

Introduction Générale	1
1/ La rhizosphère et sa communauté microbienne	1
1 – 1 / Quelques exemples de partenaires symbiotiques du sol	2
1 – 2/ La symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA)	3
1 – 2a/ Les champignons MA, des organismes particuliers	3
1 – 2b/ La classification des Gloméromycètes	4
1 – 2c/ L'importance de la symbiose MA	5
1 – 2d/ Les différents stades de développement de l'interaction	6
1 – 2e/ Existence d'une voie de signalisation commune avec la symbiose rhizobium (voie SYM) nécessaire à la mise en place de l'interaction	8
1 – 2f/ Les différents points de contrôle de l'interaction	10
1 – 3/ Les signaux végétaux dans la phase pré-symbiotique : une attention particulière pour les strigolactones	12
1 – 3a/ Du « branching factor » aux strigolactones	12
1 – 3b/ Les strigolactones, molécules d'intérêt dans la rhizosphère	13
1 – 3c/ Les strigolactones, une famille nombreuse	14
1 – 3d/ L'étude des mutants de la voie de biosynthèse des strigolactones mène à l'identification d'une nouvelle hormone végétale	15
1 – 3e/ D'autres rôles hormonaux pour les strigolactones	18
1 – 3f/ Régulation de la production de strigolactones	19
1 – 4/ Les signaux fongiques pré-symbiotiques : des facteurs Myc aux Myc-LCO	20
1 – 5/ La régulation de la symbiose	22
1 – 5a/ L'importance des signaux végétaux	22
1 – 5b/ Autorégulation et régulation systémique	23
1 – 5c/ Le phosphate, élément régulateur de la symbiose	24
1 – 5d/ Régulation systémique de la symbiose par le phosphate	25
2/ Le maintien de l'homéostasie du phosphate	26
2 – 1/ La voie de signalisation impliquant miR399, PHO2 et IPS1/At4	27
2 – 2/ Les réponses effectrices face à la carence phosphatée	29
2 – 2a/ Une meilleure utilisation du Pi interne	29
2 – 2b/ Une meilleure acquisition du Pi externe	30
2 – 2c/ Réponses systémiques et réponses locales	32
2 – 3/ La symbiose MA, élément de réponse à la carence	34
2 – 3a/ Effets de la symbiose MA sur le développement des plantes	34
2 – 3b/ L'acquisition du phosphate par la voie symbiotique	35
3/ Questions et objectifs adressés à travers ce projet de thèse	37
CHAPITRE I/ Contrôle de la mycorhization par le phosphate, une régulation systémique et précoce	39
1/ Présentation	39
1 – 1/ Choix des organismes	39
1 – 1a/ Le matériel végétal	39
1 – 1b/ Le matériel fongique	41
1 – 2/ Conditions de fertilisation phosphatée	42
2/ Phosphate, mycorhization et régulation systémique	42
2 – 1/ Phénotype mycorhizien des plantes cultivées en HighP	42
2 – 1a/ Effet de la fertilisation sur la biomasse	42
2 – 1b/ Effet de la fertilisation sur les teneurs internes en P	43

2 – 1c/ Effet de la fertilisation sur la mycorhization	43
2 – 1d/ Effet de la fertilisation sur la formation des hyphopodes	45
2 – 2/ Effet direct du phosphate sur le champignon et contrôle systémique de la mycorhization.....	47
2 – 2a/ Effet du phosphate sur la germination de spores et la ramification du champignon.....	47
2 – 2b/ Effet du phosphate sur la mycorhization de <i>M. truncatula</i>	48
2 – 2c/ Approche split-root	49
3/ Un mécanisme régulateur possible : rôle des signaux diffusibles végétaux et en particulier des strigolactones	50
3 – 1/ Les strigolactones, molécules effectrices de la régulation par le phosphate ?.....	50
3 – 1a/ Effet du phosphate sur la production de strigolactones en système split-root	51
3 – 1b/ Effet d'un traitement par des strigolactones exogènes?	52
3 – 2/ La métabolomique, une approche sans <i>a priori</i>	53
3 – 3/ Etude des signaux diffusibles végétaux	54
3 – 3a/ Effets d'exsudats racinaires sur le développement du champignon.....	54
3 – 3b/ Effet des exsudats racinaires sur l'interaction.....	56
3 – 3c/ Utilisation d'un système «double-cône» pour découpler l'effet des exsudats de l'effet du phosphate environnemental	58
3 – 4/ Bilan sur les signaux diffusibles végétaux.....	60
4/ Autres mécanismes régulateurs possibles	61
4 – 1/ Hypothèse n°3 : signalisation fongique perturbée en HighP.....	61
4 – 2/ Hypothèse n°4 : perception du champignon perturbée en HighP	62
CHAPITRE II/ Effet du phosphate sur la perception du champignon par la plante.....	63
1/ Etude des oscillations calciques nucléaires	63
1 – 1/ Introduction : les réponses calciques lors de la nodulation et de la mycorhization	63
1 – 1a/ Réponses calciques lors de la nodulation	63
1 – 1b/ Réponses calciques lors de la mycorhization	64
1 – 2/ Présentation du système Cameleon 35S-NupYC2.1	64
1 – 3/ Effet du phosphate sur les oscillations calciques nucléaires.....	66
1 – 3a/ Conditions d'étude des réponses calciques nucléaires végétales.....	66
1 – 3b/ Signalisation calcique nucléaire végétale en réponse à des signaux fongiques (GSE et CO ₄).....	68
1 – 3c/ Signalisation calcique nucléaire dans les cellules racinaires au contact des hyphopodes.....	70
1 – 4/ Conclusion.....	71
2/ Approche expression de gènes (Fluidgim®).....	72
2 – 1/ Synthèse bibliographique : étude de la symbiose mycorhizienne à travers des approches transcriptomiques	72
2 – 2/ Choix de la technique, des conditions et des gènes.....	76
2 – 2a/ Choix de la technique et conditions utilisées	76
2 – 2b/ Choix des gènes	77
2 – 3/ Obtention des échantillons et traitement des données.....	78
2 – 4/ Résultats.....	79
2 – 4a/ Effet de l'inoculation des plantes sur l'expression des gènes	80

2 – 4b/ Gènes dont l'expression est affectée par la fertilisation phosphatée.....	81
2 – 4c/ Effet des traitements sur l'expression des gènes marqueurs de défense.....	83
2 – 4d/ Effet des traitements sur l'expression des gènes reliés à la symbiose.....	85
2 –5/ Conclusion et discussion autour des résultats de Fluidigm®.....	87
2 – 5a/ Importance de la défense en réponse aux signaux fongiques MA.....	88
2 – 5b/ Perturbation par le phosphate des gènes de réponse « myc ».....	91
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	93
1/ Mécanismes de régulation de la symbiose par le phosphate : bilan, hypothèses et perspectives	93
1 – 1/ Hypothèse n°5 : les strigolactones n'ont pas dit leur dernier mot.....	96
1 – 1a/ Importance des HPC et des transporteurs de strigolactones ?	96
1 – 1b/ Les strigolactones, signaux systémiques ?.....	97
1 – 1c/ Les strigolactones, rôles hormonaux ?.....	97
1 – 2/ Hypothèse n°6 : existence de signaux de surface ?	99
2/ Des enjeux fondamentaux et appliqués	101
2 – 1/ Mieux comprendre l'interaction mycorhizienne et la nutrition phosphatée des plantes en général	101
2 – 2/ Mieux faire face à la crise du phosphate... ..	103
2 – 2a/ De la malnutrition phosphatée des plantes à la crise invisible du phosphate	103
2 – 2c/ Des solutions pour faire face à la crise.....	104
MATÉRIELS & MÉTHODES	107
Matériels biologiques.....	107
Conditions de culture	107
Inoculation des plantes et détermination du taux de mycorhization	107
Expériences de split-root.....	108
Mesure des teneurs en phosphate	108
Préparation des exsudats racinaires	109
Bioessai de germination du champignon <i>R. irregularis</i>	109
Bioessai de ramification du champignon <i>G. rosea</i> (« branching test »)	110
Analyses en spectrométrie de masse.....	110
Expérimentations « double-cone »	111
Production de GSE (Germinating Spore Exsudates).....	111
Etude des oscillations calciques nucléaires.....	112
Dynamic Array™ IFCs (Fluidigm).....	113
Analyses statistiques des données.....	115
BIBLIOGRAPHIE.....	116
ANNEXE 1 : Balzergue <i>et al.</i> , 2011.....	144
ANNEXE 2 : Laparre <i>et al.</i> , 2010.....	158
ANNEXE 3 : Gènes utilisés pour le Fluidigm®.....	161
ANNEXE 4 : Effet des différents traitements sur l'expression de gènes de défense.....	163

Introduction Générale

1/ La rhizosphère et sa communauté microbienne

Les racines, organes souterrains des plantes, sont de fait bien souvent oubliées lors de l'étude des végétaux. Elles jouent pourtant des rôles centraux dans le développement et la vie de ces organismes. Tout d'abord elles encrent les plantes dans leur substrat, les fixant de façon définitive à un endroit donné. Cette immobilité oblige les plantes à faire preuve d'une étonnante capacité de plasticité et d'adaptation face aux perturbations environnementales. Les racines jouent aussi un rôle majeur dans l'absorption de l'eau et des minéraux essentiels à la croissance, et constituent parfois un organe de réserve pour l'organisme. Les racines (ainsi que les microorganismes associés) jouent le rôle d'architecte du sol, elles produisent des composés sécrétés dans l'environnement agissant sur la dégradation ou la formation de matière, participant ainsi au (re)modelage du sol.

Les racines ne peuvent être étudiées et comprises dans toute leur complexité sans considérer également leur environnement immédiat. C'est Lorenz Hiltner en 1904 qui utilisa le premier le terme de rhizosphère, provenant du grec « rhiza » signifiant racine et « sphere/sphaera » signifiant cercle d'influence. La rhizosphère représente donc le champ d'influence du système racinaire, elle comprend l'ensemble des racines ainsi que la zone de sol proche influencée par ces racines [soit via des exsudats racinaires, soit via des micro-organismes interagissant avec les dernières (Badri *et al.*, 2009)]. Dans la rhizosphère, les racines vivent entourées de nombreux micro-organismes formant un grand réservoir de diversité biologique. L'ensemble des micro-organismes dans un environnement donné est appelée microbiome. Le matériel génétique du microbiome présent dans le tube digestif de l'homme est souvent considéré comme un second génome; nous pourrions en dire de même pour le microbiome de la rhizosphère. L'importance de ces communautés microbiennes est de plus en plus étudiée chez les animaux mais aussi à l'échelle des écosystèmes (Berendsen *et al.*, 2012).

La rhizosphère comprend à la fois des organismes bénéfiques et néfastes pour les plantes. Ces organismes peuvent être des bactéries, des virus, des champignons, des oomycètes, des insectes, des nématodes, mais aussi des plantes parasites ou encore les racines d'autres plantes avoisinantes.

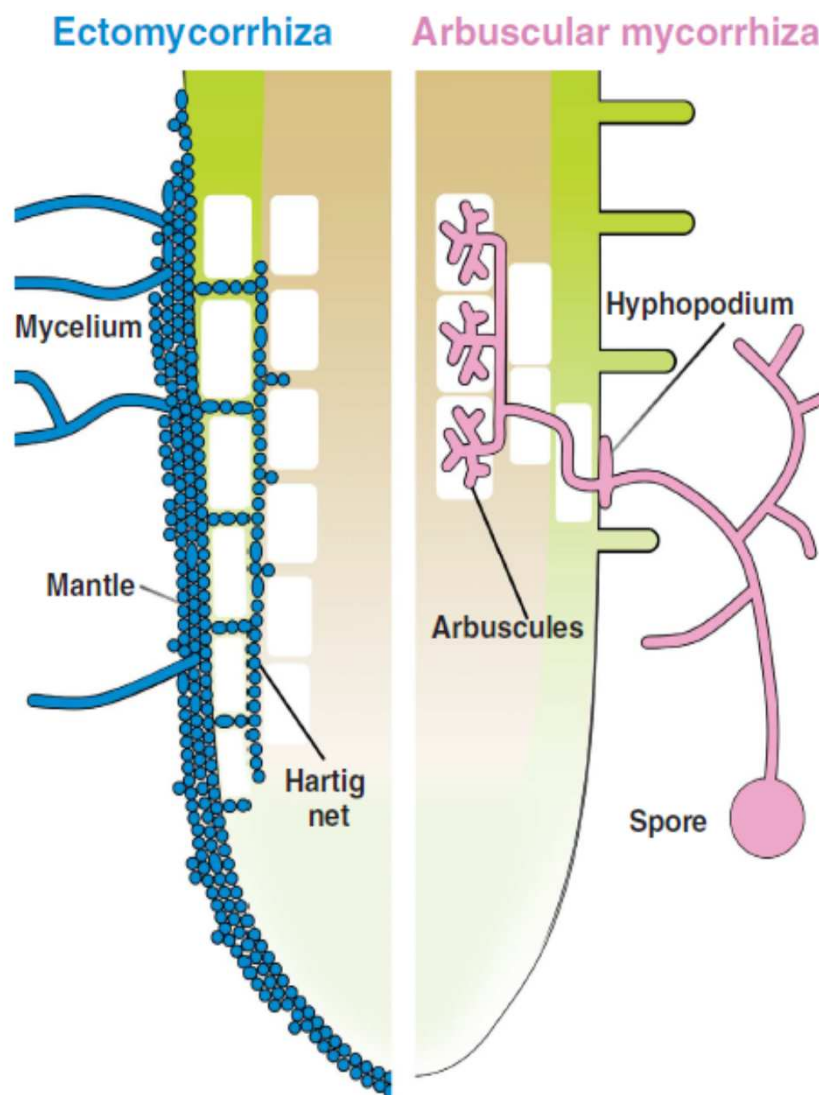


Figure 1 : Structures de colonisation des champignons ectomycorhiziens (en bleu) et endomycorhiziens à arbuscules (en rose) (Bonfante *et al.* 2010).

Les champignons ectomycorhiziens se développent tout autour de la racine jusqu'à la pointe racinaire formant un manteau fongique d'hyphes extérieurs, mais ils colonisent aussi l'intérieur de la racine entre les cellules végétales formant le réseau de Hartig.

Les champignons endomycorhiziens à arbuscules ne colonisent pas la pointe racinaire, ils se développent de façon extracellulaire mais aussi de façon intracellulaire par exemple lors de la formation des arbuscules dans les cellules corticales.

1 – 1 / Quelques exemples de partenaires symbiotiques du sol

Parmi les différents organismes bénéfiques pour les plantes on compte les champignons mycorhiziens. Le mot mycorhize provient du grec « mycos » pour champignon et « rhiza » pour racine, il définit donc une interaction entre des racines et des champignons. Les mycorhizes peuvent être morphologiquement et phylogénétiquement classées en deux groupes principaux :

- tout d'abord on distingue les ectomycorhizes où le champignon ne pénètre pas à l'intérieur des cellules racinaires. Il forme à l'extérieur des racines une sorte de manchon d'hyphes, et à l'intérieur des racines il se développe entre les cellules formant une interface symbiotique appelée réseau de Hartig (Figure 1). Cette symbiose concerne la plupart des arbres des forêts tempérées et implique des champignons appartenant aux *Basidiomycètes* ou aux *Ascomycètes* (arbre phylogénétique en Figure 2-A).

- dans le cas des symbioses endomycorhiziennes, les champignons rentrent à l'intérieur des cellules racinaires pour réaliser les échanges avec la plante. Il existe 3 types d'endomycorhizes, les endomycorhizes à pelotons du type ericoïde ou associées aux orchidées et les endomycorhizes à arbuscules au centre de notre étude. Dans ce dernier cas les champignons concernés appartiennent au groupe monophylétique des Gloméromycètes.

D'autres symbioses endoracinaires existent, on trouve notamment les symbioses fixatrices d'azote faisant des bactéries capables d'assimiler de l'azote atmosphérique améliorant ainsi la nutrition azotée des plantes hôtes. Parmi ces interactions, on peut trouver les exemples suivants (bactéries/plantes) : *rhizobium/Parasponia* ; *Frankia*/plantes actinorhiziennes ; *Nostoc/Gunnera* , ainsi que *rhizobium*/plantes légumineuses (ou *Fabaceae*) particulièrement bien décrite aujourd'hui. La plus détaillée et la mieux décryptée aujourd'hui est celle qui associe les bactéries *rhizobia* et les plantes de la famille des légumineuses

Je vais pour le moment présenter plus en détail la symbiose mycorhizienne à arbuscules, en décrivant plus particulièrement les champignons impliqués dans cette symbiose, l'importance de l'interaction ainsi que les différentes étapes de développement, les événements de signalisation et les éléments de régulation de la symbiose.

1 – 2/ La symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA)

1 – 2a/ Les champignons MA, des organismes particuliers

Les champignons MA sont des organismes particuliers pour plusieurs raisons :

i) Ce sont des biotrophes obligatoires : sans l'interaction avec la plante hôte leur fournissant des éléments carbonés, ils ne peuvent accomplir leur cycle de développement (Smith & Read, 2008). Les raisons du caractère obligatoire de la biotrophie restent encore mal connues. Cependant les données de séquençage récentes suggèrent qu'elle ne serait pas liée à la perte de gènes essentiels, mais plutôt à un contrôle par la plante de l'activité métabolique du champignon (Tisserant *et al.*, 2012).

ii) Les études en laboratoire ne montrent pas de spécificité d'hôte forte : un même champignon peut coloniser de nombreuses espèces végétales. Réciproquement, une plante peut être colonisée par plusieurs espèces de champignons MA (parfois en même temps). Il existe néanmoins des associations préférentielles, ce phénomène étant sans doute plus important dans la nature qu'au laboratoire. Ces préférences pourraient être liées au contenu des exsudats racinaires de différentes espèces végétales (Steinkellner *et al.*, 2007), ou bien aux modes de colonisation différents des champignons (type *Arum* ou *Paris*) (Smith & Read, 2008), ou bien encore au caractère plus ou moins mutuel et donc durable de l'interaction entre les partenaires (Kiers *et al.*, 2011).

iii) La génétique de ces champignons reste encore mal comprise. Le degré de ploïdie, le nombre de chromosomes, la ségrégation des noyaux, l'existence ou non de méiose, sont autant de sujets non résolus et faisant parfois l'objet de controverse (Sanders & Croll, 2010). La reproduction sexuée n'a jamais été observée chez ces champignons, même si les gènes nécessaires semblent présents (Tisserant *et al.*, 2012 ; Corradi & Bonfante, 2012). Les champignons MA semblent ainsi se développer de manière clonale, les hyphes sont coenocytiques (sans septa séparant les différents noyaux) et donc multinucléés, les spores contiennent des centaines (voire milliers) de noyaux associés à un grand polymorphisme génétique. La communauté scientifique spécialiste est encore divisée sur la question de la ploïdie et de la caryotie. Les champignons MA pourraient être homocaryotes (noyaux génétiquement identiques) et plutôt polyploïdes, ou être homocaryotes et haploïdes, ou encore hétérocaryotes (noyaux génétiquement différents) et haploïdes (revue : Sanders & Croll, 2010). De plus, les champignons MA ont un pourcentage en bases A-T

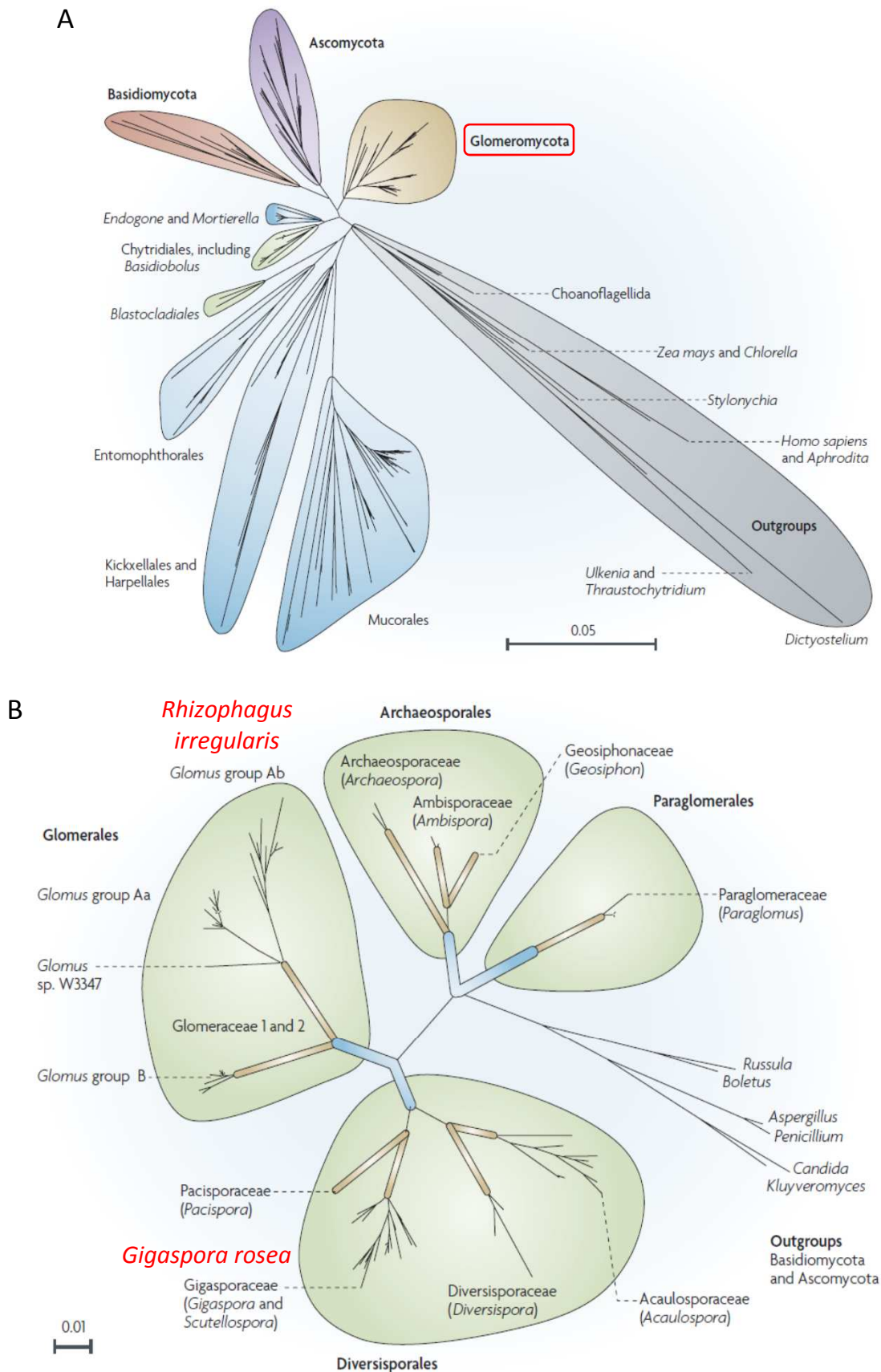


Figure 2 : Phylogénie des *Gloméromycètes* (adapté d'après Parniske, 2008)

A : arbre phylogénétique des différentes lignées de champignons, on retrouve les *Gloméromycètes* (entourés en rouge), les *Ascomycètes* (violet) , les *Basidiomycètes*, les *Chytridiomycètes* (vert) et les *Zygomycètes* (bleu).

B : arbre phylogénétique des 4 ordres de *Gloméromycètes*. Les deux champignons utilisés dans cette thèse sont rajoutés en rouge : *Rhizophagus irregularis* (ex *Glomus intraradices*) et *Gigaspora rosea* appartiennent à deux ordres différents.

inhabituellement élevé (environ 70 % chez *R. irregularis*), qui complique le séquençage et l'assemblage du génome, en cours depuis plusieurs années (Martin *et al.*, 2008).

iv) Un aspect important du développement du champignon est que certaines espèces peuvent réaliser des fusions d'hyphes entre individus génétiquement proches, phénomène appelé anastomose. Ce processus permet l'échange de nutriments (Mikkelsen *et al.*, 2008) mais aussi de noyaux (Giovannetti *et al.*, 1999 ; Croll *et al.*, 2009) compliquant encore plus la structure/plasticité génétique de cet organisme.

