *DESAT* (Seddas *et al.*, 2008), ont été obtenues à partir de séquences dans la banque de données MENS (Journet *et al.*, 2002) et celles du *STE12* ont été déduites à partir de séquences homologues dans d'autres champignons (Tollot *et al.*, 2009). La spécificité des amorces a été vérifiée par séquençage des produits de PCR sur l'ADNc de spores de *G. intraradices*, et par le manque d'amplification sur des ADNc de racines de *M. truncatula* non inoculées. Les amorces choisies amplifient des séquences de 200-659 pb.

3. RT-PCR *in situ*

Le protocole développé est résumé dans la **figure 4**

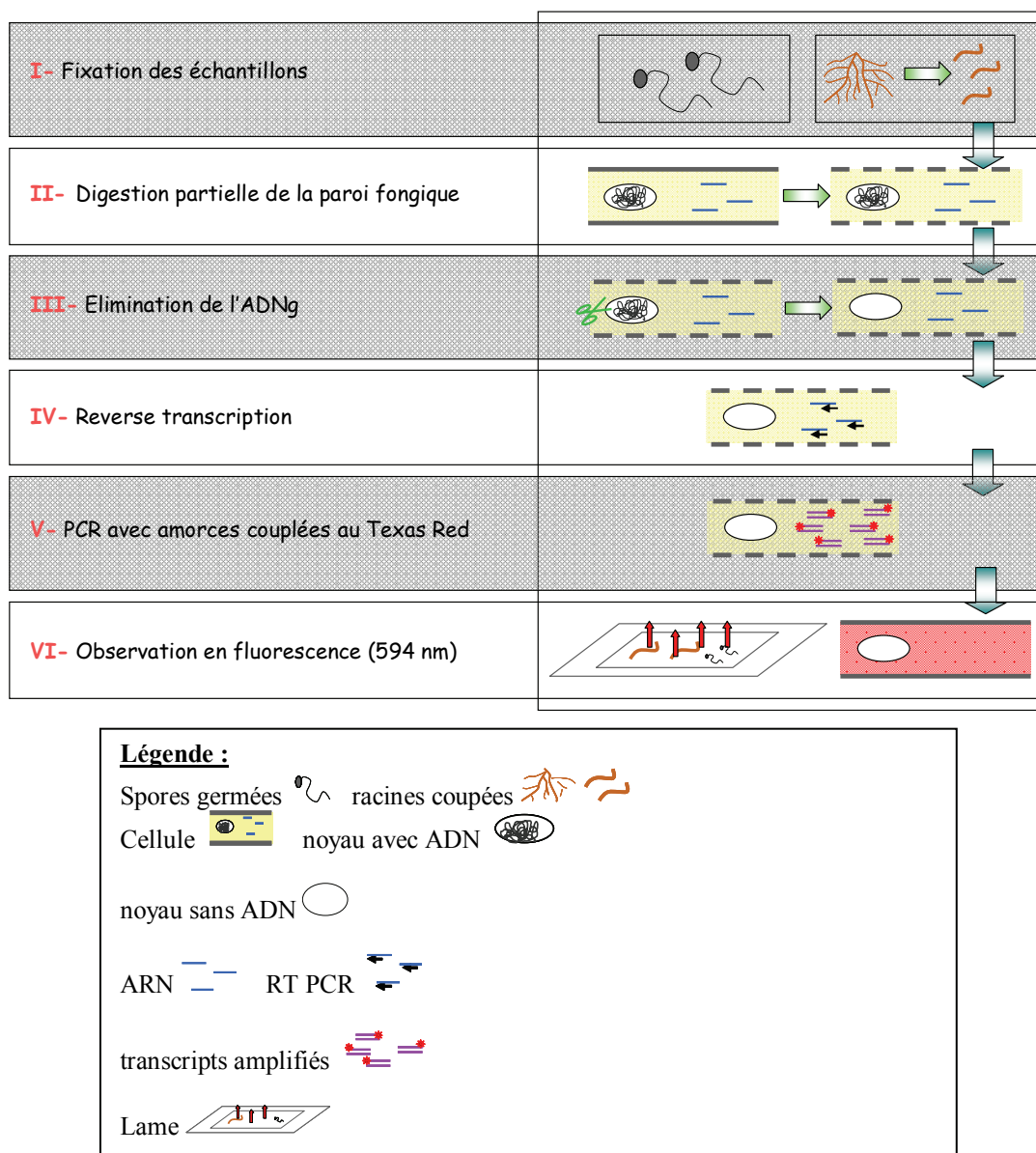


Figure 4 : récapitulatif de la méthode de RT-PCR *in situ* (d'après M.Tollot).

3.1 Préparation des échantillons et choix des fluorochromes

Les spores germées (environ 200) ou les racines découpées sur de la glace en fragments de quelques mm sont fixées par une solution contenant : 2V éthanol 100 %, 1V acide acétique glacial et 10 % de DMSO (diméthyl sulfoxyde). Les échantillons sont placés à 4°C, la nuit, sous agitation rotative.

Préalablement à la RT-PCR, les parois fongiques et végétales sont perméabilisées afin de permettre la pénétration des réactifs en utilisant respectivement la chitinase (de *Streptomyces griseus*) (Référence C6137 SIGMA) et la pectinase (d'*Aspergillus niger*) (Référence 17389 FLUKA). Puis, les protéines sont digérées par la protéinase K (Référence V3021 PROMEGA).

Enfin, l'ADN génomique est coupé en petit brins par des enzymes de restriction HaeIII (Référence R6171 PROMEGA) et HpaII (Référence R6311 PROMEGA), et éliminé par une incubation dans une ADNase (DNase 1 Référence 79254 QIAGEN) durant 5 heures à 37°C. Toutes ces étapes sont effectuées en présence d'un inhibiteur d'ARNase (RNAsin Ribonucléase inhibiteur Référence N 2111 PROMEGA).

Les fluorochromes doivent être choisis de façon à éviter de recueillir leur émission de fluorescence aux longueurs d'ondes révélant l'autofluorescence des tissus racinaires et des spores. La réalisation d'un spectre d'émission pour des racines témoins non inoculées de *M. truncatula* et pour les spores germées de *G. intraradices* a permis de définir une raie d'excitation (594 nm) et une bande d'émission du signal recueilli (606-640 nm). En conséquence, les amorces choisies précédemment seront marquées par le fluorochrome Texas Red en position 5'.

3.2 Synthèse d'ADNc, amplification par PCR et montage des lames

La transcription reverse d'ARN en ADNc est effectuée sur les échantillons de racines et de spores en présence de l'inhibiteur d'ARNase selon le protocole décrit par Seddas *et al.* (2008). Afin de contrôler la spécificité de la réaction, une digestion avec 100U de RNase est effectuée à cette étape sur une partie des échantillons. Les ADNc sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant un programme spécifique pour chaque gène (Seddas *et al.*, 2008, Tollot *et al.*, 2009). Par exemple, pour le gène de la grande sous unité ribosomique, il s'agit de :

1. étape de dénaturation à la température de 95°C 1 minute,
2. étape d'hybridation des amorces à la température de 55°C 1 minute,
3. étape d'élongation à la température de 72° C 2 minutes,
4. retour à la ligne 1 pour 29 cycles,
5. étape d'élongation finale à la température de 72°C 2 minutes.

Un contrôle négatif est réalisé pour chaque ADNc sur une partie des échantillons en omettant les amorces d'amplification. Les échantillons sont post-fixés dans l'éthanol 100 % puis transférés dans un gradient décroissant d'éthanol avant d'être lavés à l'eau Ultra pure.

Des fragments de racines ou des spores germés sont déposés sur des lames en verre préalablement induites d'une solution retardant le photo-blanchiment (Ref S3023 DAKO) et recouverts d'une lamelle. Chaque lame est déposée sur un support à plat, à l'abri de la lumière, à 4°C avant d'être observée au microscope confocal à balayage laser SP2 Leica.