L'ensemble de ces caractères rendent la production des champignons MA à grande échelle difficile. La mise en place d'un système de culture *in vitro* de champignon sur des racines « hairy-roots » en boîte de Petri (Bécard & Fortin, 1988) permet cependant de produire du champignon en conditions axéniques et d'étudier d'un peu plus près l'interaction. De plus, la transformation génétique stable des champignons MA est pour le moment impossible et les exemples de transformations transitoires restent rares et difficile à mettre en œuvre (Harrier & Millam, 2001 ; Helber & Requena, 2008 ; Helber *et al.*, 2011) (EXEMPLES). Ceci limite ainsi souvent les possibilités d'étude du champignon ou de l'interaction. Une meilleure compréhension de la génétique de ces champignons nous permettra peut-être un jour de réaliser de telles approches.

1 – 2b/ La classification des Gloméromycètes

Les *Gloméromycètes* sont composés de quatre ordres : les *Glomérales* (*Glomus* groupes A et B), les *Paraglomérales* (*Paraglomus*), les *Archéosporales* (*Archeospora*, *Ambispora* et *Geosiphon*) et les *Diversisporales* (*Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Pacispora* et *Diversispora*) (Figure 2-B) (classification selon Schüßler *et al.*, 2001). On dénombre aujourd'hui environ 150 espèces, une estimation qui pourrait s'avérer largement en dessous de la réalité en raison de la difficulté de délimiter clairement les espèces chez ces organismes (Smith & Read, 2008). On observe parmi les *Gloméromycètes* une grande diversité morphologique, notamment au niveau des spores qui sont de taille, couleur et forme très variables selon les espèces.

Au niveau phylogénétique, les analyses moléculaires permettent aujourd'hui d'affiner la classification des champignons MA. Dernièrement, la communauté scientifique a même été amenée à changer les noms de différents champignons mycorhiziens dont le champignon modèle *Glomus intraradices* (DAOM197198), qui a été reclassé en 2009 sous le

nom de *Glomus irregularis* (Stockinger *et al.*, 2009). Plus récemment, Walker et Schüßler ont proposé pour cette espèce le nom de *Rhizophagus irregularis* (Schüßler & Walker, 2010 ; Krüger *et al.*, 2012). Cette dernière appellation reprise dernièrement par plusieurs auteurs (Labidi *et al.*, 2012 ; Pérez-Tienda *et al.*, 2012 ; Lauressergues *et al.*, 2012 ; Liao *et al.*, 2012...), sera utilisée dans ce manuscrit à travers l'écriture *R. irregularis*.

1 – 2c/ L'importance de la symbiose MA

L'interaction entre les champignons MA et les plantes est extrêmement ancienne puisqu'elle date d'environ 450 millions d'année, moment de l'apparition des premières plantes terrestres. En effet, plusieurs études de fossiles montrent des structures fongiques très semblables à celles typiquement observées chez les champignons MA actuels. Parmi ces fossiles, certains datent du Dévonien inférieur (environ 415 Ma) et montrent notamment des structures ressemblantes à des arbuscules (Remy *et al.*, 1994) et d'autres présentent des spores datant de l'Ordovicien (environ 460 Ma) (Redecker *et al.*, 2000). Il est généralement admis que l'interaction entre les premières plantes primitives et les champignons MA de l'époque a participé à la colonisation du milieu terrestre par les plantes (pour revues voir : Raven & Edwards, 2001 ; Bonfante & Genre, 2008 ; Humphreys *et al.*, 2010). Encore aujourd'hui, la grande majorité des espèces de plantes terrestres (environ 80 %, y compris chez les mousses et les hépatiques) sont capables d'effectuer une symbiose MA, indiquant un incroyable succès évolutif concernant cette interaction symbiotique. Il existe malgré tout plusieurs familles de plantes incapables de réaliser cette symbiose, dont certaines s'engagent dans d'autres relations symbiotiques et d'autres sont totalement non mycotrophes. En dehors de ces exceptions, les plantes sont donc normalement en interaction avec un champignon MA, la condition non mycorhizée restant inhabituelle (Smith & Smith, 2011).

Les intérêts de la symbiose MA pour les plantes sont nombreux. Tout d'abord, le champignon se développe dans les racines mais aussi au niveau extra-racinaire dans le sol. Le nom de mycorhizosphère est attribué à la zone explorée par les deux partenaires (Linderman, 1988). Grâce à son réseau mycélien, le volume de sol exploré par le champignon est bien plus grand que celui parcouru par les racines seules. Il peut donc avoir accès à des ressources supplémentaires en eau et en éléments minéraux qui sont transmis ensuite à la

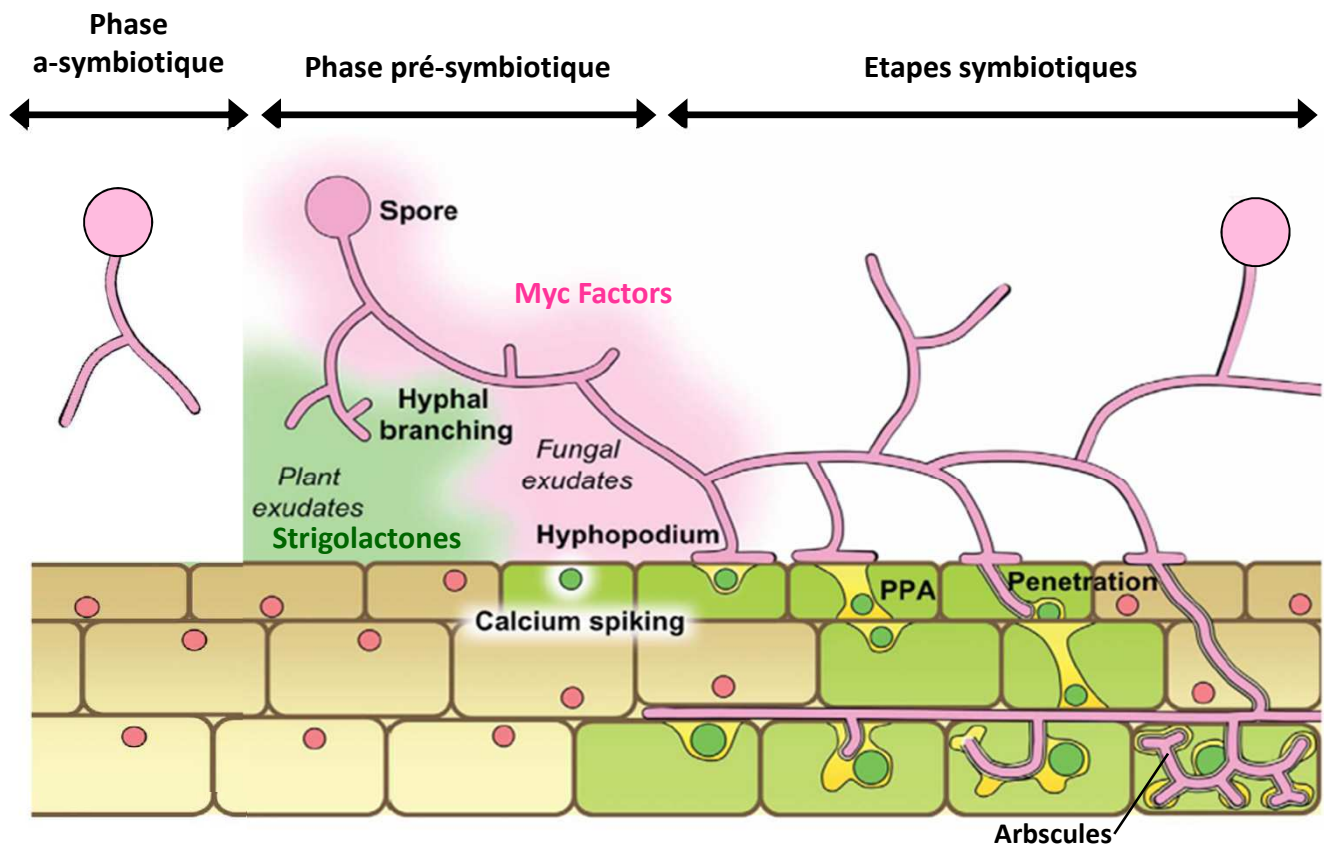


Figure 3 : Schéma des différents étapes de colonisation des champignons MA (adapté d'après Bonfante & Genre 2010).

La phase a-symbiotique : le champignon germe et forme quelques ramifications sans l'aide ou la présence du partenaire végétal.

La phase pré-symbiotique : échanges de signaux diffusibles sans contact direct entre les deux partenaires. La plante sécrète des exsudats perçus par le champignon, induisant sa ramification et son activité métabolique. Le champignon produit lui aussi des signaux perçus par les cellules racinaires, induisant des variations de teneurs en calcium dans le cytoplasme et les noyaux, ainsi que l'activation de gènes végétaux.

La phase symbiotique : le champignon forme un hyphopode à la surface de l'épiderme, la plante met en place un appareil de pré-pénétration (PPA) pour guider le développement du champignon à travers les différentes couches de cellules jusqu'au cortex interne où sont mis en place les arbuscules et où ont lieu les échanges. Ensuite le champignon peut finir son cycle de développement et former une nouvelle génération de spores.

plante hôte au niveau des racines. Le principal avantage pour la plante est donc une meilleure nutrition hydrique et minérale en particulier en phosphate (pour revue : Smith & Read, 2008). Les plantes mycorhizées reçoivent du phosphate de la part du champignon et cela se traduit le plus souvent par une augmentation de la biomasse par rapport à des plantes non colonisées (l'effet est d'autant plus net que les plantes sont en conditions de carence phosphatée), ceci s'accompagnant parfois de teneurs internes en phosphate supérieures chez les plantes mycorhizées. De plus, l'état mycorhizé fournit aussi à la plante une meilleure résistance aux stress abiotiques comme le stress hydrique, salin ou la présence de métaux lourds (exemples : Al-Karaki, 2000 ; Aroca *et al.*, 2007 ; Hildebrandt *et al.*, 2007) mais aussi aux stress biotiques. En effet, des plantes mycorhizées sont plus résistantes à certains pathogènes racinaires (Whipps, 2004) mais aussi foliaires (exemples : Liu *et al.*, 2007 ; Campos-Soriano *et al.*, 2011).

L'association symbiotique entre les champignons MA et les plantes est dite mutualiste, c'est-à-dire que les deux partenaires tirent profit de l'interaction. Les champignons MA (biotrophes obligatoires) reçoivent de la plante des éléments carbonés issus de la photosynthèse. L'interaction représente donc un coût pour le partenaire végétal. La part de photosynthétats transférée au champignon est non négligeable puisqu'elle peut atteindre jusqu'à 20 % du carbone fixé lors de la photosynthèse, soit environ 5 milliards de tonnes de carbone par an (Bago *et al.*, 2000).

1 – 2d/ Les différents stades de développement de l'interaction

Il existe tout d'abord une phase dite a-symbiotique sans contact ni échange entre les deux partenaires (schéma Figure 3). Dans des conditions favorables, les spores peuvent germer spontanément et produire un tube germinatif et quelques ramifications primaires sans même avoir besoin de puiser dans leurs réserves lipidiques (Bécard *et al.*, 2004). Lorsqu'aucun partenaire végétal n'est à proximité, selon les espèces fongique, les hyphes germinatifs peuvent alors se septer et le cytoplasme peut se rétracter dans la spore initiale. Ils peuvent aussi sporuler en formant des spores plus petites (Hildebrandt *et al.*, 2002). Dans tous les cas, l'essentiel des réserves énergétiques des spores initiales est conservé. De nouvelles germinations peuvent alors être observées, augmentant ainsi les chances du champignon de rencontrer une racine (Bécard *et al.*, 2004).

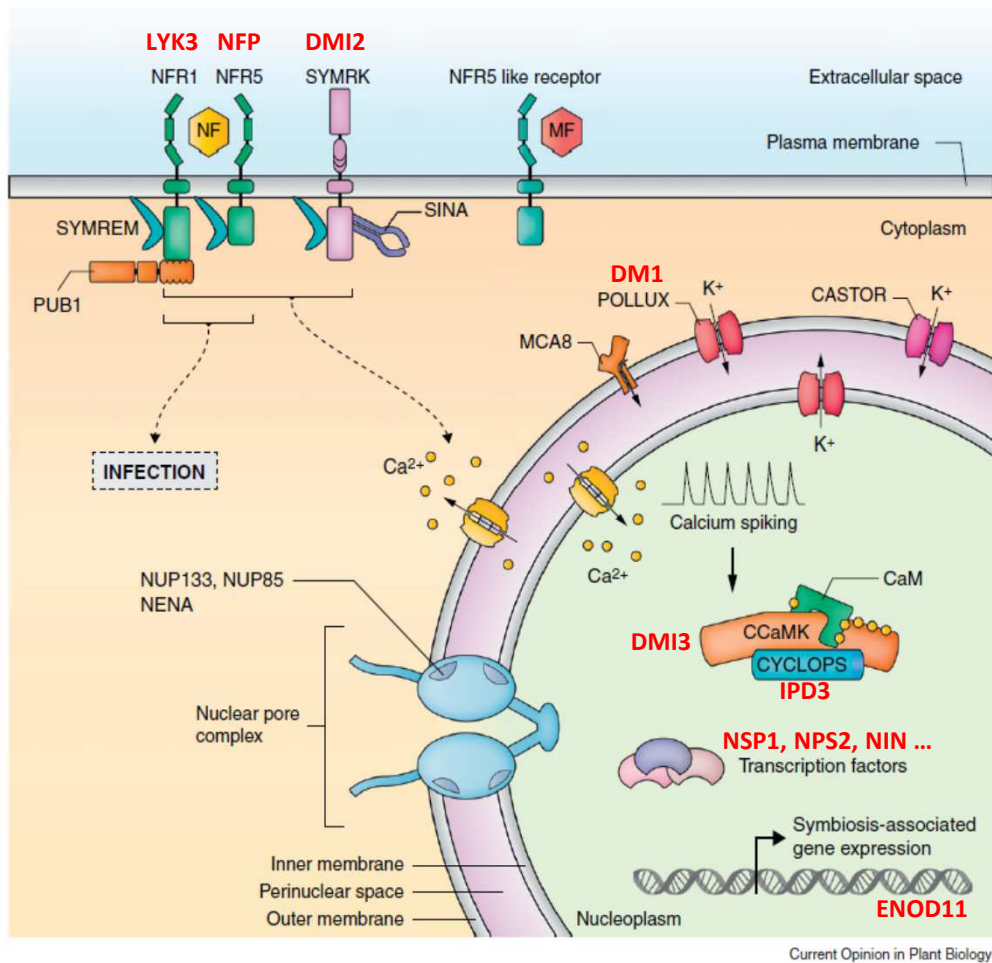
Avant même le premier contact entre les deux partenaires, se déroule un échange de signaux diffusibles produits par chacun des partenaires. Cette phase est dite pré-symbiotique. Les plantes produisent des exsudats racinaires capables d'activer l'activité métabolique et une ramification intense des hyphes du champignon. Les champignons sécrètent eux aussi des signaux diffusibles induisant notamment dans les cellules végétales des variations de concentration en calcium dans le cytosol et le noyau, la régulation transcriptionnelle de gènes et la ramification des racines. La nature et l'importance de ces signaux symbiotiques seront abordées ultérieurement dans une partie spécifique. La germination des spores se fait de façon asynchrone, l'ensemble des étapes qui suivent sont donc elles aussi non synchronisées à l'échelle de la plante.

Viennent ensuite les étapes symbiotiques à proprement parler :

- Le champignon forme un hyphopode au contact de l'épiderme. Ce dernier représente le point d'accroche du champignon à la racine et son futur point de pénétration.
- Dans la cellule épidermique située sous l'hyphopode, un appareil de pré-pénétration (PPA) est mis en place qui correspond à un réarrangement polarisé du cytoplasme et du cytosquelette. Il permet la formation d'un pont apoplasmique endocellulaire à travers lequel le champignon va se développer pour traverser les différentes couches cellulaires jusqu'aux cellules corticales (Genre *et al.*, 2005 ; 2008).
- Le champignon pénètre dans les cellules corticales sans en traverser la membrane plasmique et forme des structures hyper-ramifiées appelées arbuscules. Les arbuscules sont entourés d'une membrane plasmique péri-arbusculaire séparant le champignon du cytoplasme végétal. C'est au niveau des arbuscules qu'ont lieu les échanges carbone-phosphate/azote entre le champignon et la plante grâce à des transporteurs spécifiques. Les arbuscules ont une durée de vie limitée (en moyenne 8,5 jours). Ils atteignent une taille maximale dans la cellule puis rentrent en sénescence et le champignon peut être complètement éliminé de la cellule végétale qui revient à son état initial (Javot *et al.*, 2007a). Une cellule peut ainsi accueillir plusieurs arbuscules successifs. De plus, un grand nombre d'espèces de champignons MA comme *R. irregularis* produisent des structures de réserves lipidiques à l'intérieur des racines au niveau dans les cellules ou au niveau de l'apoplaste, ce sont des vésicules (Smith & Read, 2008).

Parallèlement à son développement intra-racinaire, un mycélium se développe à l'extérieur de la racine capable de prélever des minéraux et de l'eau dans des zones de sol

A



B

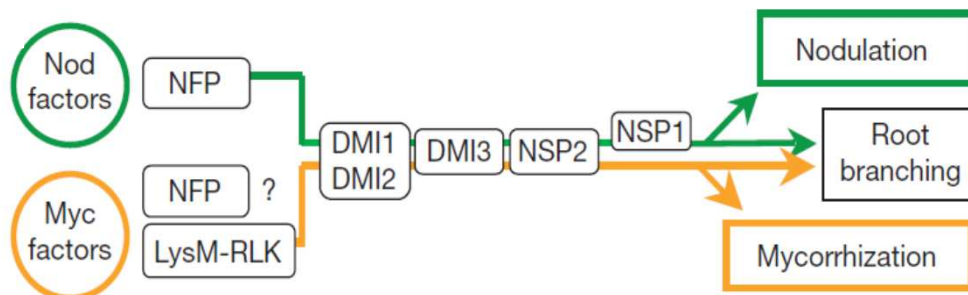


Figure 4 : Voie de transduction des signaux symbiotiques.

A : éléments de signalisation symbiotique. La perception des FNod au niveau membranaire passe par des récepteurs LysM-RLK (*LjNFR1* et *LjNFR5* chez le lotier correspondants à *MtLYK3* et *MtNFP* chez *Medicago truncatula*). Elle induit rapidement une réponse calcique nucléaire. *LjSYMRK/MtDMI2*, *LjCASTOR/LjPOLLUX/MtDMI1*, *LjNUP85*, *LjNUP133*, *LjNENA* sont positionnés en amont de ce signal calcique et sont nécessaires à sa formation. Ensuite intervient *LjCCaMK/MtDMI3* une calmoduline kinase dépendante du calcium qui participe au décodage du signal calcique et qui interagit avec *LjCYCLOPS/MtIPD3* et des facteurs de transcription comme *MtNSP1*, *MtNSP2* et *MtNIN* activant l'expression de gènes tels que *MtENOD11*. (adapté d'après Singh & Parniske, 2012)

B : schéma récapitulatif des éléments communs de la voie de transduction activée par les signaux symbiotiques (FNod et FMyc) menant à la mycorrhization, la nodulation et la ramification des racines. (Maillet et al., 2011)

normalement inaccessibles aux racines seules. Ce mycélium extra-racinaire peut coloniser de nouvelles régions du système racinaire de la plante hôte (infections secondaires) ou coloniser les racines d'une plante voisine. Il produit également les nouvelles spores à l'origine d'un nouveau cycle.

1 – 2e/ Existence d'une voie de signalisation commune avec la symbiose rhizobium (voie SYM) nécessaire à la mise en place de l'interaction

Pour commencer, nous allons présenter plus en détail la symbiose entre les bactéries rhizobiennes et les racines des légumineuses. Cette symbiose est relativement bien connue car plus facile à étudier que la symbiose MA, et nous allons voir que son étude a permis de grandes avancées dans la compréhension de la symbiose MA. Lors de cette interaction, un dialogue moléculaire a lieu entre les racines des plantes et les bactéries (Cooper, 2007). Les plantes sécrètent entre autres des flavonoïdes qui, une fois perçus par les bactéries, induisent chez ces dernières l'expression des gènes Nod (pour nodulation). Ces gènes bactériens codent pour des protéines impliquées dans la production de lipochitooligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod (FNod) (Peters *et al.*, 1986 ; Dénarié & Debellé, 1996). La perception des FNod par les plantes est la première étape qui permettra d'accueillir les bactéries dans la racine et d'aboutir à la formation d'un nouvel organe appelé nodule.

La voie de signalisation déclenchée par les FNod est de mieux en mieux décryptée (notamment grâce aux études réalisées chez le lotier *Lotus japonicus* et chez *Medicago truncatula*). De façon très intéressante, plusieurs protéines (une dizaine au moins) impliquées dans cette voie de signalisation sont également importantes pour l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Parniske, 2008 ; Singh & Parniske, 2012). On l'appelle donc la voie SYM ou CSP (pour common symbiosis pathway) (Figures 4-A et 4-B). Si plusieurs gènes spécifiques de la nodulation comme *LjNFR1*, *LjNFR5*, *NIN*, *LHK1*, *etc.* ont été bien caractérisés, aucun gène spécifique de la symbiose MA, impliqué dans les étapes précoces, n'a encore été trouvé. Nous pouvons aussi remarquer que certains éléments de cette voie SYM sont aussi importants pour

La perception des FNod fait intervenir des récepteurs membranaires de type LysM-RLK appelés nod factor receptor (*LjNFR5/MtNFP* et *LjNFR1/MtLYK3*) (Amor *et al.*, 2003 ;

Madsen *et al.*, 2003 ; Radutoiu *et al.*, 2003 ; Limpens *et al.*, 2003 ; Smit *et al.*, 2007 ; Bensmihen *et al.*, 2011). Chez le lotier, une interaction directe vient d'être démontrée *in vitro* entre les FNod et les récepteurs LjNFR5 et LjNFR1 (Broghammer *et al.*, 2012). De plus, lors de la symbiose particulière entre les bactéries *rhizobium* et des plantes non légumineuses appelées *Parasponia* l'homologue de LjNFR5/MtNFP (PaNFP) s'avère nécessaire pour la nodulation mais aussi pour la formation d'arbuscules chez ces plantes (Op den Camp *et al.*, 2011). Le(s) récepteur(s) des signaux fongiques ne sont pour le moment pas identifiés clairement. Les derniers résultats concernant l'interaction symbiotique *rhizobium* et *Parasponia* laissent penser que des récepteurs de type LYM-LRK sont aussi impliqués dans la perception de signaux mycorhiziens.

D'autres protéines ont été identifiées : un autre récepteur membranaire possédant un domaine kinase fonctionnel appelé LjSYMRK/MtDMI2 (Endre *et al.*, 2002 ; Stracke *et al.*, 2002), un canal cationique nucléaire LjCASTOR/LjPOLLUX/MtDMI1 (Ané *et al.*, 2004 ; Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005), des nucléoporines découvertes uniquement chez le lotier LjNUP85, LjNUP133 et LjNENA (Kanamori *et al.*, 2006 ; Saito *et al.*, 2007 ; Groth *et al.*, 2010). Toutes ces protéines sont nécessaires à la formation d'un signal calcique nucléaire essentiel pour les deux symbioses (Oldroyd & Downie, 2006). Une protéine calmoduline-kinase dépendante du calcium LjCCaMK/MtDMI3 localisée dans le noyau intervient ensuite pour décoder et transduire ces oscillations calciques (en particulier pour distinguer les voies Nod et Myc) (Tirichine *et al.*, 2006 ; Lévy *et al.*, 2004 ; Mitra *et al.*, 2004). Lors de cette transduction, la CCaMK interagit avec les protéines LjCYCLOPS/MtIPD3 qu'elle phosphoryle (Messinese *et al.*, 2007 ; Yano *et al.*, 2008) et les facteurs de transcription MtNSP1 et MtNSP2 (Smit *et al.*, 2005 ; Kaló *et al.*, 2005). Un autre facteur de transcription MtNIN est important pour la nodulation (Marsh *et al.*, 2007). De façon intéressante, des chercheurs viennent de découvrir que NSP1 et NSP2 sont indispensables à la production de strigolactones chez le riz et *M. truncatula* (Liu *et al.*, 2011a). De plus, NSP1 et NSP2 peuvent se lier en complexe au niveau du promoteur du gène ENOD11 et réguler son expression (Hirsch *et al.*, 2009). Le gène *MtENDO11* (pour early nodulin 11) bien qu'ayant une fonction inconnue représente un marqueur de la perception des signaux symbiotiques bactériens (FNod) et mycorhiziens (FMyc). Dans le cas de la symbiose mycorhizienne, *ENOD11* est exprimé au cours de la progression de la colonisation par le champignon (Journet *et al.*, 2001 ; Chabaud *et al.*, 2002).

La voie SYM est particulièrement bien caractérisée dans le cas d'interactions symbiotiques *rhizobium*/légumineuses, de façon intéressante on peut noter que certains éléments sont aussi importants lors d'autres interactions fixatrices d'azote. En effet, plusieurs sont par exemple impliqués lors de l'interaction *frankia*/plantes actinorhiziennes (Gherbi *et al.*, 2008 ; Hocher *et al.*, 2011) et NFP intervient lors de l'interaction entre *rhizobium* et la plante non-légumineuse *Parasponia* (Op den Camp *et al.*, 2011). Ces résultats montrent l'importance de cette voie de signalisation dans la mise en place d'interactions symbiotiques de manière plus générale.

1 – 2f/ Les différents points de contrôle de l'interaction

Chacun des différents stades de mycorhization présentés précédemment peut représenter un point de contrôle de l'interaction, et il existe de nombreux mutants de plantes bloqués à différents stades du développement de la symbiose. Ces mutants peuvent être globalement classés en plusieurs groupes : les cas où le champignon ne forme pas d'hyphopode (hyp-), les cas où les hyphopodes sont formés mais le champignon n'arrive pas à pénétrer l'épiderme (pen-) (NB dans ces mutants les hyphopodes sont parfois anormaux et/ou plus nombreux), les cas où le champignon rentre dans la racine mais a du mal à progresser (coi-, pour cortex invasion) et les cas où les arbuscules sont anormaux ou ne se forment pas (arb-). Les mutants de la voie SYM peuvent eux aussi être classés selon ces groupes : *dmi2*, *dmi1*, *nup5*, *nup133* sont des mutants coi-, *castor* et *ipd3* sont coi- et arb- et *dmi3* est le seul à être coi- et arb- mais aussi pen- (Marsh & Schultze, 2001 ; Parniske, 2008).

On remarque qu'aucun des mutants de la voie SYM n'est affecté dans la formation d'hyphopodes. De fait, les éléments permettant la formation des hyphopodes restent mal connus. On peut considérer que la formation de l'hyphopode a lieu lorsque les deux partenaires se sont correctement reconnus lors de la phase pré-symbiotique et lorsque la plante est dans un état favorable à l'interaction (Giovannetti *et al.*, 1993a). Des études sur des parois isolées de différentes couches cellulaires ont permis de démontrer que les hyphopodes étaient capables de se former sur la paroi d'épiderme uniquement, et non sur des parois de cortex ou de tissus vasculaire (Nagahashi & Douds, 1997). La mise en place des hyphopodes n'est pas non plus observée sur des racines de plantes non hôtes et n'a pu être reproduite sur des surfaces artificielles telles que de la cellulose ou du nylon (Garriock *et al.*, 1989 ; Giovannetti *et al.*, 1993a ; Nagahashi & Douds, 1997). Les mutants affectés dans la

formation d'hyphopodes sont rares. Les mutant *pmi1* (premycorrhizal infection) et *pmi2* identifiés chez la tomate montrent des hyphopodes normaux mais en nombre considérablement réduit (hyp-) (David-schwartz *et al.*, 2001, 2003). Malheureusement les gènes responsables de cette mutation n'ont pas été caractérisés, mais un rôle de composés diffusibles végétaux a été proposé pour expliquer ces phénotypes (Sun *et al.*, 2012). De même, le mutant *nope1* de maïs est bloqué dans la formation d'hyphopodes mais là aussi les raisons de ce phénotype sont inexpliquées (Paszkowski *et al.*, 2006). Enfin, le mutant *Ljsym4* est affecté dans la formation des hyphopodes chez le lotier, mais les auteurs n'ont pas identifié les mécanismes ou les gènes responsables de ce phénotype (Bonfante *et al.*, 2000).

D'autres mutants (non affectés dans des éléments composants la voie SYM) présentent des phénotypes pen-, coi- ou arb-. Pour accueillir le champignon dans leurs cellules corticales, les plantes doivent reprogrammer ces cellules. Des gènes sont donc impliqués dans les modifications cellulaires permettant l'accueil du champignon. Un gène appelé VAPYRIN a été identifié chez *M. truncatula* comme nécessaire au développement du champignon, que ce soit pour la pénétration (pen-) de l'épiderme (coi-) mais surtout pour la formation des arbuscules (arb-) puisque chez le mutant *vapyrin*, le champignon ne pénètre même pas dans la cellule (Pumplin *et al.*, 2010). Ces résultats ont été retrouvés chez le pétunia où un mutant *pam1* préalablement caractérisé comme incapable d'accueillir le champignon dans ses cellules s'est avéré être lui aussi affecté dans un gène codant pour la vapyrine (Feddermann *et al.*, 2010), confirmant le rôle de ce gène dans la progression du champignon et l'accommodation des cellules végétales pour accueillir le champignon. De façon intéressante, ce gène se révèle aussi important pour l'infection des poils absorbants par les rhizobia et la formation de nodules dans le cadre de la symbiose nodulaire, son expression est induite suite à un traitement avec des FNod et ce, de façon SYM-dépendante (Murray *et al.*, 2011).

Un autre exemple concerne les mutants *str1* et *str2* de *M. truncatula* présentant des anomalies au niveau de la formation d'arbuscules. STR1 et STR2 codent pour des « half-size ABC transporters » exprimés chez le sauvage constitutivement dans les tissus vasculaires et induits dans les cellules contenant des arbuscules (Zhang *et al.*, 2010). L'importance de ces gènes pour la formation d'arbuscules normaux a été retrouvée chez le riz (phénotype arb-) (Gutjahr *et al.*, 2012).

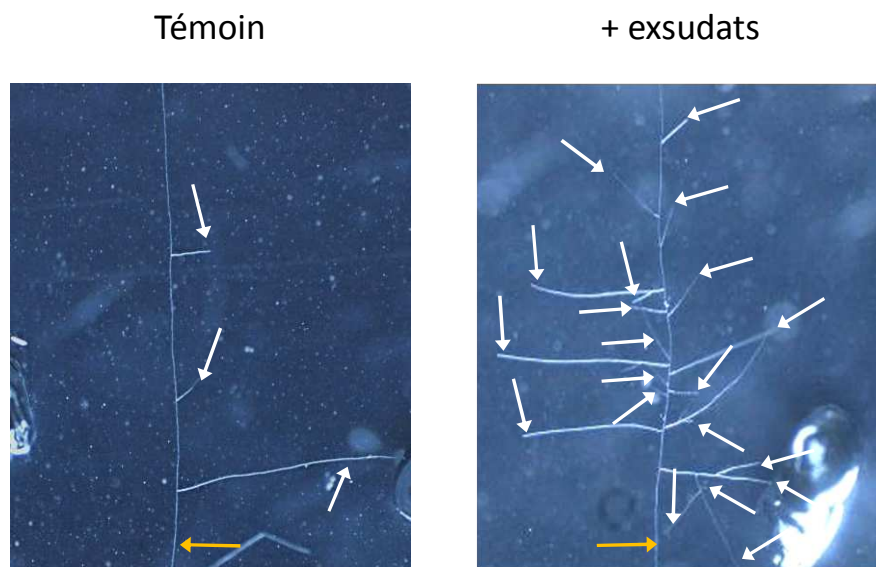


Figure 5 : Ramification du champignon *Gigaspora rosea* en réponse à des exsudats racinaires

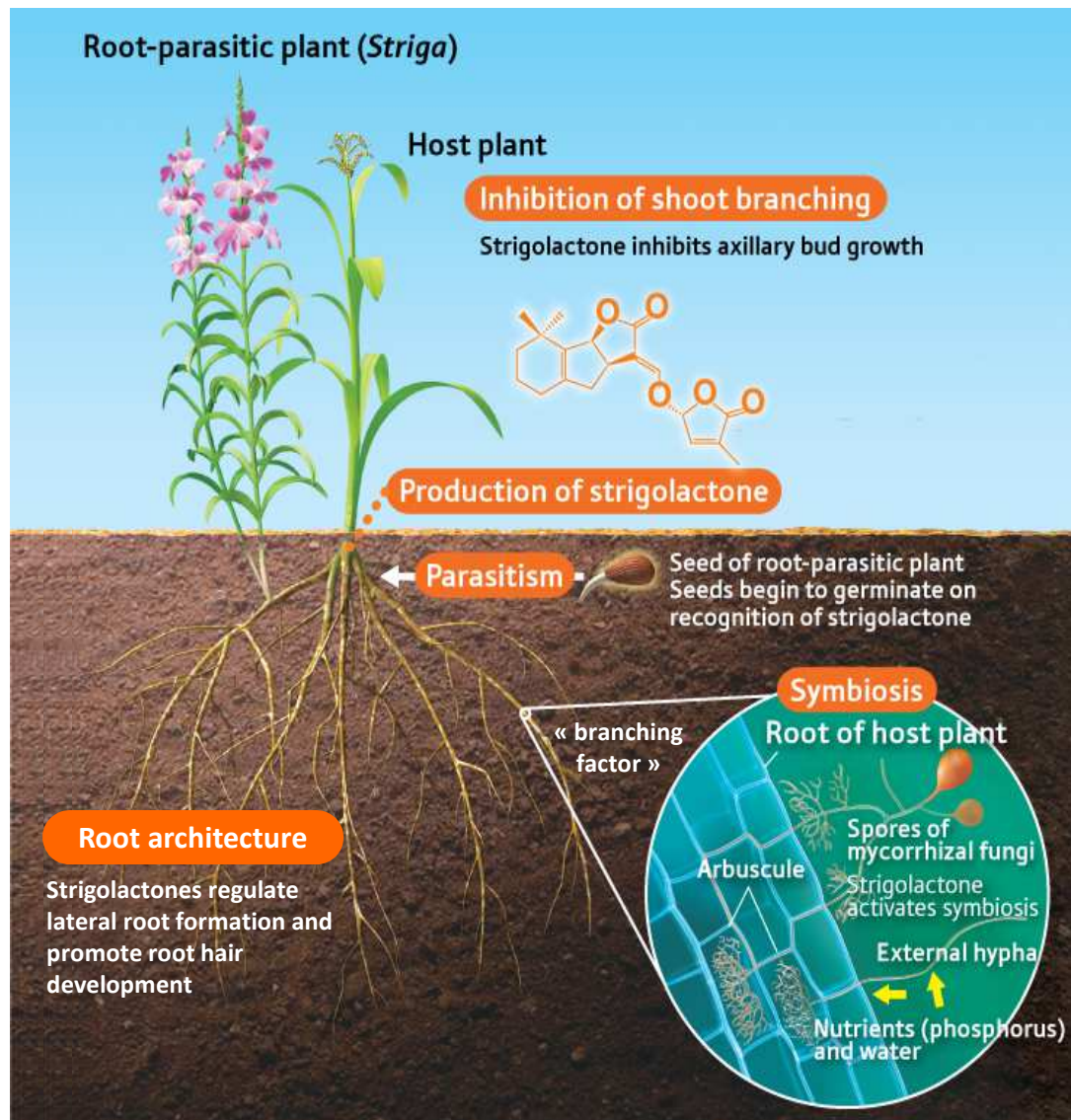
Des extraits d'exsudats racinaires sont appliqués des deux côtés de l'hyphe principal (flèches jaunes) d'une spore de *G. rosea* ayant germé sur milieu M depuis 6 jours. Les nouveaux apex fongiques formés 48h après traitement sont dénombrés (flèches blanches). On remarque une forte ramification lorsque le champignon est traité par des exsudats de plantes par rapport au champignon témoin traité au solvant seul.

1 – 3/ Les signaux végétaux dans la phase pré-symbiotique : une attention particulière pour les strigolactones

1 – 3a/ Du « *branching factor* » aux strigolactones

De nombreuses études ont montré que les exsudats racinaires de plantes mycotrophes ainsi que le mucilage de l'apex contiennent des molécules capables de stimuler la croissance du champignon et sa ramification (exemples : Graham, 1982 ; Elias & Safir, 1987 ; Bécard & Piché, 1989 ; Giovannetti *et al.*, 1993b ; Tawaraya *et al.*, 1996 ; Nagahashi & Douds, 2004). Les exsudats de plantes non-hôtes ne provoquent pas de tels effets sur le champignon (exemples : Bécard & Piché, 1990 ; Giovannetti *et al.*, 1993b ; Schreiner & Koide, 1993 ; Buee *et al.*, 2000 ; Nagahashi & Douds, 2004), suggérant l'importance de ces signaux dans la mise en place de l'interaction. Différentes études ont été menées pour caractériser les molécules végétales responsables de la réponse de ramification du champignon. Giovannetti *et al.* en 1996 ont montré grâce à une membrane séparant le champignon des racines que ces dernières sécrétaient des molécules diffusibles d'une taille inférieure à 500 Da activant le champignon. La mise au point d'un bioessai basé sur la ramification du champignon (« branching test » décrit dans Matériels & Méthodes) a permis de démontrer la présence de molécules hydrophobes actives à de faibles concentrations dans une fraction semi-purifiée d'exsudats de racines de carottes « hairy-roots » (Nagahashi & Douds, 2000 ; Buee *et al.*, 2000). A l'époque, ces molécules encore non caractérisées ont été appelées « branching factor » (Buee *et al.*, 2000), car à l'origine d'un hyper-ramification observée chez le champignon comparable à celle obtenue en réponse à une racine hôte vivante (Figure 5) (Bécard & Fortin, 1988 ; Giovannetti *et al.*, 1993b, 1994, 1996). Le champignon passe d'une étape a-symbiotique à une étape pré-symbiotique, au moment où en réponse aux signaux végétaux il active le catabolisme de ses réserves lipidiques et ramifie fortement (Bécard *et al.*, 2004).

La nature du ou des signaux contenus dans le « branching factor » est longtemps restée inconnue. Les recherches se sont d'abord portées sur les flavonoïdes, molécules végétales sécrétées par les racines et connues comme intervenant notamment dans le dialogue moléculaire mis en place entre les rhizobia et les légumineuses (Subramanian *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que certains flavonoïdes stimulaient la croissance de certains champignons MA ainsi que la mycorhization (Scervino *et al.*, 2007) alors que d'autres étaient sans effet ou avaient un effet négatif (Scervino *et al.*, 2007 ; Steinkellner *et*



(adapté d'après <http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/frontline/6205>)

Figure 6 : Les strigolactones, molécules signal à plusieurs titres.

Rôles dans la rhizosphère

- Les strigolactones activent la germination des graines de plantes parasites (*Striga*, *Orobanche*...), ces dernières s'accrochent ensuite sur des racines hôtes où elles vont puiser les ressources nécessaires à leur développement
- Les strigolactones sont aussi perçues par les champignons mycorrhiziens à arbuscules, elles induisent leur activité métabolique et leur ramification.

Rôles dans le développement de la plante

- Les strigolactones ont un rôle hormonal dans le contrôle de la ramification des parties aériennes en inhibant le développement des bourgeons axillaires.
- Elles contrôlent aussi l'architecture racinaire en régulant la formation des racines latérales et la croissance de la racine primaire, et en favorisant la croissance des poils absorbants.

al., 2007 ; Hassan & Mathesius, 2012). Il faut savoir que chaque plante produit un mélange spécifique de plusieurs flavonoïdes, et que dans la nature on estime à environ 10000 le nombre de flavonoïdes végétaux différents (Dixon & Pasinetti, 2010). A l'encontre de cette hypothèse du rôle joué par les flavonoïdes, une étude de mutants de maïs affectés au niveau de la chalcone synthase (et donc incapables de produire des flavonoïdes) a montré que le phénotype mycorhizien de ces mutants n'était pas modifié. Les plantes mutantes étaient normalement mycorhizées par différentes espèces de champignons MA (Bécard *et al.*, 1995). L'ensemble de ces études suggèrent que les flavonoïdes ne sont pas indispensables pour la mise en place de l'interaction MA. Cependant ils pourraient participer aux mécanismes régulant l'association préférentielle de certaines plantes avec certains champignons. Les polyamines, enfin, sont d'autres métabolites qui ont également été proposés comme molécules induisant la ramification du champignon et favorisant la formation des hyphopodes (El Ghachtouli *et al.*, 1995 ; Cheng *et al.*, 2012).

Puis, en 2005 et 2006, deux études menées en parallèle ont permis de montrer que des molécules appelées strigolactones contenues dans les exsudats racinaires contribuent fortement à l'activité « branching factor » :

D'un côté le « branching-test » a été utilisé pour guider la purification de molécules actives à partir d'exsudats racinaires de lotier (*Lotus japonicus*). Une strigolactone, le 5-deoxy-strigol (Figure 7), a ensuite été identifiée par plusieurs méthodes biochimiques dans une fraction très pure. Cette molécule à elle seule est capable de stimuler la ramification du champignon (Akiyama *et al.*, 2005).

Parallèlement dans notre équipe, les strigolactones ont été étudiées comme molécules candidates, sur la base de leur propriétés biologiques et physico-chimiques rappelant celles du « branching factor ». Une strigolactone, la sorgolactone (Figure 7), a été identifiée dans des fractions actives semi-purifiées d'exsudats racinaires de sorgho (*Sorghum bicolor*). Son activité et celle de strigolactones de synthèse (GR24, GR7) ont été montrées sur la ramification du champignon à des concentrations extrêmement faibles (brevet : Bécard *et al.*, 2005 ; Besserer *et al.*, 2006).

1 – 3b/ Les strigolactones, molécules d'intérêt dans la rhizosphère

Les strigolactones étaient déjà connues depuis longtemps comme ayant un rôle dans la rhizosphère. En effet elles induisent la germination des graines de plantes parasites

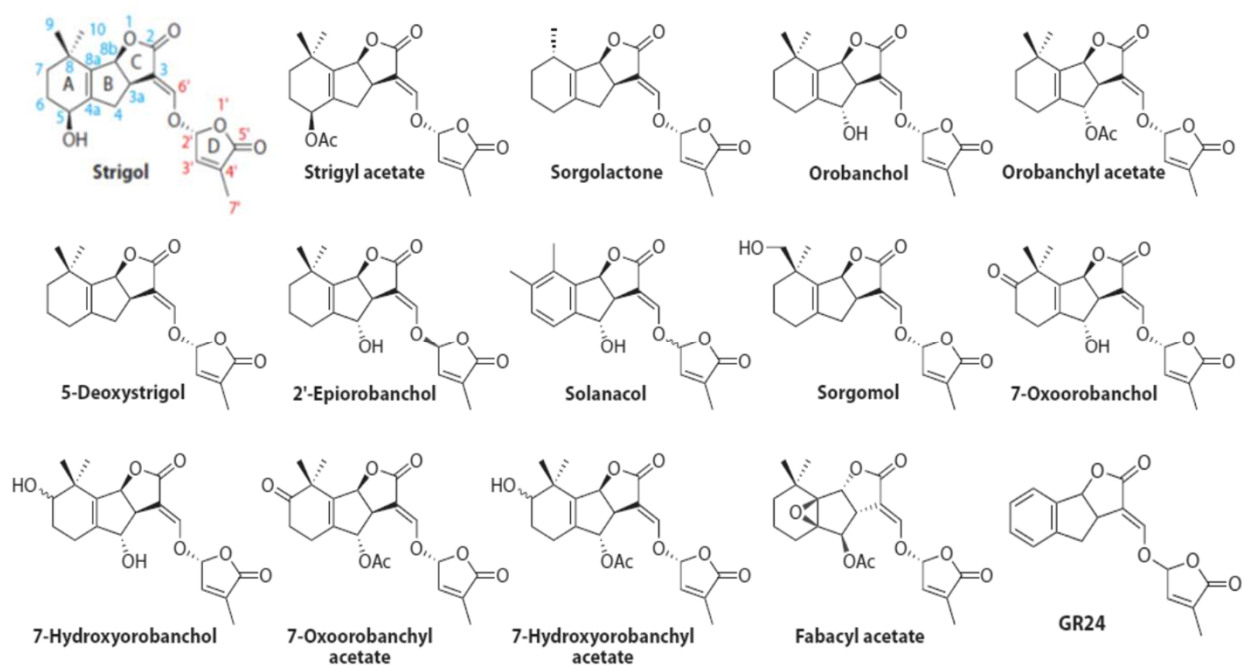


Figure 7 : Structures chimiques des strigolactones naturelles et du GR24 (analogue de synthèse) (adapté d'après Xie *et al.*, 2010)

Les strigolactones sont composées de 4 cycles A, B, C, et D. Le cycle A comporte 6 carbones, le cycle B 5 carbones et les cycles lactones C et D 4 carbones. Les cycles C et D reliés entre eux par une liaison enol-ether sont très conservés. Les cycles A et B, plus variables, changent selon les substitutions portées sur les différents carbones (principalement des méthyles, des hydroxyles ou des acétyles sur les C7 et C8 du cycle A et le C4 du cycle B).

(Figure 6) *Striga* et *Orobanche*. Tout comme les champignons MA, ces parasites sont strictement dépendants de l'interaction avec la plante en tant que biotrophes obligatoires. Leurs graines ne peuvent germer qu'en présence de molécules exsudées par les racines. En 1966, Cook *et al.* ont réussi à isoler et identifier à partir d'exsudats racinaires une strigolactone, le strigol (Figure 7), capable d'induire la germination des graines de *Striga*.

Chez les champignons MA, les strigolactones pures sont capables d'induire la ramification des hyphes germinatifs chez différentes espèces (*Gigaspora margarita*, *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora rosea*) jusqu'à de très faibles concentrations (10^{-13} M). Elles peuvent aussi stimuler la germination des spores de *R. irregularis* et de *Glomus claroideum* (Besserer *et al.*, 2006). Ces effets sont associés à une rapide et forte stimulation du métabolisme respiratoire et de la biogenèse mitochondriale du champignon (Besserer *et al.*, 2006, 2008), phénomènes qui avaient déjà été observés en réponse à des exsudats racinaires (Tamasloukht *et al.*, 2003).

L'importance des strigolactones dans la mycorhization a ensuite été démontrée grâce à l'étude de mutants de pois défectueux dans la production de strigolactones, qui se sont avérés moins colonisés que les plantes sauvages et dont le phénotype mycorhizien a pu être restauré par ajout exogène de strigolactones (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). L'importance de ces résultats nous incite à présenter plus précisément ce que sont les strigolactones.