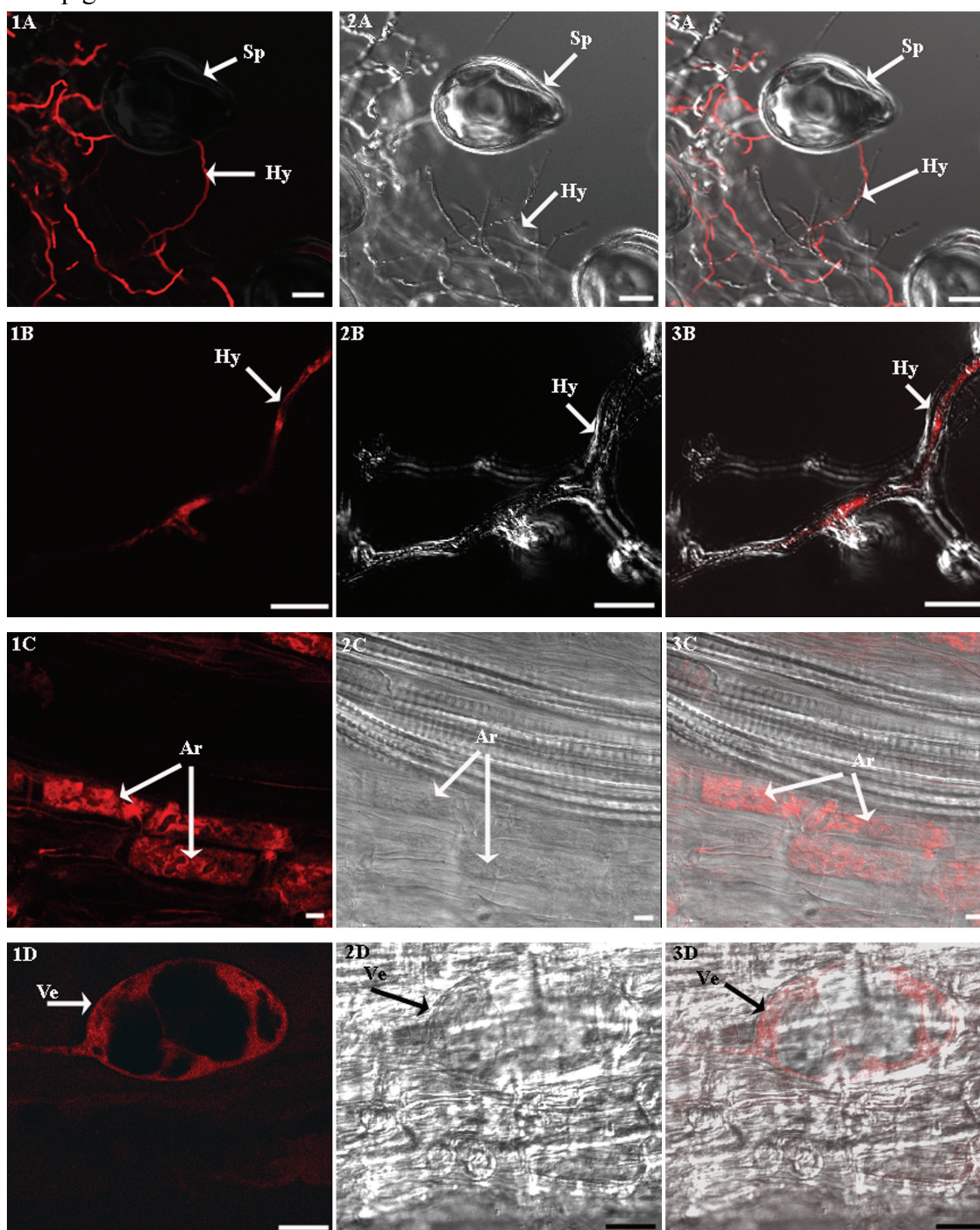
4. Résultats

L'observation du contrôle positif indique que la détection de l'expression des gènes fongiques ribosomiaux est constante et forte quel que soit le stade du développement du *G. intraradices* (résultats non montrés).