1 – 3c/ Les strigolactones, une famille nombreuse

Les strigolactones sont des molécules constituées de 4 cycles carbonés, dont deux portent des fonctions lactone (Figure 7). Elles sont instables et produites en très faible quantité par les plantes, si bien qu'il a fallu analyser les exsudats de 300 000 plants de coton pour les isoler (Cook *et al.*, 1966). Depuis, les méthodes d'extraction et de détection se sont améliorées et de nombreuses études ont été réalisées chez des espèces variées montrant l'existence d'une large gamme de strigolactones naturelles différentes (Figure 7) : une quinzaine de strigolactones différentes sont aujourd'hui caractérisées (Yoneyama *et al.*, 2009 ; Xie *et al.*, 2010). Les strigolactones ont été retrouvées dans l'ensemble des organismes où elles ont été recherchées, même chez *Arabidopsis thaliana* et le lupin blanc (*Lupinus albus*), organismes pourtant incapables d'interagir avec les champignons MA (Yoneyama *et al.*, 2008). Elles ont aussi été détectées chez les hépatiques (*Marchantia* spp et *Lunularia cruciata*), les plantes terrestres les plus basales, et même chez certaines algues

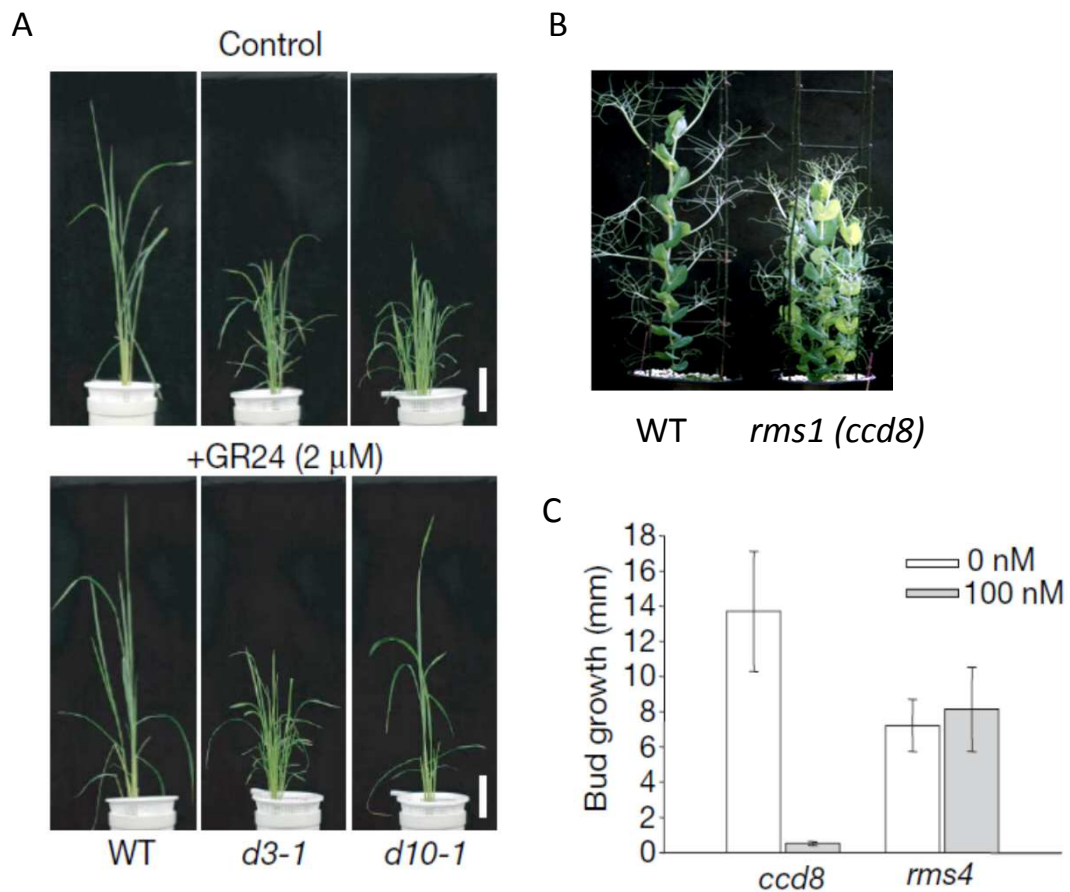


Figure 8 : Effet des strigolactones sur la ramification des parties aériennes.

A : effet des strigolactones sur le tallage du riz (*Oriza sativa*). *d3* est affecté dans la perception/signalisation des strigolactones et *d10* dans la production (correspond au mutant *ccd8*). Les mutants sont bien plus ramifiés que les sauvages. L'ajout exogène de strigolactone de synthèse (GR24) permet de restaurer le phénotype sauvage uniquement chez les mutants *d10*. (Umehara *et al.*, 2008)

B et C : effet des strigolactones sur la ramification du pois (*Pisum sativum*). *rms1* est hyper-ramifié par rapport au sauvage (B). L'ajout exogène de GR24 permet d'inhiber la ramification du mutant *rms1* mais pas de *rms4* (affecté dans la perception des strigolactones) (C). (Gomez-Roldan *et al.*, 2008)

vertes proches des embryophytes comme les Charales (Delaux *et al.*, 2012). Chaque espèce végétale produit en général un mélange de plusieurs strigolactones (Awad *et al.*, 2006). Il existe aussi des analogues de synthèse de strigolactones comme le GR24 (Figure 7), très largement utilisés dans les laboratoires car plus facile à synthétiser que les strigolactones naturelles (Johnson *et al.*, 1981).

1 – 3d/ L'étude des mutants de la voie de biosynthèse des strigolactones mène à l'identification d'une nouvelle hormone végétale

Alors qu'on pensait que les strigolactones étaient des sesquiterpènes lactones (Bouwmeester *et al.*, 2003 ; Akiyama *et al.*, 2005), il a été démontré grâce à des mutants et des inhibiteurs de différentes voies métaboliques que les strigolactones dérivent en fait du clivage de caroténoïdes (Matusova *et al.*, 2005). Les enzymes capables de cliver les caroténoïdes sont divisées en deux classes, les NCED (nine-cis-epoxy carotenoid dioxygenase) impliquées notamment dans la production de l'hormone ABA et les CCD (carotenoid cleavage dioxygenase) (Bouvier *et al.*, 2005).

Dans le but de mieux caractériser l'importance des strigolactones durant la mycorhization, notre équipe a alors recherché des mutants bloqués dans les voies de biosynthèse de ces molécules, notamment des mutants de CCD. En fait, des mutants de deux isoformes étaient disponibles : les mutants *ccd7* et *ccd8* de pois (*rms5* et *rms1* respectivement). Ils avaient déjà été étudiés non pas pour leur absence de strigolactones mais pour leur phénotype morphologique aérien hyper-ramifié. En effet, CCD7 et CCD8 étaient alors déjà connues comme des enzymes impliquées dans la production d'une hormone végétale alors inconnue appelée SMS (pour shoot multiplication signal) contrôlant la ramification des parties aériennes chez *A. thaliana* et le pois (*Pisum sativum*) (Booker *et al.*, 2004 ; Beveridge, 2006). Les mutants *ccd* de pois (*rms1*) et de riz (*d10* et *d17*) arborent un système aérien hyper-ramifié (tallage plus fort chez le riz) par rapport aux plantes sauvages (Figure 8). Notre équipe, ainsi qu'une autre équipe japonaise indépendamment, a pu démontrer que les strigolactones sont les molécules se cachant derrière la fameuse hormone SMS. Des approches biochimiques (analyses en spectrométrie de masse) ont permis de démontrer l'absence de strigolactones chez les mutants *ccd* de pois (*rms1* et *rms5*) et de riz (*d10* et *d17*), et un ajout exogène de strigolactones (GR24) chez ces mutants permettait de retrouver un phénotype sauvage (Gomez-Roldan *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*,

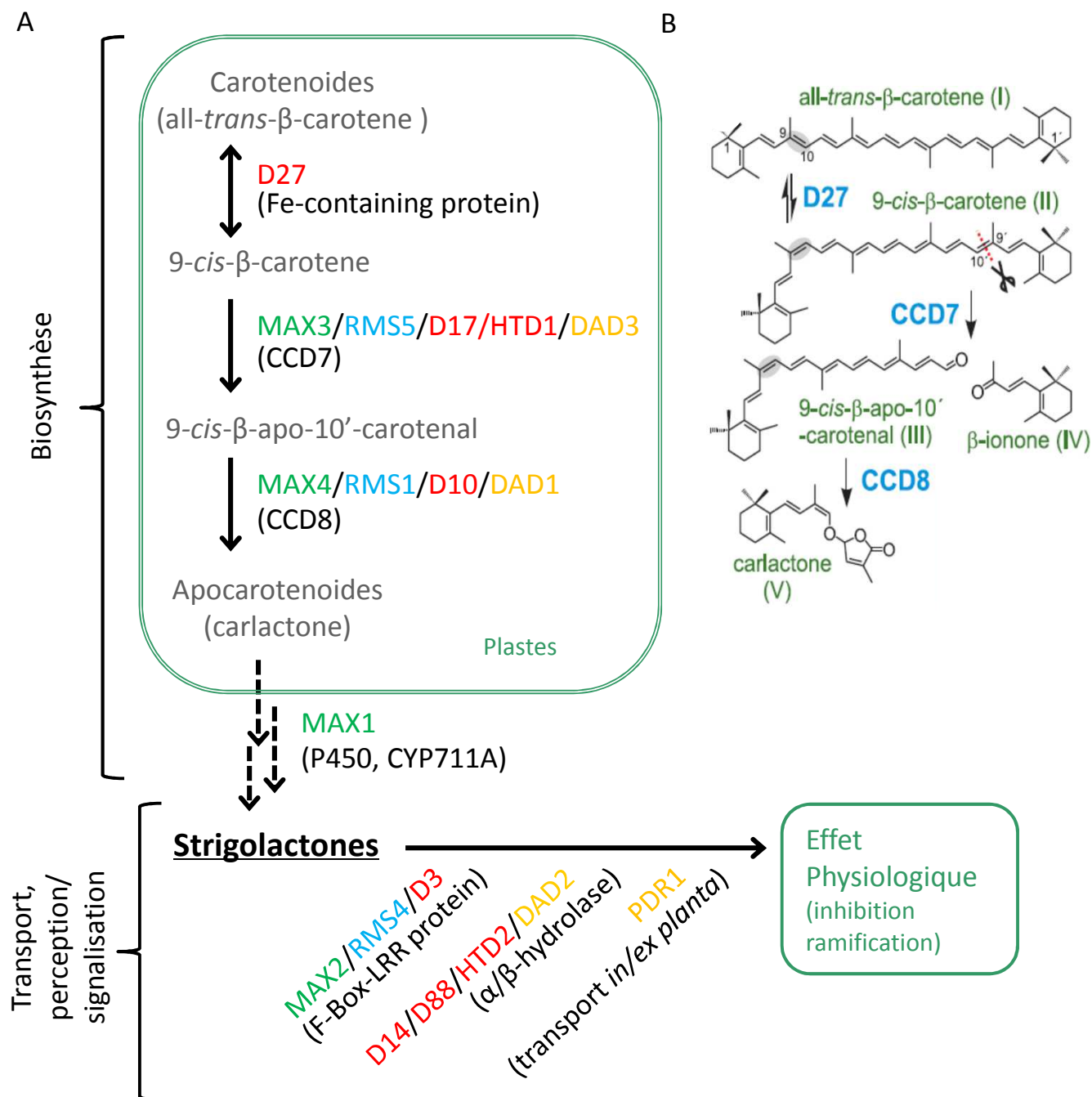


Figure 9 : Biosynthèse des strigolactones

A : voie de biosynthèse des strigolactones et modèle de perception/signalisation pour le contrôle de la ramification des parties aériennes. Le nom des gènes est écrit en couleur selon la plante où ils ont été caractérisés (**MAX** = *Arabidopsis thaliana*, **RMS** = Pois - *Pisum sativum*, **D** = Riz - *Oriza sativa*, **DAD** = Pétunia – *Petunia hybrida*), les protéines correspondantes sont indiquées en dessous en noir. (adapté d'après Umehara, 2011 ; Xie *et al.*, 2010 et Waters *et al.*, 2012)

B : détail des premières étapes de biosynthèse. D27 catalyse l'isomérisation de la double liaison C9-C10 des β-carotenes (all-*trans*-β-carotene C40; I) formant un 9-*cis*-β-carotene qui est clivé par CCD7 au niveau de la position C9'-C10' formant un 9-*cis*-β-apo-10'-carotenal (C27; III) (et une β-ionone) (C13; IV). CCD8 convertit le produit III en carlactone (V) contenant déjà le cycle D et la liaison enol/ether. (adapté d'après Alder *et al.*, 2012)

2008). Ces études ont permis de démontrer que les strigolactones contrôlent négativement la ramification des parties aériennes en inhibant le développement des bourgeons axillaires (Figure 6).

À partir de ces résultats attribuant aux strigolactones un rôle dans le contrôle hormonal de la ramification des parties aériennes, de nouveaux éléments intervenant dans la voie de biosynthèse et de signalisation des strigolactones ont été identifiés, notamment grâce à l'étude d'autres mutants hyper-ramifiés. Aujourd'hui, on retrouve dans cette voie les différents éléments suivants (Figures 9-A et 9-B) :

Une enzyme appelée Dwarf27 (D27) a été récemment caractérisée chez le riz comme étant une « iron-containing protein » intervenant dans la biosynthèse des strigolactones au niveau des plastes (*OsD27*, Lin *et al.*, 2009). Elle a été retrouvée chez *A. thaliana* et caractérisée comme une β -carotène isomerase convertissant le all-trans- β -carotène en 9-cis- β -carotène, et agissant en amont de CCD7 et CCD8 (*AtD27*, Alder *et al.*, 2012 ; Waters *et al.*, 2012).

Ensuite interviennent les enzymes CCD7 et CCD8 successivement. Les mutants correspondants à ces enzymes ont été caractérisés de façon indépendante chez de nombreuses espèces et portent des noms différents pour chacune des espèces : par exemple les mutants *ramosus* (*rms*) pour le pois *Pisum sativum* (*rms1* et *rms5*, Morris *et al.*, 2001 ; Sorefan *et al.*, 2003), *more axillary growth* (*max*) pour *A. thaliana* (*max3* et *max4*, Sorefan *et al.*, 2003 ; Jonathan Booker *et al.*, 2004), *dwarf* (*d*) ou *high-tillering dwarf* (*htd*) pour le riz *Oriza sativa* (*d10* et *d17* = *htd1*, Zou *et al.*, 2006 ; Arite *et al.*, 2007), *decreased apical dominance* (*dad*) pour le pétunia *Petunia hybrida* (*dad3* et *dad1*, Snowden *et al.*, 2005 ; Drummond *et al.*, 2009). CCD7 permet le passage d'un caroténoïde en C40 (9-cis- β -carotène) en un intermédiaire en C27 (9-cis- β -apo-10'-carotenal) qui est clivé par CCD8 en un C9 (β -apo-13-carotenone) (Schwartz *et al.*, 2004 ; Alder *et al.*, 2012). La carlactone a récemment été décrite comme le produit de synthèse de CCD8 grâce à une étude *in vitro* ; elle est capable d'inhiber l'hyper-ramification des mutants *d27*, *htd1* et *d10*, ainsi que d'induire la germination des graines de *Striga* (Alder *et al.*, 2012). Puis, plusieurs réactions ont lieu dans le cytoplasme, dont l'oxydation d'un composé mobile par une protéine à cytochrome P450 (MAX1/CYP711A1) caractérisée chez *A. thaliana* (Booker *et al.*, 2005 ; Gomez-Roldan *et al.*, 2008).

Au niveau des voies de signalisation/perception de l'hormone, les mutants *max2* chez *A. thaliana*, *rms4* chez le pois et *d3* chez le riz montrent le même phénotype hyper-ramifié que les mutants *ccd*, mais celui-ci n'est pas restauré par un ajout de GR24 (Gomez-Roldan *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*, 2008). MAX2/RMS4/D3 correspondent à une protéine à domaines F-box et LRR (Stirnberg *et al.*, 2002 ; Ishikawa *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2006). D'autres protéines à domaine F-box sont connues comme intervenant dans des réponses hormonales. Par exemple la protéine F-box TIR1 est un récepteur d'auxine (Kepinski & Leyser, 2005 ; Dharmasiri *et al.*, 2005). Ainsi, bien que cela ne soit pas encore démontré, cette protéine à domaine F-box est pressentie comme étant un récepteur potentiel des strigolactones (Waters *et al.*, 2011). Une protéine candidate est une α/β -fold hydrolase (D14 chez le riz, Arite *et al.*, 2009) : le mutant *d14* est lui aussi hyper-ramifié et un traitement exogène avec des strigolactones ne restaure pas son phénotype. Là aussi, d'autres protéines de la super famille des α/β -fold hydrolases sont capables d'interagir avec des hormones, par exemple GID1 qui est un récepteur cytoplasmique des gibbérellines (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005) ou encore SABP2, protéine se liant à l'acide salicylique (Kumar & Klessig, 2003 ; Forouhar *et al.*, 2005). Une étude tout récemment publiée chez le pétunia propose *DAD2* (orthologue de *D14*) comme un récepteur de strigolactone capable de se lier à PhMAX2a en présence de GR24 (Hamiaux *et al.*, 2012). Enfin, un transporteur de strigolactone a été découvert chez le pétunia, il s'agit de PDR1, transporteur de type ABC (ATP binding cassette) (Kretschmar *et al.*, 2012). Ce dernier est localisé dans la membrane plasmique des cellules. Il est plus exprimé en condition de carence phosphatée et de mycorhization. Le mutant *pdr1* produit des strigolactones mais est incapable de les sécréter au niveau racinaire. Il est moins mycorhizé que le sauvage.

Au niveau hormonal, de nombreuses études ont fait suite à ces travaux pour mieux comprendre le mode d'action des strigolactones et leurs interactions avec l'auxine. Deux mécanismes hypothétiques majeurs sont aujourd'hui proposés, ils sont détaillés dans la revue de Domagalska & Leyser (2011) : soit les strigolactones agiraient comme second messagers en aval de l'auxine pour inhiber le développement des bourgeons latéraux (Ferguson & Beveridge, 2009 ; Brewer *et al.*, 2009 ; Dun *et al.*, 2009), soit elles interviendraient de façon systémique en atténuant le transport d'auxine dans l'ensemble de la plante (Bennett *et al.*, 2006 ; Mouchel & Leyser, 2007 ; Ongaro & Leyser, 2008 ; Stirnberg *et al.*, 2010).

1 – 3e/ D'autres rôles hormonaux pour les strigolactones

Tout d'abord les effets de cette hormone ont été regardés sur les racines. En effet, en 2010, une étude menée chez la tomate indique qu'un traitement exogène avec des GR24 entraîne un allongement des racines latérales et des poils absorbants vraisemblablement en modifiant les flux d'auxine (Koltai *et al.*, 2010). Ensuite, une étude utilisant les mutants déficients en strigolactones d'*A. thaliana* a montré que ces derniers avaient davantage de racines latérales que le sauvage. Traités avec du GR24, ils formaient alors moins de racines latérales et avaient des poils absorbants plus longs (Kapulnik *et al.*, 2011). Ruyter-Spira *et al.* (2011) ont montré que ceci serait valable pour des conditions où le phosphate n'est pas limitant, mais qu'en condition de carence les strigolactones favoriseraient au contraire la formation des racines latérales et le développement des poils absorbants. En effet, chez *A. thaliana*, une étude indique que les strigolactones sont nécessaires pour mettre en place les réponses architecturales racinaires lors d'une carence phosphatée (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012). Ces différentes études permettent d'expliquer la diminution de biomasse observée en 2005 chez le mutant de pétunia *dad1 (ccd8)*, sans que le phénotype racinaire précis n'ait été détaillé à l'époque (Snowden *et al.*, 2005). L'ensemble des résultats ne permet pas encore d'attribuer de façon univoque un rôle pour les strigolactones dans le contrôle de l'architecture racinaire. Cependant, on peut conclure qu'elles affectent la formation des racines latérales (de façon variable selon les conditions et les espèces), et semblent exercer un effet positif sur l'élongation des poils absorbants (Figure 6).

Une étude originale basée sur l'analyse de la production de strigolactones chez les charales et les embryophytes basales a proposé que le rôle initial des strigolactones dans la lignée verte aurait pu être de favoriser la croissance des rhizoïdes (structures permettant l'ancrage dans le substrat, ayant permis la colonisation du milieu terrestre) (Delaux *et al.*, 2012).

Enfin, on découvre progressivement que les strigolactones, comme toutes les hormones, sont impliquées dans des processus développementaux nombreux et variés : elles joueraient un rôle dans la perception de la lumière chez la tomate (Mayzlish-Gati *et al.*, 2010) et la lumière influencerait leur production (Koltai *et al.*, 2011) ; elles interviendraient durant la germination chez *A. thaliana* dans des conditions bien particulières (Toh, *et al.*, 2012a, 2012b) ; chez le riz elles contrôlraient l'élongation du mésocotyle en inhibant les divisions mais pas l'élongation cellulaire durant la germination à l'obscurité (Hu *et al.*, 2010) ;

elles supprimeraient la formation de racines adventives chez *A. thaliana* et le pois (Rasmussen *et al.*, 2012) ; elles joueraient un rôle dans le contrôle du système vasculaire secondaire en stimulant l'activité cambiale (Agusti *et al.*, 2011) ; et enfin il vient d'être montré chez la tomate qu'elles affecteraient le développement des organes reproducteurs et des fruits (Kohlen *et al.*, 2012).

1 – 3f/ Régulation de la production de strigolactones

Parmi les éléments affectant la production de strigolactones, la disponibilité en nutriments et notamment le phosphate a été particulièrement étudiée. En effet il est connu depuis longtemps que l'apport d'engrais phosphatés diminue nettement l'invasion de champs cultivés par les plantes parasites, et cet effet a été relié à une moindre production d'inducteurs de germination. Récemment il a été démontré que la carence en phosphate induit la production de strigolactones chez le trèfle (Yoneyama *et al.*, 2007b), la tomate (López-Ráez *et al.*, 2008) et le riz (Umehara *et al.*, 2008). Chez le sorgho la carence en phosphate ainsi qu'en azote favorise la production et l'exsudation de strigolactones (Yoneyama *et al.*, 2007a). Le fait que les plantes produisent plus de strigolactones en condition de carence est cohérent sous plusieurs angles. En effet, non seulement la plante favorise ainsi la mise en place potentielle d'une symbiose MA, mais elle inhibe aussi la ramification des parties aériennes pour favoriser le développement des racines (davantage de racines latérales et de poils absorbants) ce qui permet un meilleur accès aux potentielles ressources nutritives du sol. De plus, une étude récente a proposé que les strigolactones jouent un rôle important dans le contrôle du tallage par le phosphate chez le riz (Umehara *et al.*, 2010). En effet, des mutants de production de strigolactones chez le riz sont incapables de répondre à la carence en phosphate par une diminution du tallage. Enfin, chez la plante non mycotrophe *A. thaliana*, l'effet du phosphate a été retrouvé, lors d'une carence phosphatée la quantité de strigolactones produites augmente et cela est corrélé avec une ramification réduite des parties aériennes (Kohlen *et al.*, 2011). Cette inhibition de la ramification des parties aériennes en condition de carence est perdue chez les plantes mutantes ne produisant plus de strigolactones (*max4*). De même, des travaux réalisés récemment chez *A. thaliana* indiquent que la mise en place des réponses à la carence phosphatée (telles que l'induction de gènes, la formation de poils absorbants et des racines latérales, la réduction de la racine primaire) passent par la production et la signalisation des

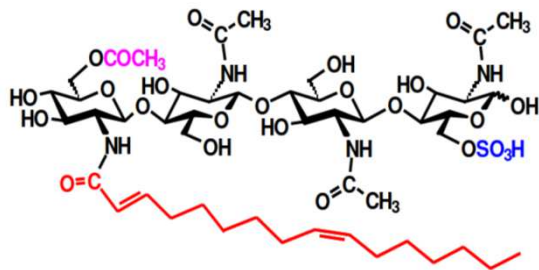
strigolactones (Mayzlish-Gati et al., 2012). Ces études montrent l'importance de cette hormone dans la réponse morphologique des plantes face à la carence (Umehara, 2011).

Un autre mécanisme régulant la production de strigolactones est la mycorhization elle-même. En effet, une étude menée chez la tomate montre que les plantes mycorhizées produisent moins de strigolactones que les plantes non inoculées (López-Ráez *et al.*, 2011), observation que nous avons aussi réalisée sur le pois (résultats non publiés). Dans cet article est discuté le fait que la moindre sécrétion des strigolactones chez les plantes mycorhizées permettrait à ces dernières de limiter leur infection par les plantes parasites, ou bien une trop forte colonisation de leurs racines par les champignons MA (hypothèse formulée par (Lauressergues *et al.*, 2012). En plus d'un mécanisme d'autorégulation de la part de la plante, on peut aussi imaginer d'après le paragraphe précédent que le champignon en jouant sur la nutrition phosphatée des plantes perturbe la synthèse des strigolactones.

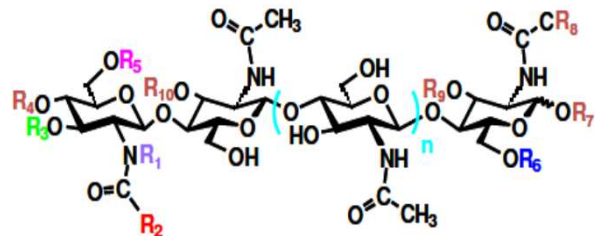
1 – 4/ Les signaux fongiques pré-symbiotiques : des facteurs Myc aux Myc-LCO

Les premières expériences montrant l'existence de signaux fongiques diffusibles (SFD) ont reposé sur l'induction de l'expression du gène ENDO11 dans les racines en présence d'un champignon MA séparé des racines par une membrane perméable (Kosuta *et al.*, 2003). De façon intéressante, cette induction est *DMI1*, *DMI2* et *DMI3* indépendante. D'autres études ont montré des modifications d'expression de gènes en réponse à des SFD, ces réponses peuvent être SYM-dépendantes ou indépendantes. Par exemple, Weidmann *et al.* en 2004 montrent que des SFD échangés avant contact induisent l'expression de gènes végétaux de façon *DMI3* dépendante. En 2010, une autre étude montre que des signaux diffusibles fongiques induisent l'expression d'un gène appelé *MtMSBP1*, et de trois autres gènes (Kuhn *et al.*, 2010). Une mutation de *DMI2* entraîne la perte d'induction de seulement 3 gènes sur 4, indiquant que la voie SYM intervient mais qu'au moins une autre voie de signalisation est impliquée dans cette réponse. De même, l'utilisation d'exsudats de spores en germination induit l'expression de gènes symbiotiques chez le riz, mais l'induction d'un de ces gènes est maintenue dans différents mutants de la voie SYM testés, mettant là-aussi en avant l'existence d'une autre voie de signalisation en plus de la voie SYM (Mukherjee & Ané, 2011).

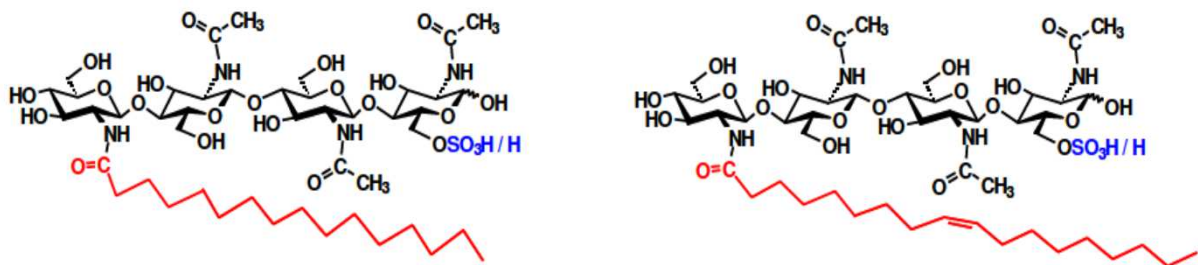
A Facteurs Nod (*Sinorhizobium meliloti*)



B LCO générique



C Myc-LCOs (*R. irregularis*)



D Hexamère de CO

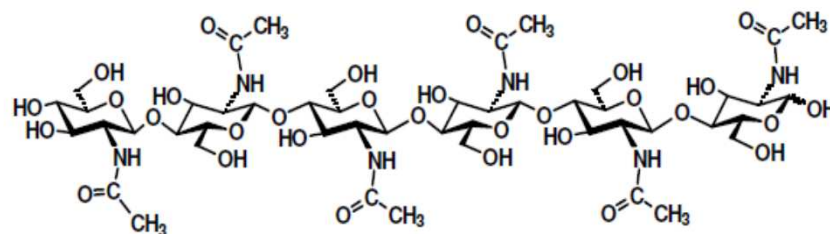


Figure 10 : Structures des CO (chitooligosaccharides) et LCO (lipo-chitooligosaccharides) produits par les microorganismes symbiotiques (d'après Gough & Cullimore, 2011).

A : facteur Nod produit par la souche *Sinorhizobium meliloti* NodSm-IV(C16:2Δ2EΔ9Z, Ac, S)

B : une molécule générique des LCO montrant les différents sites (de R1 à R10) pouvant accueillir des substitutions. n est généralement égal à 1 ou 2, formant des tétramères ou des pentamères.

C : structures des Myc-LCOs sulfatés et non sulfatés produits par *R. irregularis* = Myc-LCO-IV (C16:0, +/-S) et Myc-LCO-IV (C18:1Δ9Z, +/-S)

D : structure d'un hexamère de CO montrant l'orientation alternative des résidus de GlcNAc (N-acetyl-D-glucosamine) reliés entre eux par des liaisons β1-4.

L'existence de SFD a été aussi montrée à travers l'étude des réponses calciques dans les cellules végétales. En effet, des résultats montrent que des signaux fongiques sont capables d'induire des réponses calciques cytosoliques (Navazio *et al.*, 2007 ; Kosuta *et al.*, 2008). De plus, des oscillations calciques nucléaires sont induites par des exsudats de spores en germination de façon comparable à celles trouvées sous des hyphopodes ; ces oscillations sont *DMI1* et *DMI2* dépendantes (Chabaud *et al.*, 2011).

Enfin, la formation de racines latérales en réponse à des SFD a été observée plusieurs fois. En 2005, Oláh *et al.* montrent que des SFD induisent la ramification des racines de façon *DMI1* et *DMI2* dépendante mais *NFP* et *DMI3* indépendante. Par ailleurs, l'infection par *R. irregularis* stimule la formation de racines latérales chez le riz, mais cette fois de façon indépendante de la voie SYM (Gutjahr *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces résultats représentent des arguments génétiques (intervention de gènes de la voie SYM, cf partie 1 – 2e/), physiologiques (ramification des racines, réponses calciques cytosoliques et nucléaires) et moléculaires (expression de gènes) montrant l'existence de signaux diffusibles fongiques. Ces derniers, par analogie avec les signaux rhizobiens appelés Facteurs Nod, ont été appelés Facteurs Myc (FMyc). Les FMyc sont donc des molécules signal produites par les champignons MA qui sont essentielles pour la reconnaissance du partenaire symbiotique fongique par les racines hôtes et induisent des réponses spécifiques de la symbiose dans ces dernières (Catoira *et al.*, 2000 ; Parniske, 2008).

D'autres arguments faisant intervenir des aspects d'évolution ont permis d'orienter les recherches pour découvrir la nature des molécules composant ces FMyc. En effet, la symbiose mycorhizienne date d'environ 450 Ma (Remy *et al.*, 1994) alors que la symbiose nodulaire est plus récente puisque datant d'environ 60 Ma (Sprent, 2007). Les FNod (LCO) ont une structure basée sur un squelette chitinique alors que la chitine est un élément typiquement fongique (Figure 10). L'hypothèse qui en découle est que la voie de signalisation aurait à l'origine été dédiée à la symbiose mycorhizienne et qu'elle aurait ensuite été recrutée (détournée) et adaptée pour l'association entre les bactéries rhizobiennes et les légumineuses. Les FNod produits par les bactéries dériveraient alors d'un signal similaire initialement fongique (FNod-like) (Kosuta *et al.*, 2003 ; Oláh *et al.*, 2005 ; Parniske, 2008 ; Maillet *et al.*, 2011). De plus, actuellement la seule voie de signalisation caractérisée comme intervenant dans la symbiose mycorhizienne est la voie SYM commune

à la nodulation, et pour laquelle des outils génétiques sont disponibles. Dans ce contexte et grâce à l'utilisation des outils génétiques disponibles (mutants de la voie SYM), une approche *a priori* a été entreprise pour rechercher des molécules de type LCO dans des exsudats de champignons mycorhiziens à arbuscules.

C'est en 2011 que Maillet *et al.* ont montré que le champignon mycorhizien *R. irregularis* sécrète en faible quantité un mélange de LCO appelés Myc-LCO. Ces LCO sont composés de 4 ou 5 résidus de N-acetylglucosamine, peuvent être sulfatés (S) ou non (NS) sur le sucre réducteur, ce dernier portant un acide gras en C16:0 (acide palmitique) ou C18:1 (acide oléique) saturé ou non (Figure 10). Les LCO (S et NS en mélange) stimulent la mycorhization de *M. truncatula*, mais aussi de plantes non légumineuses comme *Tagetes patula* ou des « hairy-roots » de carotte (*Daucus carota*). Ils induisent l'expression de gènes marqueurs symbiotiques (de façon *DMI3*-dépendante) et favorisent la ramification des racines comme en présence du champignon (ou après traitement avec les FNod) de façon dépendante de la voie SYM.

Parmi l'ensemble des réponses aux signaux fongiques diffusibles détaillées ici, toutes ne dépendent pas de la voie SYM, suggérant l'existence de voies de signalisation alternatives et/ou de signaux fongiques diffusibles additionnels (en plus des Myc-LCO) qui pourraient induire justement des voies différentes (Bonfante & Requena, 2011).

1 – 5/ La régulation de la symbiose

Comme tout processus de développement végétal, la symbiose est régulée par différents facteurs.

1 – 5a/ L'importance des signaux végétaux

Parmi les éléments régulant la mise en place de la symbiose, un accent fort est placé sur les étapes pré-symbiotiques durant lesquelles les deux partenaires doivent signaler leur présence et se reconnaître pour laisser place ou non à l'interaction. Le rôle des signaux diffusibles végétaux a donc rapidement été mis en avant pour leur capacité à favoriser ou non le développement des champignons MA. Les composés candidats ayant un effet positif sur le champignon incluent les strigolactones, des flavonoïdes et des polyamines (cf partie 1

– 3a/). Certains flavonoïdes ont un effet négatif sur le champignon, mais globalement peu d'études se sont portées sur la recherche de composés diffusibles végétaux ayant un rôle inhibiteur sur l'interaction. Pour réguler la mycorhization de leurs racines, les plantes peuvent donc jouer sur la production et la diffusion ou non de composés stimulant ou inhibant le développement des champignons MA. Une telle régulation au niveau pré-symbiotique n'exclut pas l'existence d'autres signaux régulateurs des phases plus tardives de l'interaction dont l'existence et l'identification sont plus difficiles à établir.

1 – 5b/ Autorégulation et régulation systémique

Les plantes sont capables de réguler la mycorhization par un phénomène dit d'autorégulation afin de limiter une colonisation excessive de leurs racines. Des expériences de split-root (plantes dont le système racinaire est séparé en deux, chaque partie pouvant subir des traitements différents) montrent qu'une colonisation préalable d'un côté du système racinaire limite l'infection du second côté des racines lors d'une inoculation ultérieure (Vierheilig *et al.*, 2000a, 2000b). Ainsi il existe des mécanismes de régulation systémique contrôlant la mise en place de la symbiose. Les mécanismes effecteurs de cette autorégulation ne sont pas connus. Le phénomène est d'autant plus fort que la mycorhization est déjà bien installée (Vierheilig, 2004a) et il semble indépendant de la meilleure nutrition phosphatée dont pourraient bénéficier les plantes du fait de leur mycorhization préalable (Vierheilig *et al.*, 2000b). Cette régulation pourrait faire intervenir des signaux diffusibles inhibiteurs produits pour limiter une autre colonisation (Vierheilig *et al.*, 2003), ou encore des signaux diffusibles activateurs (comme certains flavonoïdes) qui ne seraient plus produits si un côté du système racinaire est mycorhizé (Catford *et al.*, 2006). De façon intéressante, cette régulation systémique concerne aussi la symbiose rhizobienne. Des racines de luzerne préalablement mycorhizées inhibent de façon systémique la formation ultérieure de nodules et réciproquement, des racines déjà nodulées ou traitées avec des Facteurs Nod répriment la mycorhization (Catford *et al.*, 2003). L'éthylène est connue pour réguler négativement la nodulation à travers l'étude du mutant hyper-nodulant *sickle* qui est affecté dans la perception de l'éthylène (Penmetsa & Cook, 1997 ; Penmetsa *et al.*, 2003). Cette hormone affecte aussi la mycorhization (Geil *et al.*, 2001 ; Geil & Guinel, 2002) mais cette hypothèse n'a pas été clairement démontrée. Par ailleurs, les mécanismes d'autorégulation de la nodulation sont mieux décryptés grâce à de nombreux mutants

arborant un phénotype hyper-nodulant. Ces derniers mettent en évidence une signalisation *CLAVATA*-like faisant intervenir deux signalisations systémiques : un signal partant des racines vers les feuilles (un petit peptide CLE-like est pressenti) et un signal régulateur feuilles-racines de nature non identifiée (mis en revue par Kouchi *et al.*, 2010).

1 – 5c/ Le phosphate, élément régulateur de la symbiose

Il est bien connu que la mycorhization est affectée négativement par la présence de phosphate en abondance dans le milieu (Mosse, 1973 ; Menge *et al.*, 1978 ; Thomson *et al.*, 1986, 1991 ; Braunberger *et al.*, 1991 ; Javot *et al.*, 2007a ; Branscheid *et al.*, 2010 ; Breuillin *et al.*, 2010). Selon le mode d'apport du phosphate (concentration, fréquence...) et l'association plante-champignon l'effet n'est pas toujours aussi important. Cette inhibition peut s'expliquer par le coût en carbone que représente l'interaction pour la plante. De manière simplifiée et finaliste, on peut imaginer que si le phosphate du milieu est disponible directement pour la plante, alors celle-ci n'a pas besoin du champignon pour le recueillir et donc limite l'interaction avec ce dernier afin de conserver ses photosynthétats. Aujourd'hui les mécanismes par lesquels les plantes contrôlent la colonisation des leurs racines selon leurs besoins nutritionnels en phosphate ne sont pas élucidés.

La disponibilité en phosphate affecte la production de signaux végétaux diffusibles connus pour influencer le développement du champignon en général (commenté dans la revue : Vierheilig, 2004). Cependant, dans la plupart des cas les auteurs ne sont pas allés jusqu'à l'identification des signaux impliqués et leurs contributions dans la régulation de la symbiose par le phosphate n'ont pas été testées fonctionnellement. Quelques travaux représentent des exceptions. Tout d'abord des études réalisées chez le trèfle ont permis d'identifier deux isoflavonoïdes (la biochanine A et la formononetine) présents dans les exsudats de trèfle cultivés en condition de carence phosphatée (Nair *et al.*, 1991). Ces 2 molécules ont un effet positif sur la ramification de champignon MA et la mycorhization. Les travaux d'Akiyama *et al.*, (2002) ont montré qu'un C-glycosylflavonoïde s'accumule dans les racines de melon en condition de carence phosphatée, et que l'ajout de ce composé permet de restaurer une mycorhization normale en condition non carencée, ceci à un temps tardif de mycorhization (45 jours). Du fait que chaque espèce de plante produit un mélange différent de flavonoïdes, les résultats de l'étude sur le melon sont difficiles à extrapoler chez d'autres espèces et l'importance de ces molécules est difficile à démontrer. Les

strigolactones, comme détaillé précédemment, sont elles aussi des signaux diffusibles importants dans la phase prés-symbiotique et voient leur production affectée par le phosphate. Cette corrélation place les strigolactones comme molécules candidates intéressantes en tant que médiatrices de l'effet du phosphate.

De façon remarquable, des mutants affectés dans la récupération du phosphate apporté par le champignon au niveau des arbuscules (plantes mutées au niveau du transporteur de phosphate *MtPT4* exprimé uniquement au niveau des arbuscules lors de la mycorhization) montrent une dégénérescence prématurée des arbuscules (Javot *et al.*, 2007a). L'efficacité du transfert du phosphate symbiotique dans les cellules végétales est donc critique pour le maintien de l'interaction. Il est proposé que l'efficacité du transfert du phosphate du champignon vers la plante soit un moyen pour la plante de s'assurer que le microorganisme accueilli est bien un symbiote efficace. Récemment, une étude réalisée avec des plantes de *M. truncatula* mycorhizées par différentes souches de champignons MA ayant des « niveaux de coopération » (qualité symbiotique mesurée chez la plante en terme d'effet sur la croissance et du coup en carbone par unité de phosphate récupéré) plus ou moins efficaces envers cette plante hôte (Kiers *et al.*, 2011). Ils ont suivi les flux de carbone de la plante vers les champignons et ont pu montrer que ce flux était plus important vers le champignon le plus coopératif. Ce processus a aussi lieu dans l'autre sens, puisque le champignon lui aussi fournit plus de phosphate aux racines lui apportant le plus de carbone. Ainsi chacun des partenaires semble capable de mesurer ce que lui apporte l'autre, et les auteurs proposent que l'ajustement des échanges entre les deux partenaires soit un moyen permettant aux partenaires d'assurer une interaction stable (Kiers *et al.*, 2011).

1 – 5d/ Régulation systémique de la symbiose par le phosphate

La régulation de la mycorhization par le phosphate peut aussi faire intervenir une signalisation systémique. Des expériences de split-root (ici l'intérêt est de pouvoir fertiliser différemment chacun des deux côtés du système racinaire) ont permis de montrer que la régulation par le phosphate de la mycorhization pouvait être système. En effet, chez des plantes dont une moitié seulement du système racinaire est dans un environnement carencé en Pi et l'autre non, la mycorhization est inhibée dans le compartiment pauvre en phosphate, signe qu'un signal provenant du côté non carencé est capable d'inhiber la mise en place de la symbiose du côté carencé (exemples : De Miranda *et al.*, 1989 ; Thomson *et*

al., 1991 ; Rausch *et al.*, 2001). Il se peut que les mécanismes impliqués soient les mêmes que ceux de l'autorégulation ou des autres réponses systémiques à la carence (en dehors de la symbiose) (voir partie 2 – 2c/).

Récemment une étude menée chez *M. truncatula* a évalué l'implication d'un microARN, le *miR399*, dans la régulation de la mycorhization (Branscheid *et al.*, 2010). Ce *miR399* est un élément de signalisation systémique régulant positivement les réponses à la carence phosphatée. Son action est bien caractérisé notamment chez *A. thaliana* (voir partie suivante 2 – 1/) (Doerner, 2008). Branscheid *et al.*, ont testé l'hypothèse selon laquelle le micro-ARN *miR399* pourrait réguler la mycorhization en tant que signal systémique induit par la carence en phosphate. De façon intéressante, l'expression du *miR399* est modifiée lors de la colonisation racinaire, mais la surexpression du *miR399* n'est pas capable d'augmenter la mycorhization en condition HighP (Branscheid *et al.*, 2010). Les signaux systémiques internes nécessaires au contrôle de la mycorhization par le phosphate sont donc à ce jour toujours inconnus.

Les mécanismes intervenant dans les processus d'autorégulation de l'interaction, de régulation négative par le phosphate sont sûrement interconnectés (voir identiques). De même, certains éléments (par exemple les signaux systémiques) impliqués dans la régulation par le phosphate de l'interaction sont potentiellement impliqués plus généralement dans le contrôle des autres réponses mises en place par les plantes lors d'une carence phosphatée. Nous allons d'ailleurs détailler dans la partie suivante comment les plantes régulent leur nutrition phosphatée (signalisation et réponses mises en place) et la place de la mycorhization dans cette régulation.

2/ Le maintien de l'homéostasie du phosphate

Chez tous les organismes vivants le phosphore (P) joue un rôle central. Il sert à la fabrication des acides nucléiques et des membranes (phospholipides). Il joue un rôle essentiel dans la réserve et le transfert d'énergie, les régulations métaboliques et l'activation des protéines (cascades de phosphorylation). Il n'est donc pas surprenant que la disponibilité en phosphate ait un effet important sur le développement des végétaux. La forme assimilable par les plantes est le phosphate inorganique (Pi , PO_4^{3-}). Après l'azote, il

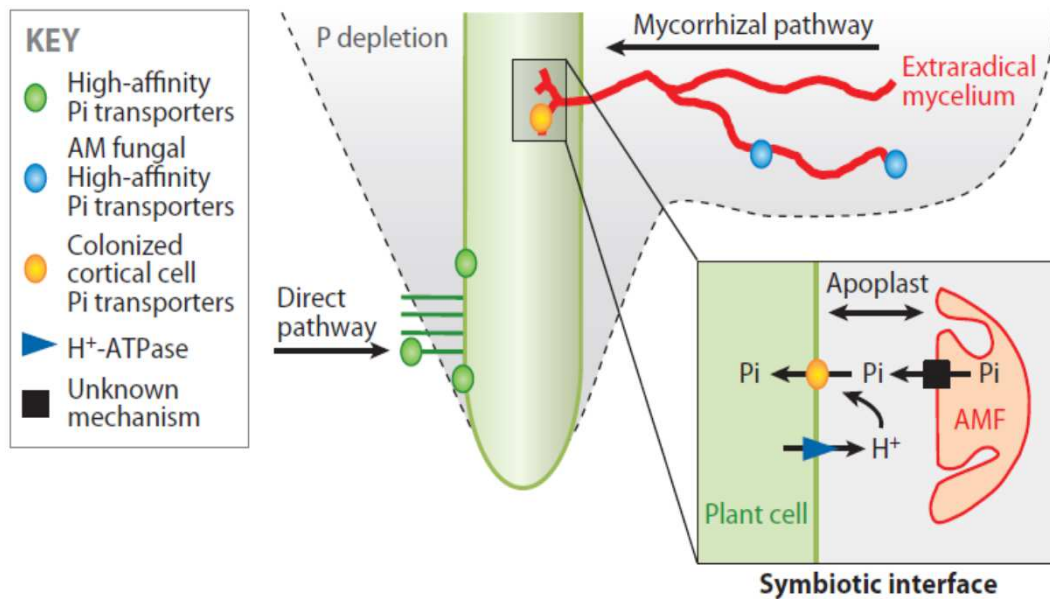


Figure 11 : Les différentes voies d'acquisition du Pi chez les plantes mycorrhizées (Smith & Smith, 2011).

La voie directe (DP, direct pathway) repose sur des transporteurs haute affinité situés sur les poils absorbants et dans la zone épidermique proche de l'apex. Cette voie entraîne la formation d'une zone appauvrie en Pi autour de la racine.

La voie symbiotique (MP, mycorrhizal pathway) fait intervenir le mycélium extraracinaire qui capte le Pi présent dans le sol grâce à des transporteurs haute affinité. Le Pi est ensuite transporté à travers les hyphes du champignon sous forme de polyphosphates et est transféré aux racines au niveau des arbuscules grâce à des transporteurs de Pi végétaux spécifiquement exprimés au niveau de la membrane péri-arbusculaire (Des H⁺ ATPases sont aussi impliquées dans le processus de transfert de Pi). Ce système à deux voies (DP et MP) est aussi valable pour l'azote. En échange le champignon récupère des sucres.

représente le second macroélément le plus limitant dans le développement végétal, bien que le phosphore soit en général abondamment présent dans les sols. En effet, le phosphore (P) se trouve essentiellement sous des formes insolubles (il forme des complexes organiques avec des cations comme l'aluminium ou le fer), ainsi 20 à 80 % du P des sols seraient inutilisables (Schachtman *et al.*, 1998). De plus cet élément est très peu mobile et les racines épuisent très rapidement le stock de P_i présent dans leur environnement immédiat (Figure 11). C'est pourquoi aujourd'hui les engrais phosphatés sont apportés en grande quantité aux cultures pour faire face à ce manque en phosphate disponible. Cependant, cette fertilisation est relativement peu efficace puisqu'il est estimé que seulement 15 à 30 % des apports réalisés sont absorbés par les plantes (Cordell *et al.*, 2009). Cela est d'autant plus regrettable quand on sait que l'utilisation d'engrais phosphatés est bien souvent à l'origine de problèmes de pollution graves tel que l'eutrophisation des rivières et des nappes phréatiques où s'accumule le phosphate lessivé des sols. Enfin, le plus important est que ce phosphore apporté dans les engrais est issu de ressources minérales naturelles limitées, plaçant notre système de fertilisation et de production végétale actuels sous la dépendance de ressources fragiles. En effet, les réserves diminuent d'autant plus rapidement que les demandes mondiales en phosphate augmentent constamment. Un pic de production est attendu autour de 2030-2050, moment à partir duquel on estime que la production ne pourrait que diminuer (Gilbert, 2009). Les scientifiques parlent aujourd'hui de « crise du phosphore », crise malheureusement encore invisible pour la majorité des citoyens mais bien connue des agriculteurs et des biologistes du domaine végétal qui étudient de près les voies de régulation et les multiples mécanismes de réponse mis en place chez les plantes pour faire face aux conditions de carence phosphatée. Aujourd'hui ces processus commencent à être bien décryptés. Ils représentent des voies potentielles d'amélioration des conditions de culture des plantes, limitant l'utilisation d'intrants phosphatés. Dans cette partie, nous détaillerons donc l'état des connaissances sur la signalisation et les réponses mises en place par les végétaux pour maintenir leur homéostasie en P_i .