Les transcrits du gène *DESAT* (**figure 5A**) ne sont que faiblement présents dans les spores (Seddas *et al.* 2008). En revanche, l'expression de ce gène augmente dans les hyphes provenant de la germination des spores (**figure 5A**), et les transcrits sont clairement détectés au niveau des différentes structures fongiques formées en association avec la racine : hyphes externes (**figures 5B**), appressoria, arbuscules (**figure 5C**) et vésicules (**figure 5D**).

La dynamique de l'expression du gène *STE12* diffère au niveau des structures fongiques. En effet, ce gène est exprimé dans les spores (**figure 6A, 6B**) et dans les appressoria (**figure 6C, D**), mais aucune structure fongique dans les racines n'est révélée par la RT-PCR *in situ*.

Ces résultats mettent en évidence une expression différentielle des gènes de *G. intraradices*, suggérant une spécialisation de l'activité des tissus fongiques selon le stade du cycle biologique du champignon.



Figures 5 : localisation des transcrits du gène *DESAT* de *Glomus intraradices* dans les hyphes issus de spores germées (A), et dans le mycelium externe (B), les arbuscules (C) et les vésicules (D) intraradiculaires lors de la mycorhization de *Medicago truncatula* (14 jours post inoculation). Les observations sont présentées en images de microscopie (1) confocale, (2) Contraste Interférentiel Différentiel, et (3) confocale combinée avec le Contraste Interférentiel Différentiel.