2 – 1/ La voie de signalisation impliquant miR399, PHO2 et IPS1/At4

Comment les plantes perçoivent-elles qu'elles sont carencées en phosphate (teneurs internes) ou que l'environnement est pauvre en phosphate (teneurs externes)? Comment

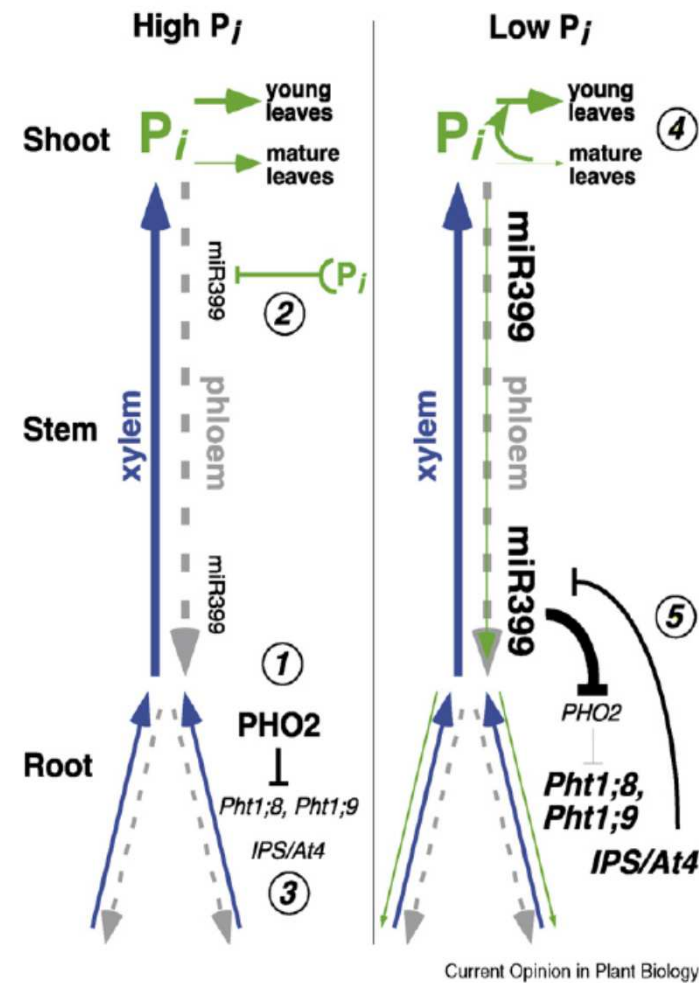


Figure 12 : Schéma de la régulation systémique impliquant *PHO2*, *mir399*, *IPS/At4* chez *Arabidopsis thaliana* (Doerner, 2008).

En condition de P suffisant, *PHO2* est présent et actif au niveau racinaire (1), il en résulte une faible expression de ses cibles telles que les transporteurs de phosphate *Pht1;8* et *Pht1;9*. L'expression du *miR399* (2) et de *IPS/At4* (3) est faible.

Quand les plantes au niveau des parties aériennes perçoivent la carence, l'expression du *miR399* est fortement induite dans les feuilles (4), le *miR399* mature est transporté via le phloème vers les racines. Sur place, il se lie sur le transcrite correspondant à *PHO2* et le système de dégradation du complexe dégrade *PHO2*. L'inhibition est levée concernant les cibles de *PHO2* *Pht1;8* et *Pht1;9* permettant ainsi de recueillir du Pi.

Parallèlement, l'expression des ARNs non codants *IPS/At4* est induite (5), ces riborégulateurs inhibent l'action du *miR399* sur *PHO2* par un système de fausse cible (target mimicry) permettant ainsi d'ajuster les quantités de *PHO2* présentes et de réguler rapidement les réponses selon les besoins en Pi.

arrivent-elles à intégrer l'ensemble de ces informations pour coordonner la mise en place de réponses efficaces? De nombreuses études menées principalement chez *A. thaliana* ont permis d'apporter des réponses à ces questions. La voie de signalisation systémique impliquant les microARNs *miR399(a-f)* et leur cible *PHO2* est particulièrement bien décrite (Doerner, 2008) (Figure 12).

Un des éléments de cette voie est *PHO2* (pour *Phosphate2*). En effet, le mutant *pho2* accumule beaucoup plus de phosphate dans les parties aériennes que le sauvage lorsqu'il est dans des conditions non carencées (Delhaize & Randall, 1995). *PHO2* code pour une ubiquitine E2 conjugase-related (UBC24) qui régule négativement l'expression de gènes impliqués dans la réponse à la carence tels que *Pht1;8* et *Pht1;9*. *PHO2* est exprimé dans les tissus vasculaires des parties aériennes et racinaires, mais il agit au niveau racinaire où il est la cible du *miR399* (Bari *et al.*, 2006 ; Aung *et al.*, 2006). Le *miR399* est exprimé dans les tissus vasculaires et son expression est induite en condition de carence, et par conséquent celle de *PHO2* est inversement régulée (Fujii *et al.*, 2005 ; Chiou *et al.*, 2006 ; Chiou, 2007). Il a été démontré que le *miR399* est un élément permettant une régulation systémique des réponses à la carence : produit dans les feuilles il est transporté via le phloème vers les racines pour réguler négativement *PHO2* (Pant *et al.*, 2008).

L'expression du *miR399* est positivement régulée lors de la carence par le facteur de transcription *PHR1* (phosphate starvation response 1). Très bien caractérisé chez *A. thaliana*, *PHR1* est un facteur de transcription de type MYB. Avec *PHR1-Like1* (*PHL1*) ils régulent une grande partie des réponses à la carence en se liant aux promoteurs de leurs gènes cibles sur un motif consensus appelé P1BS présent dans les promoteurs de gènes induits lors des réponses à la carence (Rubio *et al.*, 2001 ; Bustos *et al.*, 2010). L'expression de *PHR1* est peu affectée par la disponibilité en phosphate, en revanche l'activité de la protéine *PHR1* est régulée au niveau post-transcriptionnel par sumoylation (Miura *et al.*, 2005).

Par ailleurs, des ARN non codants induits lors de la carence ont été identifiés chez différentes espèces : *TPS1* chez la tomate (Liu *et al.*, 1997), *Mt4* chez *M. truncatula* (Burleigh & Harrison, 1997, 1999), et *IPS* (induced by Pi starvation) et *At4* chez *A. thaliana* (Shin *et al.*, 2006). Une séquence de 23bp bien conservée chez ces ARNs est complémentaire du *miR399* sauf pour 2 à 3 bases centrales au niveau du site de clivage de l'ARN cible (Shin *et al.*, 2006 ; Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Ainsi le *miR399* peut se fixer à *IPS/At4* mais ne peut pas le cliver car ils ne sont pas tout à fait complémentaires. Le *miR399* se retrouve séquestré par *IPS/At4*

et ne peut pas réguler son transcrit cible *PHO2*. Ce système tout à fait original de régulation via une fausse cible a été découvert grâce à l'étude de la voie de régulation *miR399* et a été appelé « target mimicry » (ou imitation de cible) (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Il permettrait d'ajuster rapidement la quantité de protéines Pho2 présentes, régulant ainsi finement la mise en place des réponses.

Bien caractérisés chez *A. thaliana*, l'ensemble ou une partie des éléments de cette voie ont aussi été retrouvés chez différentes espèces dont le riz (Bari *et al.*, 2006), le haricot (Valdés-López *et al.*, 2008) ou encore récemment *M. truncatula* (Branscheid *et al.*, 2010), montrant la conservation et l'importance de cette voie dans les processus de réponse à la carence phosphatée chez les plantes.

2 – 2/ Les réponses effectrices face à la carence phosphatée

Pour faire face à la carence en phosphate, les plantes peuvent mettre en place plusieurs mécanismes de réponses adaptatives visant notamment à optimiser et mobiliser les ressources internes en Pi et à améliorer l'accès et le prélèvement des ressources externes en Pi.

2 – 2a/ Une meilleure utilisation du Pi interne

Tout d'abord, la carence phosphatée affecte rapidement les voies métaboliques du carbone. Elle favorise des voies alternatives telles que la glycolyse cytosolique et modifie le transport mitochondrial des électrons permettant le maintien de la respiration malgré le manque de Pi (Theodorou & Plaxton, 1993).

Ensuite, pour faire face à la carence le Pi interne est mobilisé et recyclé. Le Pi des feuilles anciennes (ou sénescentes) est relocalisé dans les nouvelles feuilles ou les racines. Les plantes carencées récupèrent aussi le Pi présent au niveau de la membrane plasmique sous forme de phospholipides, ces derniers étant remplacés par des sulfolipides amphipatiques et des galactolipides. Enfin, les stocks de Pi accumulés dans les vacuoles sont recrutés. Dans le cas où le Pi cytoplasmique viendrait à manquer, l'activité des thylakoïdes peut être affectée (inhibition de l'activité ATP synthase), inhibant le cycle de Calvin (activité réduite de la RuBisCo) réduisant ainsi l'assimilation du carbone et la photosynthèse (mis en revue par : Plaxton & Tran, 2011).

2 – 2b/ Une meilleure acquisition du Pi externe

L'amélioration de la nutrition phosphatée passe aussi par une meilleure acquisition du Pi externe. Pour cela plusieurs mécanismes sont possibles. Tout d'abord, une adaptation morphologique avec une réorganisation du système racinaire. La plante augmente la taille de son système racinaire et peut explorer un volume de sol plus vaste. Cela se passe le plus souvent au détriment du développement des parties aériennes mais dans le but final d'augmenter l'aptitude de la plante à faire face à la carence. Généralement le phénotype observé lors de carence phosphatée est donc une augmentation du ratio « parties racinaires/parties aériennes ».

Une telle modification du système racinaire passe tout d'abord par un contrôle de la croissance de la racine primaire et le développement des racines latérales. La carence phosphatée inhibe en effet la croissance de la racine primaire (Williamson *et al.*, 2001 ; Linkohr *et al.*, 2002). Ce phénomène implique que la perception de la teneur locale en phosphate se fasse au niveau de l'apex de la racine primaire (Svistoonoff *et al.*, 2007). Il suffit que l'apex de la racine primaire soit au contact d'une zone carencée en phosphate pour que la racine cesse de croître. Les gènes *LPR1* et *LPR2* (low phosphate root1 et 2) codant des multicopper oxidases sont impliqués dans ce processus (les mutants *lpr1* et *lpr2* ne répondent plus aussi fortement par un arrêt de croissance de la racine primaire lorsque celle-ci rencontre un milieu pauvre en phosphate). Un autre mutant *pdr2* (phosphate deficiency response 2) montre un phénotype de racine exagérément courte en condition de carence lié à la concentration locale en phosphate (phénotype inverse de celui des mutants *lpr1* et *lpr2*) (Ticconi *et al.*, 2004, 2009). Il est proposé que *LPR1/LPR2/PDR2* soient exprimés au niveau du méristème pour réguler ce dernier en fonction des teneurs externes en phosphate (Svistoonoff *et al.*, 2007 ; Ticconi *et al.*, 2009).

Le développement des racines latérales est lui favorisé lors de la carence (Williamson *et al.*, 2001), et des hormones telles que l'auxine et l'éthylène sont impliquées dans cette réponse. Comme mentionné plus haut, les strigolactones contribuent aussi à cette modulation de l'architecture racinaire.

Les poils absorbants sont aussi très importants dans la récupération du Pi externe puisque c'est à leur surface que sont présents les transporteurs de phosphate. La carence stimule la formation et l'élongation des poils absorbants, et l'étude de mutants a montré

l'importance des poils absorbants dans l'acquisition de Pi lors de la carence (Bates & Lynch, 2000 ; Ma *et al.*, 2001). De nouveau les strigolactones pourraient intervenir ici compte tenu de leur fonction hormonale sur l'élongation des poils absorbants.

Enfin de façon plus limitée, chez certaines espèces de plantes comme le lupin (*Lupinus* spp), des racines spécifiques, protéoïdes (ou cluster roots), sont mises en place lors de carences. Elles sont formées de groupes de racines très denses et courtes portant de nombreux poils absorbants, et sont spécialisées dans l'exsudation en grande quantité d'enzymes et d'acides organiques (jusqu'à 23 % des ressources carbonées) qui vont acidifier le sol et chélater les ions métalliques afin de mobiliser le phosphate et d'autres éléments (Abdolzadeh *et al.*, 2010). De façon intéressante, des études montrent que les espèces formant des racines en cluster sont principalement des plantes non mycorhiziennes poussant sur des sols très anciens pauvres en phosphate comme ceux présents en Australie ou encore en Afrique du Sud (Lambers *et al.*, 2006 ; 2008). Ces études indiquent qu'en fonction de la nature des sols, les stratégies de récupération du phosphate sélectionnées par les plantes peuvent varier (symbiose ou cluster-root), et que pour un sol donné une stratégie en particulier sera plus efficace (Lambers *et al.*, 2008).

En effet, un autre moyen d'améliorer l'acquisition du Pi externe passe par la solubilisation du Pi indisponible du sol. Lors de la carence, le système racinaire favorise la sécrétion d'acides organiques et d'enzymes (hydrolases, phosphatases, RNases...) qui libèrent le Pi chélaté à des molécules inorganiques ou organiques. Les acides maliques et citriques sont les plus couramment rencontrés (Raghothama, 1999).

Enfin, l'optimisation de l'import du Pi externe peut permettre aux plantes de limiter la carence. Au niveau des poils absorbants et de la zone épidermique proche de l'apex, des transporteurs de phosphate à haute affinité sont exprimés afin d'absorber le moindre Pi environnemental disponible (Raghothama, 1999). Les transporteurs de phosphate *Pht1* (9 membres à ce jour) sont les plus connus, ils appartiennent à la famille des PHS (Pi:H⁺ symporter) eux-mêmes membres de la MFS (major facilitator superfamily) (Poirier & Bucher, 2002). Pour répondre efficacement à la carence, l'expression des transporteurs est rapidement induite et les transporteurs de phosphate sont effectivement mis en place en 24h. Lorsque le phosphate est à nouveau disponible l'expression de ces gènes diminue progressivement. Le phosphate est acheminé des racines vers les parties aériennes à travers

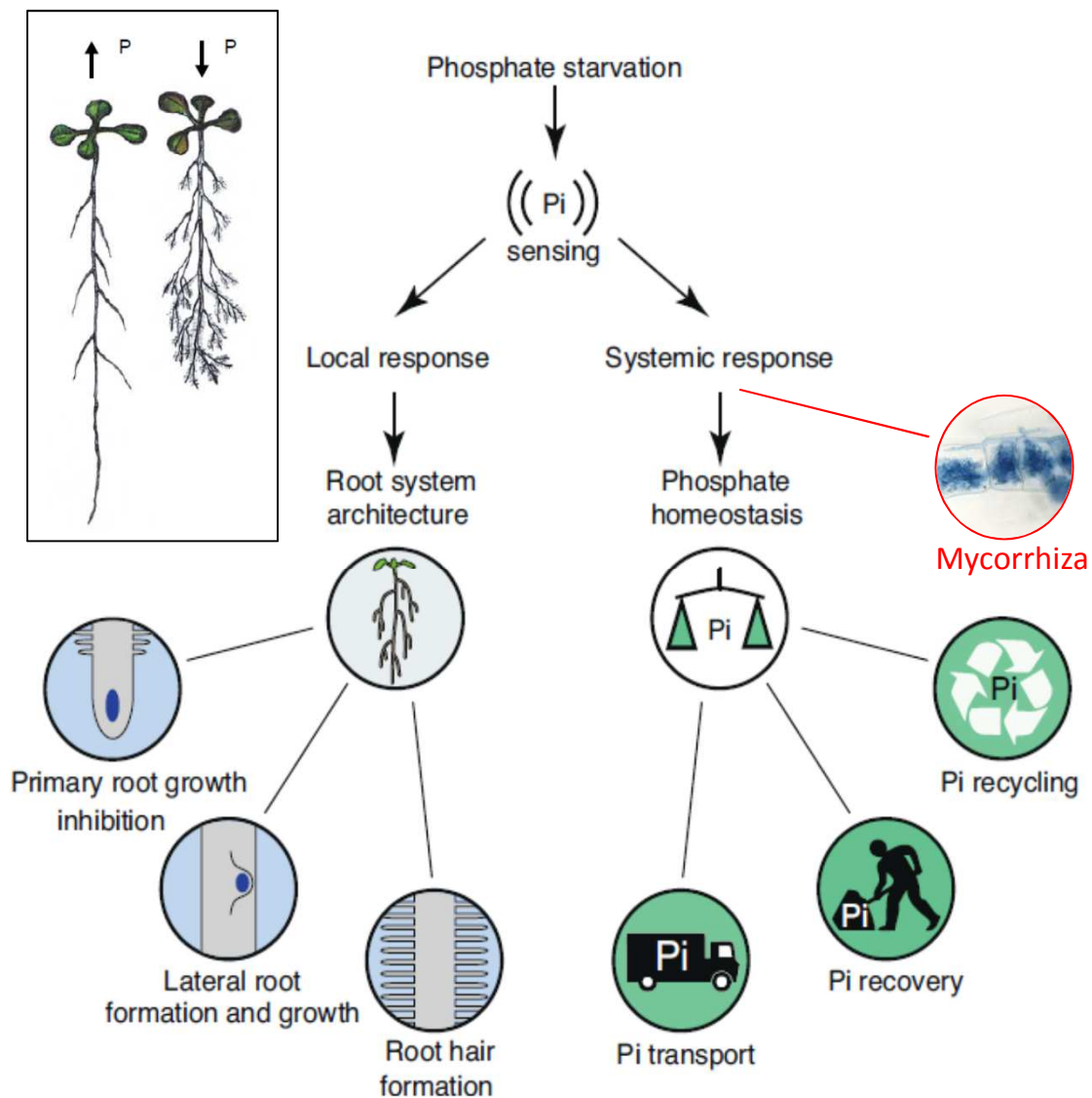


Figure 13 : Réponses locales et systémiques à la carence en phosphate chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Péret et al., 2011) et réponse mycorhizienne.

- La perception de la carence phosphatée (Pi) par *Arabidopsis* déclenche un ensemble de réponses adaptatives qui peuvent être regroupées en deux groupes : les réponses locales (liées à la perception des teneurs locales en phosphate) et les réponses systémiques (réponses à longue distance).

Les réponses locales correspondent principalement aux modifications architecturales racinaires. L'encart schématise les réponses morphologiques racinaires obtenues chez *Arabidopsis thaliana* en fonction des conditions phosphatées (López-Bucio et al. 2003).

Les réponses systémiques comprennent un transport élevé du Pi à travers l'expression de transporteurs haute-affinité, une intense récupération du Pi par la sécrétion notamment de phosphatases, et un recyclage du Pi interne par le catabolisme des phospholipides.

Remarque : chez les plantes mycotrophes, la mycorhization est un processus appartenant aux réponses systémiques (rajouté en rouge sur la figure).

le xylème. *PHO1* a été caractérisé chez *A. thaliana* comme étant un transporteur membranaire spécifique du Pi vers le xylème, les mutants *pho1* n'arrivant pas à transférer le Pi dans le xylème vers les parties aériennes (Poirier *et al.*, 1991 ; Hamburger *et al.*, 2002).

2 – 2c/ Réponses systémiques et réponses locales

Les plantes doivent intégrer des signaux indiquant les teneurs en phosphate dans le milieu extérieur ainsi que des signaux liés à la perception des teneurs en phosphate internes dans la plante, afin de gérer au mieux l'ensemble des réponses adaptatives qui doivent être mises en place. Une partie des réponses à la carence sont mises en place localement, d'autres sont régulées de façon systémique. Une étude transcriptomique menée sur des plantes en split-root a récemment permis de séparer en deux groupes les multiples réponses à la carence (Thibaud *et al.*, 2010) (Figure 13). Globalement les réponses développementales racinaires (contrôle de la croissance racine principale, formation des racines latérales et des poils absorbants) sont régulées localement, alors que les réponses liées à la gestion du phosphate (transport du phosphate, recyclage...) sont régulées de façon systémique. Des interconnexions entre les deux voies existent certainement (Péret *et al.*, 2011).

La majorité des études portant sur la nutrition phosphatée sont réalisées sur la plante modèle *A. thaliana* qui n'est malheureusement pas une plante mycotrophe. Pourtant un autre moyen largement utilisé par les plantes pour faire face à la carence phosphatée est la mise en place de symbioses entre les racines des plantes et des microorganismes du sol comme les champignons MA. L'importance de la symbiose MA comme réponse à la carence est abordée dans la partie suivante, on peut cependant déjà noter qu'elle fait partie des réponses régulées au niveau systémique (élément rajouté dans la Figure 13).

Cependant, quels sont les mécanismes (locaux/systémiques) qui permettent de signaler la carence ? Le Pi lui-même peut être considéré comme un des signaux. En effet, si des plantes placées en condition de carence sont traitées avec du phosphite ou phosphonate (Phi), un analogue non métabolisable du Pi, alors une bonne partie des réponses induites par la carence sont atténuées. Le Phi mime ici la suffisance nutritionnelle indiquant que le Pi est donc capable d'agir au moins comme un signal initial (Danova-Alt *et al.*, 2008). Par contre, bien que le Pi puisse être le signal initial d'une partie des réponses, il ne semble pas être le signal systémique régulant les réponses à longue distance : la réduction du flux en Pi dans la

plante n'a pas d'effet sur la mise en place des réponses contrôlées de façon systémique (Thibaud *et al.*, 2010). De plus, l'étude de l'expression de *Mt4* chez les plantes de *M. truncatula* en split-root permet d'aboutir à la même conclusion (Burleigh & Harrison, 1999). L'ensemble de ces résultats laissent une faible place au Pi comme signal interne et suggèrent qu'un autre signal doit exister.

Les sucres semblent jouer un rôle de molécule signal au niveau systémique. En effet, une carence en phosphate entraîne une accumulation de sucres et d'amidon dans les feuilles (Hammond & White, 2008). Le transport des sucres contenus dans les feuilles via le phloème vers les racines en développement précède et participe à la mise en place d'une partie des réponses à la carence. Une inhibition de la synthèse ou du transport du sucre diminue les réponses à la carence et inversement un apport en sucre augmente l'expression de gènes induits lors de la carence phosphatée (pour revue : Hammond & White, 2008). Des mutants *pho3* d'*A. thaliana* caractérisés pour une diminution de l'activité phosphatase lors de la carence, se sont avérés mutés dans un transporteur de sucre (SUC2) impliqué dans le chargement du sucre dans le phloème (Lloyd & Zakhleniuk, 2004). Pour mieux situer les sucres dans cette régulation, d'autres études sont nécessaires pour déterminer plus précisément dans quelle chronologie sont mises en place les modifications métaboliques, les transports en sucre et les réponses à la carence.

Comme discuté précédemment les microARN sont aussi des éléments mobiles régulés par le phosphate. Outre la famille *miR399* qui régule systématiquement les réponses à la carence phosphatée, d'autres microARN sont régulés par le phosphate chez *A. thaliana*. Plusieurs études de séquençage ou de microarray chez différentes espèces indiquent qu'un grand nombre de petit ARN sont différentiellement exprimés en fonction de la disponibilité en phosphate (Pant *et al.*, 2009 ; Hsieh *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2010 ; Valdés-López *et al.*, 2010 ; Lundmark *et al.*, 2010). Certains comme *miR156* (induit lors de la carence en phosphate), *miR169*, *miR395* et *miR398* (tous trois inhibés par la carence) sont retrouvés chez plusieurs espèces. Certains d'entre eux sont connus pour être impliqués dans la réponse à d'autres carences (*miR395* : le soufre, *miR398* : le cuivre et *miR169* : l'azote). Enfin une étude menée chez la tomate recense les petits ARN différentiellement exprimés en fonction des conditions +/- mycorhization et +/- phosphate (Gu *et al.*, 2010). L'ensemble de ces petits ARN représentent autant de pistes à explorer.

2 – 3/ La symbiose MA, élément de réponse à la carence

80 % des espèces de plantes terrestres sont capables de mettre en place la symbiose MA lors d'une carence phosphatée. Dans leur environnement naturel, les racines des plantes mycotrophes sont habituellement en interaction symbiotique avec un champignon MA, et ceci peut être relié avec le fait que le phosphate est généralement limitant. Cette symbiose qui date de l'apparition des plantes terrestres pourrait donc être considérée comme un mécanisme non seulement général mais aussi très ancien naturellement mis en place pour faire face aux carences hydrique mais aussi phosphatée.

2 – 3a/ Effets de la symbiose MA sur le développement des plantes

L'amélioration de la nutrition phosphatée est le principal avantage de la mycorhization (Bucher, 2007 ; Javot *et al.*, 2007b). En fonction de l'association plante-champignon, l'interaction peut conduire à une augmentation des teneurs en phosphate dans les tissus et/ou favoriser la production de biomasse (Grunwald *et al.*, 2009). Des systèmes utilisant un compartiment contenant du phosphate radiomarqué accessible uniquement au champignon ont permis de démontrer l'efficacité du transfert de Pi entre le champignon et la plante (Jakobsen *et al.*, 1992 ; Pearson & Jakobsen, 1993 ; Smith *et al.*, 2003, 2004). Ces expériences ont permis de montrer chez la plante quelle était la contribution du champignon dans l'acquisition du Pi. Selon la plante et le champignon utilisés l'apport provenant du champignon peut même aller jusqu'à la totalité du Pi prélevé (Smith *et al.*, 2003, 2004).

La mycorhization a également un effet sur le développement racinaire (Price *et al.*, 1989 ; Yano *et al.*, 1996 ; Paszkowski & Boller, 2002 ; Gamalero *et al.*, 2004 ; Oláh *et al.*, 2005 ; Gutjahr *et al.*, 2009). Chez *M. truncatula*, la perception de signaux diffusibles fongiques induit la formation de racines latérales (Oláh *et al.*, 2005 ; Maillet *et al.*, 2011). D'après des observations *in vitro*, chez *M. truncatula* les jeunes racines latérales sont les sites préférentiels d'interaction avec le champignon MA (Chabaud *et al.*, 2002) et chez le riz, *R. irregularis* favorise la formation de LLRs (Large lateral roots) qui sont aussi les zones privilégiées d'infection. Il semble donc qu'en présence d'un champignon MA l'architecture racinaire des plantes est modifiée et présente davantage de racines latérales, connues pour être plus facilement colonisées. Cependant ces racines latérales sont aussi importantes pour favoriser (en interaction ou non avec un champignon MA) l'acquisition du phosphate.

2 – 3b/ L'acquisition du phosphate par la voie symbiotique

Autour des racines et des poils absorbants, une zone appauvrie en phosphate se crée car le phosphate étant très peu mobile, une fois absorbé par les racines, il met du temps à être remplacé. Les champignons MA permettent d'augmenter le volume de sol exploré et de dépasser cette zone d'appauvrissement grâce à leur mycélium extra-racinaire composé d'hyphes très fins et bien plus longs que les poils absorbants (environ 100 fois plus) (Javot *et al.*, 2007b). Les plantes mycorrhizées possèdent donc deux voies pour récupérer du phosphate dans l'environnement, la voie directe et la voie symbiotique (Figure 11-A). Les champignons MA sont capables de dégrader des molécules organiques du sol pour libérer du Pi et possèdent des transporteurs de Pi à haute affinité (Harrison & Van Buuren, 1995 ; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001) leur permettant ainsi de récupérer efficacement du phosphate dans l'environnement. Le phosphate prélevé est alors accumulé dans les vacuoles où il est rapidement (3h) transformé en polyphosphates (Ezawa *et al.*, 2002, 2004). Il peut alors être transporté à travers les hyphes non septés du champignon jusqu'à l'intérieur des racines où les polyphosphates sont hydrolysés. Les phosphates libérés sont alors transmis aux plantes sous forme de Pi au niveau des arbuscules (mis en revue par Javot *et al.*, 2007b) (Figure 11-B).

Certains transporteurs de phosphate de la famille *PHT1* sont inhibés durant la mycorhization (exemple : *MtPT1*, Liu *et al.*, 1998), mais un petit nombre sont au contraire plus fortement exprimés et certains spécifiquement au niveau de la membrane péri-arbusculaire. Chez *M. truncatula* le transporteur *MtPT4* est exprimé spécifiquement lors de la mycorhization et une fusion du promoteur de *MtPT4* avec le gène rapporteur GUS démontre que *MtPT4* n'est exprimé qu'au niveau des arbuscules (Harrison *et al.*, 2002). Chez d'autres espèces comme le riz, la tomate ou la pomme de terre, des transporteurs de phosphate exprimés uniquement lors de la mycorhization ou spécifiquement au niveau des arbuscule ont également été décrits (Rausch *et al.*, 2001 ; Paszkowski *et al.*, 2002 ; Nagy *et al.*, 2005). Chez la pomme de terre une étude intéressante indique qu'un composé appelé lyso-phosphatidylcholine (LPC) est accumulé dans les racines mycorhizées et est capable d'induire l'expression de transporteurs de phosphate normalement exprimés uniquement en condition de symbiose (Drissner *et al.*, 2007). Cependant l'origine (fongique ou végétale) des

LPC n'est pas déterminée et l'existence et l'effet de ces molécules chez d'autres espèces de plantes n'a pas été établi.

Des transporteurs spécifiques sont aussi mis en place pour le transport de l'azote comme chez le lotier *LjAMT2;2* (Guether *et al.*, 2009b). Des H⁺-ATPases sont aussi présentes au niveau des membranes végétales qui entourent les arbuscules et le champignon pour répondre aux besoins énergétiques et générer les gradient électrochimiques nécessaires aux transports à travers les membranes plasmiques (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991, 2000 ; Krajinski *et al.*, 2002 ; Rosewarne *et al.*, 2007). Enfin des éléments carbonés sont aussi échangés entre les deux partenaires mais cette fois de la plante vers le champignon. Une famille de transporteurs de sucres chez les végétaux appelés SWEET (17 membres chez *A. thaliana*) a été découverte récemment (Chen *et al.*, 2010). De façon intéressante, les auteurs ont montré chez le riz que des bactéries pathogènes sont capables d'exploiter les transporteurs SWEET à leur avantage. De plus, chez *M. truncatula* un transporteur SWEET appelé MtN3 est spécifiquement induit lors de la nodulation et serait ainsi impliqué dans la nutrition des bactéries en symbiose au niveau des nodules. Le rôle de ces transporteurs dans la mycorhization reste à démontrer. Toujours chez *M. truncatula*, le transporteur d'hexose MtMst1 est surexprimé en condition de mycorhization (Harrison, 1996). Dernièrement, une étude originale utilisant un système de silencing appelé « host-induced gene silencing » a permis de découvrir un transporteur d'hexose GiMST2 chez le champignon mycorhizien *Rhizophagus irregularis*, ce dernier s'est avéré nécessaire pour une mycorhization normale, suggérant un rôle important de GiMST2 dans la nutrition en sucre du champignon (Helber *et al.*, 2011). De manière générale, le transport des sucres vers le champignon symbiotique reste encore peu connu mais son étude prend de l'importance notamment dans la but de mieux comprendre les raisons de la biotrophie du champignon (Doidy *et al.*, 2012). Enfin, le champignon peut accumuler de façon importante du phosphate (entre autres) dans ses spores et son réseau mycélien extraracinaire lorsque la plante lui fournit peu d'éléments carbonés (Hammer *et al.*, 2011). Inversement, comme indiqué précédemment chez *M. truncatula*, une plante ne pouvant pas prélever le phosphate apporté par le champignon semble limiter le développement de l'interaction (mutant *pt4* montrant des arbuscules avortant) (Javot *et al.*, 2007a). Cependant, il a ensuite été montré que la moindre mycorhization de ce mutant *pt4* n'est pas liée à une absence de nutrition carbonée du champignon de la part de la plante (Javot *et al.*, 2011). De plus, une carence azotée en plus

d'une carence phosphatée permet de restaurer une mycorhization normale du mutant *pt4* (Javot *et al.*, 2011). Ainsi, il apparaît que chaque symbiote étudie ce que l'autre lui donne, ces échanges sont autant de points de contrôle potentiels pour les deux partenaires afin de vérifier le bon fonctionnement de l'interaction.

La symbiose MA fait donc partie des éléments de réponse couramment mis en place par les plantes face à la carence phosphatée. Cependant, un grand nombre d'études sur la carence phosphatée sont menées chez *A. thaliana* non mycotrophe et la symbiose mycorhizienne est encore mal caractérisée. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux décrypter la régulation de cette interaction par le phosphate et mieux intégrer cette réponse parmi les autres réponses végétales mises en place lors de la carence.

3/ Questions et objectifs adressés à travers ce projet de thèse

Bien que l'effet inhibiteur du phosphate sur la mise en place de la symbiose MA soit rapporté depuis longtemps, les mécanismes régulateur et les signaux systémiques impliqués dans ce processus restent très mal connus. Dans notre étude, l'utilisation du phosphate en tant qu'élément régulateur de la symbiose mycorhizienne représente une façon « détournée » de découvrir des éléments de régulation potentiellement plus généraux de cette interaction (pas seulement mis en place pour la régulation par le phosphate). De même, les processus de régulation que nous étudions pourraient se révéler être impliqués dans le contrôle de réponses plus globales mises en place par les plantes pour contrôler leur nutrition phosphatée.

Dans un premier temps nous avons mis en place des conditions expérimentales permettant d'aborder plusieurs questions telles que :

- à quel stade de l'interaction la mycorhization est-elle bloquée par le phosphate ?
- l'inhibition de la mycorhization peut-elle être liée à un effet direct du phosphate sur le champignon ?
- la régulation se produit-elle à un niveau local ou systémique ?

De plus, au début du projet, les strigolactones représentaient un mécanisme régulateur potentiel évident (leur production est régulée par le phosphate, elles jouent un rôle important dans la phase pré-symbiotique en induisant l'activité métabolique du champignon). Nous avons donc cherché à savoir quel(s) rôle(s) les strigolactones pouvaient avoir dans la régulation par le phosphate de la mise en place de l'interaction. De façon plus générale, nous nous sommes intéressés au(x) rôle(s) des signaux végétaux diffusibles potentiellement impliqués dans cette régulation. Toutes ces questions seront abordées dans le premier chapitre de cette thèse.

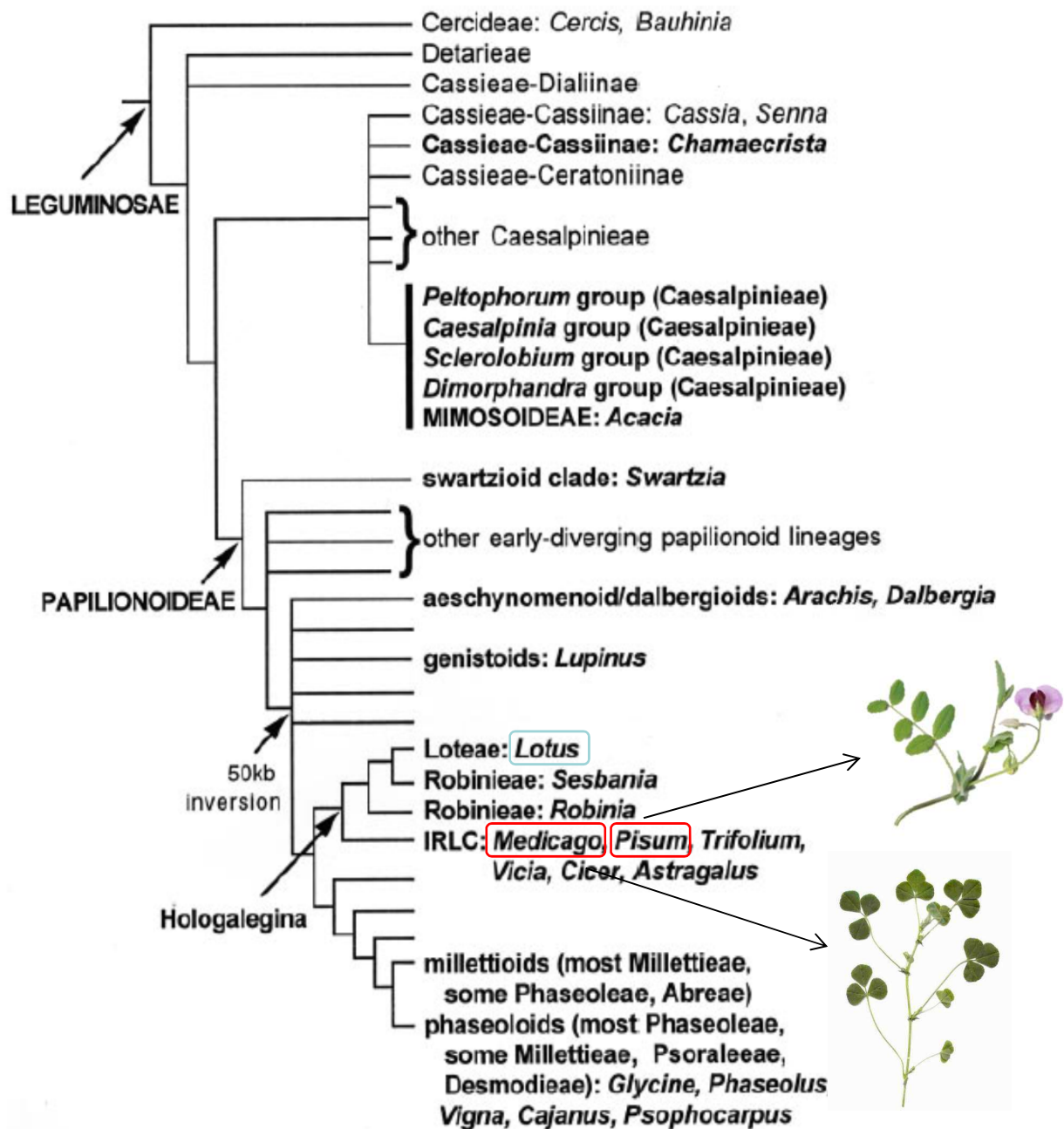


Figure 14 : Relations phylogéniques chez les légumineuses (*Fabaceae*) (Doyle & Luka 2003).

Les lignées majeures sont indiquées le long des branches de l'arbre par des flèches. Les genres comprenant des espèces modèles sont indiqués. Les taxons en caractères gras sont dominés par des espèces nodulées. Les espèces de légumineuses d'intérêt pour étudier la symbiose MA sont *Medicago truncatula*, le pois (*Pisum sativum*) entourés en rouge, et d'autres équipes travaillent aussi sur le lotier (*Lotus japonicus*, en bleu).

CHAPITRE I/ Contrôle de la mycorhization par le phosphate, une régulation systémique et précoce

1/ Présentation

Pour commencer notre étude, nous avons mis au point un symbiosystème et des conditions de culture permettant d'observer de façon nette et reproductible la régulation négative de la mycorhization par le phosphate. Le chapitre I/ présente les phénotypes mycorhiziens obtenus dans nos conditions expérimentales et l'étude des signaux diffusibles végétaux (en particulier des strigolactones).

Sont présentées ici des données ayant fait l'objet d'une publication (Balzergue *et al.*, 2011) (Annexe 1) ainsi que les résultats d'expériences complémentaires. L'ensemble est commenté et discuté au fur et à mesure et nous permet de proposer finalement des hypothèses qui seront en partie abordées dans le chapitre II.

1 – 1/ Choix des organismes

1 – 1a/ Le matériel végétal

La plupart des espèces végétales, à l'exception entre-autres des *Brassicaceae*, comprenant notamment l'espèce modèle *A. thaliana*, sont capables d'entrer en symbiose avec les champignons AM. Notre choix s'est porté sur deux plantes de la famille des légumineuses, le pois et *M. truncatula* (Figure 14). En effet ces plantes réalisent, en plus de la symbiose mycorhizienne, une autre endosymbiose racinaire avec des bactéries fixatrices d'azote. Ceci pouvant nous permettre plus tard de croiser nos résultats avec ceux obtenus sur la régulation de cette autre symbiose. D'autre part, la symbiose mycorhizienne étant plus difficile à étudier que la symbiose nodulaire, la plupart des mutants *myc*⁻ disponibles ont été au départ isolés comme mutants *nod*⁻, ce sont donc des légumineuses.

Le pois (*Pisum sativum* L.)

Les biologistes retiennent du pois son utilisation par Johann Gregor Mendel au XIX^{ème} siècle lors de l'établissement des premières lois à la base de la génétique moderne. Encore aujourd'hui, il sert de modèle pour certaines études concernant le développement, et notamment pour l'analyse du contrôle génétique de l'architecture aérienne. Plus près de

notre travail, pour les raisons évoquées ci-dessus on retrouve des mutants de pois parmi les premiers mutants de mycorhization caractérisés (Duc *et al.*, 1989 ; Harrison, 2005).

De plus, des plantes de pois en interaction avec le champignon *R. irregularis* ont déjà été utilisées par l'équipe pour démontrer l'importance des strigolactones dans la symbiose MA (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). Les conditions d'inoculation et de mycorhization étaient donc déjà établies pour l'étude de ces mutants et les strigolactones produites par cette espèce étaient par ailleurs déjà caractérisées (Yoneyama *et al.*, 2008 ; Xie *et al.*, 2009) et nous étions capables dans l'équipe de détecter leur présence en spectrométrie de masse (Gomez-Roldan *et al.*, 2008).

Bien que le pois soit une plante d'intérêt agronomique certain (graines riches en amidon et en protéines, espèce utilisée en rotation des cultures...), il possède quelques inconvénients en tant qu'outil de recherche. On peut surtout noter sa transformation génétique difficile et son génome de grande taille (estimée à 4×10^9 paires de bases) riche en séquences répétées (Ellis & Poyser, 2002). Pour traiter certaines questions (plutôt dans la seconde partie du projet) nous avons donc utilisé comme autre plante modèle *M. truncatula*.

Medicago truncatula

Tout comme le pois, *M. truncatula* (proche cousine de la luzerne cultivée *Medicago sativa*) appartient à la famille des légumineuses et possède donc les mêmes avantages pour l'étude des deux symbioses racinaires. Avec *Lotus japonicus*, elle est utilisée comme plante modèle chez les légumineuses (Barker *et al.*, 1990) et son « petit » génome d'environ 450 million de paires de bases vient d'être séquencé (Young *et al.*, 2011). De nombreux mutants affectés dans l'une ou l'autre des deux symbioses sont aujourd'hui décrits chez cette espèce (revues : Parniske, 2008 ; Singh & Parniske, 2012). Plusieurs analyses d'expression de gènes chez *M. truncatula* en conditions de symbioses ont aussi été réalisées, apportant des gènes candidats marqueurs de ces interactions (ex : Hohnjec *et al.*, 2005 ; Siciliano *et al.*, 2007 ; Gomez *et al.*, 2009...). Les outils disponibles chez cette plante (mutants, génomes, transformation...) représentent des atouts supplémentaires notamment pour les approches plus moléculaires. La proximité avec plusieurs équipes du Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes (LIPM) travaillant avec ce modèle sous différents angles nous a également encouragés à utiliser cette plante.

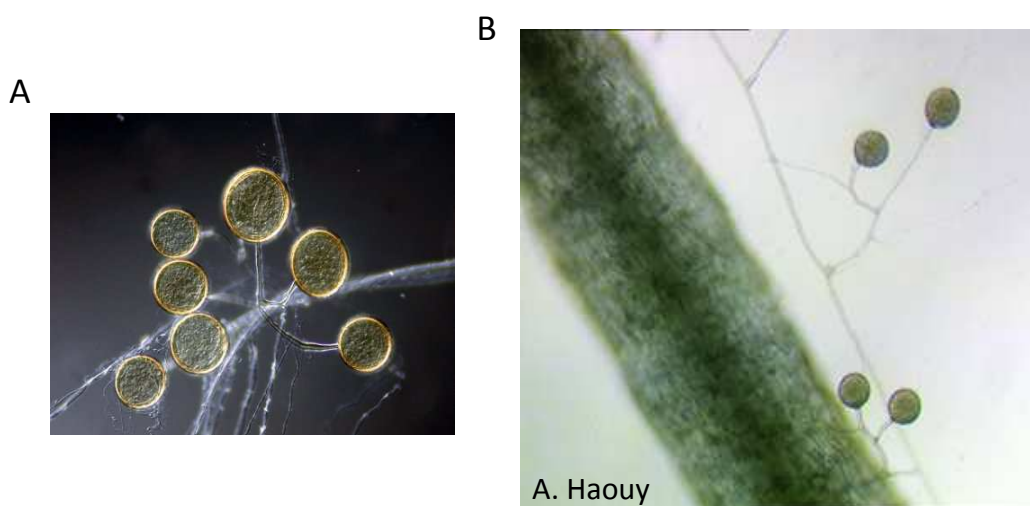


Figure 15 : *Rizophagus irregularis* et *Gigaspora rosea*.
Spores et hyphes de *R. irregularis* seul (A),
ou proche d'une racine hôte en boîte de Petri (B).

1 – 1b/ Le matériel fongique

Pour cette partie du projet, nous avons utilisé principalement deux champignons MA, *Rizophaqus irregularis* et *Gigaspora rosea* (Figure 15).

Rizophaqus irregularis est le champignon modèle couramment utilisé dans l'étude de la symbiose MA (classification voir Introduction, Figure 2). En effet, c'est un champignon présent dans des écosystèmes variés, qui colonise une large gamme de plantes hôtes (Smith & Read, 2008) et que nous sommes capables de cultiver *in vitro* sur racines transformées (Chabot *et al.*, 1992). Plusieurs études au niveau génomique sont en cours sur ce champignon, et notre équipe participe à certains de ces projets. Si le séquençage et l'annotation du génome de ce champignon s'avèrent difficiles et ne sont pas encore terminés (Martin *et al.*, 2008), son transcriptome a été analysé dans différentes conditions et de très nombreuses EST sont aujourd'hui disponibles (Tisserant *et al.*, 2012). Pour notre étude, le principal avantage de ce champignon est qu'il est produit stérilement et en quantité relativement abondante par une entreprise proche du laboratoire (Agronutrition, Labège). Des spores de qualité de *R. irregularis* sont donc « facilement » disponibles.

Gigaspora rosea quant à lui est phylogénétiquement distant de *R. irregularis* (classification voir Introduction, Figure 2). Cela en fait un champignon intéressant notamment pour valider et généraliser des résultats obtenus avec *R. irregularis*. De plus, ce champignon a pour avantage de produire des spores et des hyphes relativement gros qui permettent de suivre plus aisément la germination, la ramification et le développement en boîte de Petri par exemple. En revanche, sa production est plus difficile : il est aujourd'hui maintenu en culture avec des plants de poireaux dans notre équipe. Pour réaliser nos expériences, il faut donc récolter, trier et stériliser les spores (voir partie Matériels & Méthodes).

Type d'inoculum : dans les expériences de mycorhization, le champignon AM peut être apporté sous forme de spores, de plantes voisines déjà mycorhizées ou de fragments de racines mycorhizées contenant différents types de propagules. Concernant *R. irregularis*, ces deux derniers modes d'inoculation sont considérés comme plus virulents comparés aux spores seules, ce qui peut conduire à masquer des différences : par exemple, le mutant de tomate *pmi1* montre un phénotype mycorhizien très sévère lorsqu'il est inoculé avec des spores, mais il est colonisé normalement lorsqu'il est inoculé par une plante voisine mycorhizée (David-schwartz *et al.*, 2001). De plus, les spores représentent un inoculum que

l'on peut apporter de façon plus reproductible. Pour l'ensemble de ces raisons, durant le projet de thèse, toutes les plantes ont été inoculées directement avec des spores (voir partie Matériels & Méthodes).

1 – 2/ Conditions de fertilisation phosphatée

Pour évaluer l'effet du phosphate sur la mycorhization, des plantes de pois inoculées par des spores de *R. irregularis* ou de *G. rosea* ont été fertilisées avec de la solution d'arrosage Long Ashton Nutrient Solution (LANS) (Hewitt, 1966) diluée au demi et contenant plus ou moins de phosphate. La condition ayant la plus forte teneur en phosphate est appelée HighP (ou HP). Elle correspond en fait à une solution d'arrosage LANS ½ sans modification pour le phosphate ($750 \mu\text{M NaH}_2\text{PO}_4$) ; les conditions correspondant à $75 \mu\text{M}$ et $7,5 \mu\text{M}$ sont respectivement appelées MediumP (ou MP) et LowP (ou LP). Ainsi, la condition HighP représente une fertilisation normale et non excessive en phosphate, et la condition LowP correspond à une carence phosphatée. Les plantes ont été arrosées quotidiennement avec ces solutions nutritives pendant toute la durée de la culture.