Barre : 20µm, Sp spore, Hy hyphe, Ar arbuscule, Ve vésicule

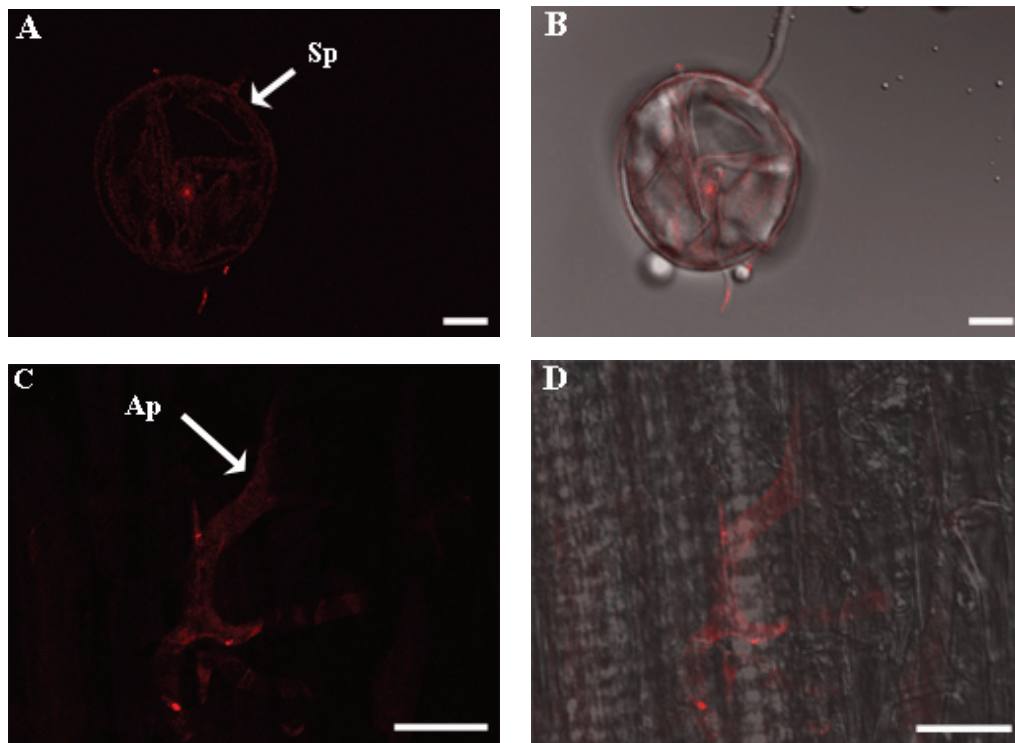


Figure 6 : localisation des transcrits du gène *STE12* de *Glomus intraradices* dans les spores germées (A, B) et dans le mycélium externe développant un appressorium (C, D) lors de la mycorhization de *Medicago truncatula* (14 jours post inoculation). Les observations sont présentées en images de microscopie confocale, (A, C) et confocale combinée avec le Contraste Interférentiel Différentiel (B, D).

Barre : 20µm, Sp spore, Ap appressorium

Conclusion

Pour la première fois et grâce à l'originalité de la RT-PCR *in situ* utilisant des amorces de PCR marquées par un fluorochrome, nous avons pu au sein de notre équipe relier l'expression de gènes fongiques aux structures morphologiques formées lors des interactions avec les tissus d'une plante-hôte. Ainsi, nous avons visualisé les transcrits de différents gènes fongiques à différentes étapes de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. L'activation du gène *DESAT* au niveau de l'ensemble des structures fongiques identifiées dans les racines et la mise en évidence d'une activation spécifique du gène *STE12* uniquement lors des étapes précoces de l'interaction, sont en accord avec ceux obtenus par qPCR (Seddas *et al.*, 2009, Tollot *et al.*, 2009). La technique a aussi été appliquée avec pertinence aux interactions avec les plantes déficientes pour la mycorhization (Seddas *et al.*, 2010). Les résultats que nous avons obtenus grâce à cette technique complètent les connaissances actuelles sur les gènes fongiques exprimés au niveau des interactions symbiotiques entre les deux partenaires. La RT PCR *in situ* est également un outil qui, dans la perspective d'exploiter les données du séquençage de *G. intraradices*, pourrait apporter de précieuses informations complémentaires sur les mécanismes impliqués dans la symbiose mycorhizienne.

Grâce à sa grande sensibilité, la RT PCR *in situ* très bien adaptée à des études de gènes faiblement exprimés. Il serait intéressant d'étendre cette méthodologie à l'étude d'autres interactions notamment entre plantes et champignons pathogènes.

Remerciements : Les auteurs remercient Philippe Aubert, Valérie Monfort et Annie Colombet de l'entretien des installations et des chambres de cultures.

Bibliographie

- Seddas P., Arnould C., Tollot M., Gianinazzi-Pearson V. (2008) Spatial monitoring of gene activity in extraradical and intraradical developmental stages of arbuscular mycorrhizal fungi by direct fluorescent *in situ* RT-PCR. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 1155-1165.
- Seddas P., Arnould C., Arias C., Godfroy O., Ait Ben Hassou H., van Tuinen D., Morandi D., Gianinazzi-Pearson V. (2009) Inactivation of symbiosis-related plant genes alters gene responses in an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22, 341-351.
- Seddas-Dozolme P.M.A., Arnould C., Tollot M., Kuznetsova E., Gianinazzi-Pearson V. (2010) Spatial monitoring of arbuscular fungal gene activity by direct fluorescent *in situ* RT - PCR. In: Sharon A (Ed), *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi*, Humana Press, Springer, Berlin - Heidelberg, 137-152.
- Smith, S., Gianinazzi-Pearson, V. (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 221-224.
- Tollot M., van Tuinen D., Arnould C., Chatagnier O., Wong Sak Hoi. J., Dumas B., Gianinazzi-Pearson V., Seddas P. (2009) An STE12 gene identified in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* restores infectivity of a hemibiotrophic plant pathogen. *New Phytol.*, 181, 693-707.
- van Tuinen D., Jacquot E., Zhao B., Gollotte A., Gianinazzi-Pearson V. (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol. Ecol.*, 7, 879-887.
- Weidmann S., Sanchez L., Descombin J., Chatagnier O., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (2004) Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 17, 1385-1393.