2/ Phosphate, mycorhization et régulation systémique

2 – 1/ Phénotype mycorhizien des plantes cultivées en HighP

2 – 1a/ Effet de la fertilisation sur la biomasse

Des plantes inoculées avec des spores de *R. irregularis* ont été arrosées avec des solutions LowP, MediumP ou HighP. Au moment de la récolte (6 semaines), la biomasse des plantes a été mesurée (Figure 16-A). La fertilisation phosphatée affecte la croissance des plantes, se traduisant par la production d'une biomasse maximale en condition HighP, et un ratio partie aérienne/partie racinaire qui augmente avec la concentration en phosphate : en condition de carence phosphatée, les plantes favorisent le développement racinaire au détriment des parties aériennes, résultats allant dans le sens des phénotypes observés généralement chez les plantes carencées en phosphate (cf introduction générale).

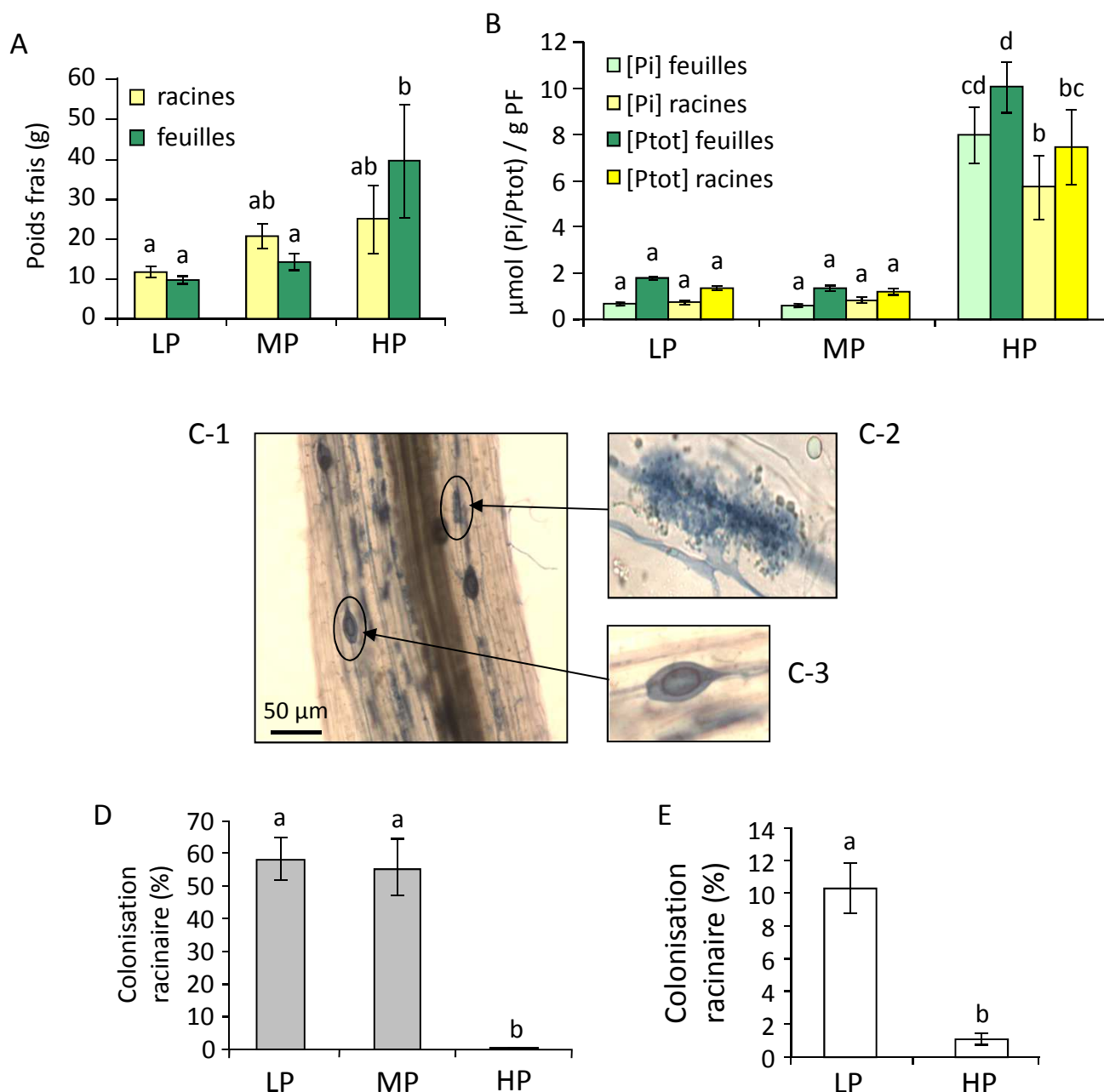


Figure 16 : Effet du phosphate sur la production de biomasse, la mycorrhization et les teneurs racinaires ou foliaires en phosphate.

Les plantes ont été fertilisées avec une solution LP (7,5 μM), MP (75 μM) ou HP (750 μM).

A : biomasse des parties aériennes et racinaires au moment de la récolte.

B : teneurs en phosphate inorganique (Pi) ou en phosphore total (Ptot) dans les feuilles et les racines.

C : observations microscopiques de structures symbiotiques. Une racine est considérée comme mycorhizée (C-1) lorsqu'elle présente des arbuscules (C-2) et/ou des vésicules (C-3).

D : colonisation des racines par *R. irregularis*. Les plantes ont été inoculées avec 600 spores/pot de *R. irregularis* et cultivées 6 semaines.

E : colonisation des racines par *G. rosea*. Les plantes ont été inoculées avec 100 spores/pot de *G. rosea* et cultivées 7 semaines.

Les barres d'erreur représentent l'erreur type (SEM). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre échantillons selon le t-test de Student ($p < 0,05$). Les résultats présentés en A, B et C correspondent aux mêmes plantes; $n = 5-6$ plantes par condition. D, $n = 7-8$ plantes par condition.

2 – 1b/ Effet de la fertilisation sur les teneurs internes en P

Afin de pouvoir dire si le phénotype mycorhizien obtenu est plutôt relié aux teneurs en phosphate disponible dans le sol ou dans la plante, nous avons dosé les teneurs en phosphate inorganique (Pi) et phosphore total (P_{tot}) dans les parties aériennes et racinaires (Figure 16-B). Nous discuterons uniquement les résultats obtenus avec le dosage du Pi, ceux obtenus avec le dosage du P_{tot} étant semblables. Quel que soit le tissu analysé, la concentration en Pi est faible et similaire dans les conditions LowP et MediumP, alors que le Pi accumulé en HighP est beaucoup plus important. En comparant ces résultats avec les résultats de biomasse représentés en Figure 16-A on peut noter qu'en condition HighP, non seulement la plante se développe davantage (parties aériennes et racinaires) mais elle accumule aussi plus de phosphate dans ses tissus ; alors qu'en condition MediumP, la plante favorise la production de biomasse plutôt que l'accumulation de phosphate.

2 – 1c/ Effet de la fertilisation sur la mycorhization

Lors de la récolte des plantes, un échantillon de racines de chaque plante est coloré à l'encre et les racines sont observées sous loupe binoculaire afin de déterminer la proportion de longueur racinaire colonisée par le champignon (Figure 16-C). Les plantes de pois ont montré une réponse mycorhizienne remarquablement forte à la fertilisation phosphatée (Figure 16-D). Lorsque les plantes sont inoculées avec *R. irregularis*, le taux de mycorhization peut atteindre 60 % en condition LowP, alors que très peu de structures fongiques sont retrouvées dans des racines de plantes arrosées en HighP (<1 % de racines colonisées). En condition MediumP le taux de mycorhization atteint le même niveau qu'en condition LowP. Dans la suite du travail la condition carencée sera appliquée avec la solution LowP et non pas MediumP, car dans la littérature les conditions de carence sont souvent obtenues à des concentrations proches de notre solution LowP (1 à 10 µM) [conditions proches des réelles disponibilités en Pi environnementales (Schachtman *et al.*, 1998)]. Nous espérons comme cela déclencher l'ensemble des réponses liées à la carence.

L'effet inhibiteur de la condition HighP sur la mycorhization a été confirmé avec le champignon *G. rosea*, un champignon phylogénétiquement distant de *R. irregularis* (Figure 16-E), même si globalement le taux de colonisation racinaire par *G. rosea* est inférieur à celui observé avec *R. irregularis*. Ceci suggère que les mécanismes de régulation impliqués dans cette inhibition ne sont pas spécifiques d'un champignon particulier. Les différences de taux

de mycorhization entre les deux champignons pourraient refléter des préférences parmi les interactions mycorhiziennes. Des résultats similaires ont été décrits chez *Medicago sativa*, une autre légumineuse (Douds *et al.*, 1998).

Une information importante que l'on peut tirer de l'ensemble des résultats de la Figure 16 (A-E), est que la colonisation racinaire semble être inversement corrélée avec les teneurs en Pi internes plutôt qu'avec les concentrations en phosphate apportées par les solutions d'arrosage.

La régulation de la symbiose MA par le phosphate a été observée de façon systématique dans nos conditions expérimentales, et elle est considérée comme un phénomène général dans la littérature (ex : contrairement à la plupart des études antérieures, les conditions expérimentales utilisées dans nos travaux permettent d'avoir un phénotype mycorhizien très clair en condition HighP, puisque très peu de structures symbiotiques sont observées (Figure 16). Des effets similaires du HighP ont été retrouvés avec des inoculas plus ou moins forts en spores (ex : 150 spores/plante Figure 20 et 600 spores/plante Figure 16-D), indiquant qu'un inoculum plus dense n'est pas capable de contourner les mécanismes régulateurs liés au phosphate. Notre phénotype mycorhizien fortement inhibé en HighP diffère de ceux obtenus dans d'autres équipes. Par exemple, chez *M. truncatula*, Branscheid *et al.* (2010) ont choisi une condition LowP à 20 μ M une condition HighP à 1 mM ce qui conduit à des phénotypes mycorhiziens peu contrastés. La fréquence de colonisation observée est de 100 % dans les deux conditions (bien qu'une diminution de 20 % de l'intensité de la colonisation et du nombre d'arbuscules soit mesurée en HighP). L'étude réalisée chez le pétunia publiée par Breuillin *et al.*, en 2010 utilise une gamme allant de 0,1 à 10 mM de phosphate et montre que 0,5 mM diminue par deux la mycorhization et qu'il faut utiliser jusqu'à 10 mM pour inhiber quasiment à 100 % la colonisation. L'analyse des fragments colonisés en HighP montre que les petites colonies ont du mal à se développer dans la racine, des hyphes courts se forment et les arbuscules sont malformés. Les différences entre notre phénotype mycorhizien et les phénotypes rapportés dans la littérature pourraient être reliés aux différentes espèces de plantes utilisées et/ou aux conditions expérimentales (inoculum, arrosage...).

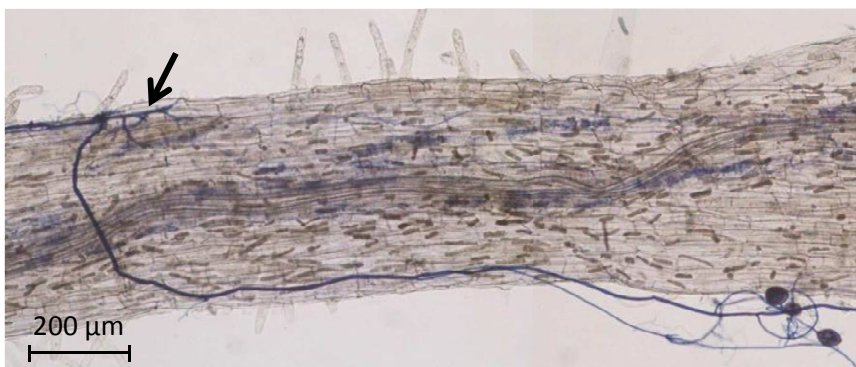
Tableau 1 : Effet du phosphate sur la formation d'hyphopodes.

	Temps après inoculation (semaines)		Nombre d' hyphopodes/ m de racine	
<i>R. irregularis</i> NaH_2PO_4	6	LP	112 +/- 42,4	a
		HP	6,67 +/- 1,67	b
<i>R. irregularis</i> KH_2PO_4	4	LP	38,8 +/- 5,42	a
		HP	1,33 +/- 0,83	b
	6	LP	42,9 +/- 2,67	a
		HP	0,42 +/- 0,42	b
<i>G. rosea</i> NaH_2PO_4	7	LP	61,7 +/- 10,63	a
		HP	10,2 +/- 3,94	b

Les données correspondent à trois expériences indépendantes. Les racines ont été examinées microscopiquement à 4, 6 ou 7 semaines après inoculation, et les hyphopodes ont été dénombrés (60 cm de racine ont été observés pour chaque plante).

Les valeurs indiquent le nombre moyen d'hyphopodes par mètre de racine (+/- l'erreur type SEM). Les données ont été analysées séparément pour chaque expérience, et pour chaque temps de récolte. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre échantillons selon le t-test de Student ($p < 0,05$). Pour *R. irregularis* n = 3-4 plantes par condition et pour *G. rosea*, n = 7-8 plantes par condition.

A



B

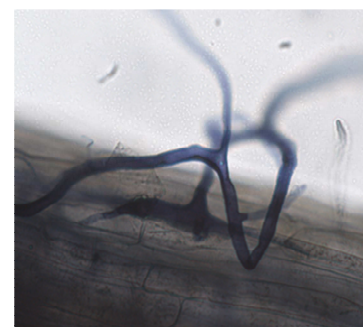


Figure 17 : Observation d'hyphopodes.

A : racine présentant des spores et des hyphes extraracinaires, un hyphopode (flèche), des structures fongiques intraracinaires.

B : photographie d'un hyphopode à la surface d'une racine de pois.

2 – 1d/ Effet de la fertilisation sur la formation des hyphopodes

Afin de déterminer à quel stade l'interaction est bloquée en condition HighP, des racines ont été colorées et observées en détail entre lame et lamelle au microscope. Les différents types de structures mycorhiziennes (hyphes extra/intra-racinaires, hyphopodes, vésicules, arbuscules...) ont ainsi pu être analysées et dénombrées. En condition LowP, l'ensemble des structures sont observées et sont présentes en grand nombre. En condition HighP, les rares fois où le champignon a pénétré dans la racine, toutes les structures mycorhiziennes habituelles sont retrouvées et sont morphologiquement identiques à celles observées en LowP. Comme décrit dans la Figure 16-D, le nombre de vésicules/arbuscules (représenté par le taux de mycorhization) est très faible en HighP. De plus, la présence d'hyphopodes à la surface de l'épiderme est très nettement réduite (Tableau 1 ; Figure 17).

Afin de savoir si cette observation n'est pas liée simplement au type de contre-ion associé à l'anion phosphate, des expériences ont été réalisées avec du KH_2PO_4 à la place du NaH_2PO_4 . En effet, le sodium pourrait à lui seul être à l'origine d'un effet négatif sur le champignon ou sur l'interaction. D'après nos résultats (Tableau 1), les effets sur la mycorhization semblent donc bien liés au phosphate et non pas au sodium associé.

Un essai de récolte des plantes à un temps plus précoce d'infection (4 semaines) a été réalisé pour savoir si le blocage a déjà lieu à ce temps de l'interaction. Il faut savoir que dans nos conditions d'inoculation, le temps 4 semaines post-inoculation (pi) correspond à une période de colonisation très précoce, car à 3 semaines-pi aucune structure fongique ne peut être observée dans les racines, même en condition LowP. À 4 semaines-pi le taux de mycorhization est inférieur à 5 % en condition LowP. À ce point de cinétique également, le nombre d'hyphopodes est bien inférieur en HighP par rapport à celui obtenu en LowP (Tableau 1).

L'ensemble de ces résultats indiquent qu'en condition HighP l'interaction est arrêtée avant même la formation des hyphopodes au niveau de l'épiderme racinaire. Ceci représente un nouveau phénotype mycorhizien lié au phosphate. En effet, dans de nombreuses études, la condition considérée comme HighP entraîne en fait une diminution de la mycorhization et non un arrêt aussi net et précoce (ex : Thomson *et al.*, 1986 ; Branscheid *et al.*, 2010 ; Breuillin *et al.*, 2010). Cette différence de phénotype pourrait s'expliquer par exemple par l'inoculum utilisé (comme détaillé précédemment) ou par la

façon dont le phosphate est apporté (concentration, fréquence de la fertilisation). Dans nos travaux, le phosphate a été apporté quotidiennement avec la solution d'arrosage et les plantes ont été inoculées avec des spores et non des fragments de racines mycorhizées. Par exemple dans l'article Breuillin *et al.* (2010) chez le pétunia l'inoculation est faite par un substrat contenant des spores et de fragments de racines mycorhizées.

Une hypothèse pouvant expliquer que les hyphopodes sont en moins grand nombre en HighP serait par exemple qu'une progression déficiente du champignon dans les racines pourrait réduire ou retarder le nombre d'évènement d'infections secondaires (et donc d'hyphopodes au final). Plusieurs arguments nous amènent à conclure que le blocage observé ici en HighP est lié à des évènements ayant lieu avant la formation des hyphopodes primaires, et non à des processus plus tardifs de l'interaction :

- tout d'abord, des résultats similaires ont été obtenus à 4 et 6 semaines post-inoculation (Tableau 1). Le point 4 semaines correspond au tout début des processus de mycorhization, moment où les premiers arbuscules commencent à apparaître. Les hyphopodes observés à ce moment-là doivent donc provenir des hyphes primaires issus des spores germées et non pas résulter de phénomène d'infections secondaires. A ce stade précoce de l'interaction, un effet très net de la fertilisation HighP peut déjà être noté.

- ensuite, dans le cas de mutants affectés à des stades plus tardifs de l'interaction on observe généralement un nombre normal d'hyphopodes (parfois même supérieur) (ex : Bradbury *et al.*, 1991 ; Bonfante *et al.*, 2000).

Contrairement aux mécanismes de différenciation des appressoria des champignons pathogènes, ceux impliqués dans la différenciation par les champignons MA des points d'attachement et de pénétration que sont les hyphopodes sont très mal connus. La définition d'un hyphopode est « un hyphe ramifié et gonflé » (Genre & Bonfante, 2007). Les hyphopodes, longtemps appelés appressoria dans les articles relatifs à la symbiose, sont aujourd'hui appelés ainsi pour les distinguer des vrais appressoria produits par les champignons pathogènes. Ces derniers sont formés à la surface des feuilles et des tiges, ils sont plus petits, et mise en place plus rapidement après germination au niveau du tube germinatif (et non au niveau d'un hyphe mature) et ont une paroi plus mélanisée (Bastmeyer *et al.*, 2002). Les plantes cultivées en HighP nous font ici penser aux mutants de tomate *pmi1* et *pmi2* (David-schwartz *et al.*, 2001, 2003), et aux mutants de maïs *nope1* et

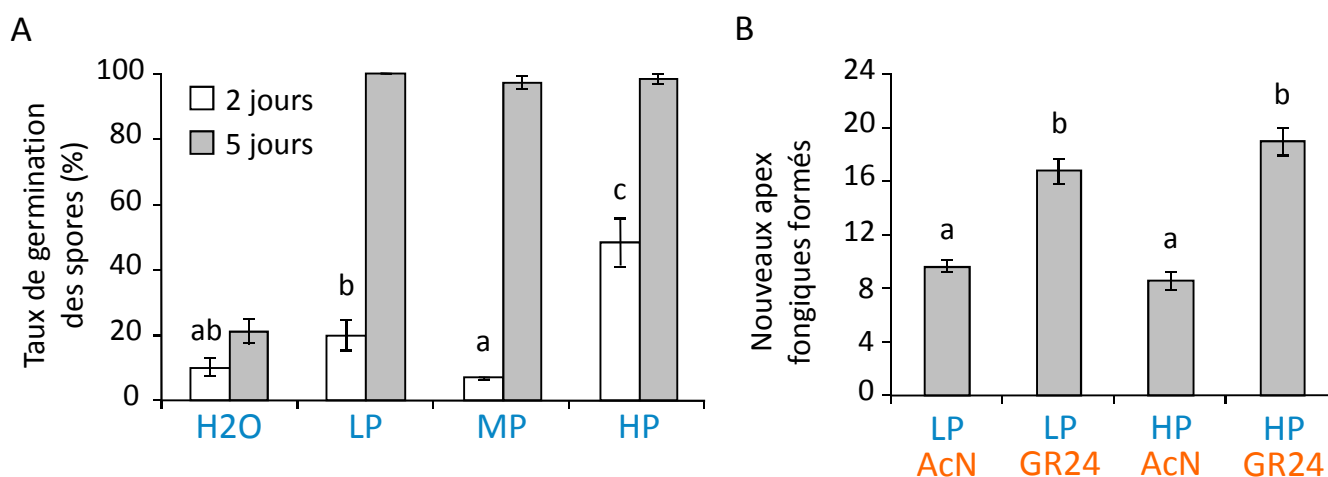


Figure 18 : Effet du phosphate sur le développement du champignon.

A : germination des spores de *R. irregularis*

Des spores de *R. irregularis* ont été incubées dans de l'eau ou des solutions nutritives LowP, MediumP ou HighP. Le taux de germination a été déterminé par observations microscopiques à 2 jours (barres blanches) et 5 jours (barres grises) après traitement.

B : ramification des spores de *G. rosea* en réponse au GR24

Des spores de *G. rosea* mises à germées sur un milieu LowP ou HighP ont été traitées avec du GR24 à 10 nM ou avec du solvant seul pour les témoins négatifs (Acétonitrile 10%, AcN). Le nombre de nouveaux apex a été compté 48h après traitement.

Les barres d'erreur représentent l'erreur type (SEM). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre échantillon selon une ANOVA à une variable (Test de Tukey $p < 0,05$) en (A) ou un test Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) en (B). (A), $n = 4 \times 30$ spores par condition et (B), $n = 38-56$ spores par condition.

taci1 (Paszkowski *et al.*, 2006) chez lesquels un nombre réduit d'hyphopodes a été observé. Malheureusement, les gènes affectés par ces mutations n'ont pas été identifiés pour le moment. Pourtant, ces mutants ainsi que les conditions HighP décrites ici représentent des outils très pertinents pour la compréhension des mécanismes de différenciation des hyphopodes (en comparant par exemple la composition des parois, des exsudats racinaires...).

2 – 2/ Effet direct du phosphate sur le champignon et contrôle systémique de la mycorhization

L'effet de la fertilisation HighP sur la mycorhization est particulièrement fort. Cela soulève la possibilité que bien que les concentrations de phosphate utilisées ici ne soient pas très élevées elles puissent arriver à perturber le champignon à des étapes précoces de son développement (la colonisation racinaire réduite pourrait être un effet secondaire de ces perturbations). En effet, le champignon peut lui aussi percevoir et réagir à la disponibilité du phosphate dans son environnement. Par exemple, la présence de phosphate induit l'expression d'une H⁺-ATPase (Requena *et al.*, 2003).

2 – 2a/ Effet du phosphate sur la germination de spores et la ramification du champignon

Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si le phosphate lui-même pouvait avoir un effet au moment de la germination du champignon. Des spores de *R. irregularis* ont été mises à germer dans des solutions d'arrosage LowP ou HighP. La solution HighP n'empêche pas la germination des spores de *R. irregularis* (Figure 18-A). Bécard et Fortin en 1988 avaient testé entre autre l'effet de la composition du milieu gélosé sur la germination des spores de *G. rosea*, le phosphate n'avait alors pas d'effet sur la germination. Les résultats obtenus ici vont donc dans le même sens.

De plus, nous avons aussi voulu savoir si le champignon était toujours capable de répondre par la ramification à un traitement aux strigolactones (GR24) lorsqu'il est dans un environnement HighP. Pour cela, nous avons réalisé un bioessai de ramification avec des spores de *G. rosea* germées sur des milieux LowP ou HighP. Les spores de *G. rosea* se sont développées de manière identique sur les deux types de milieux et ont été capables de

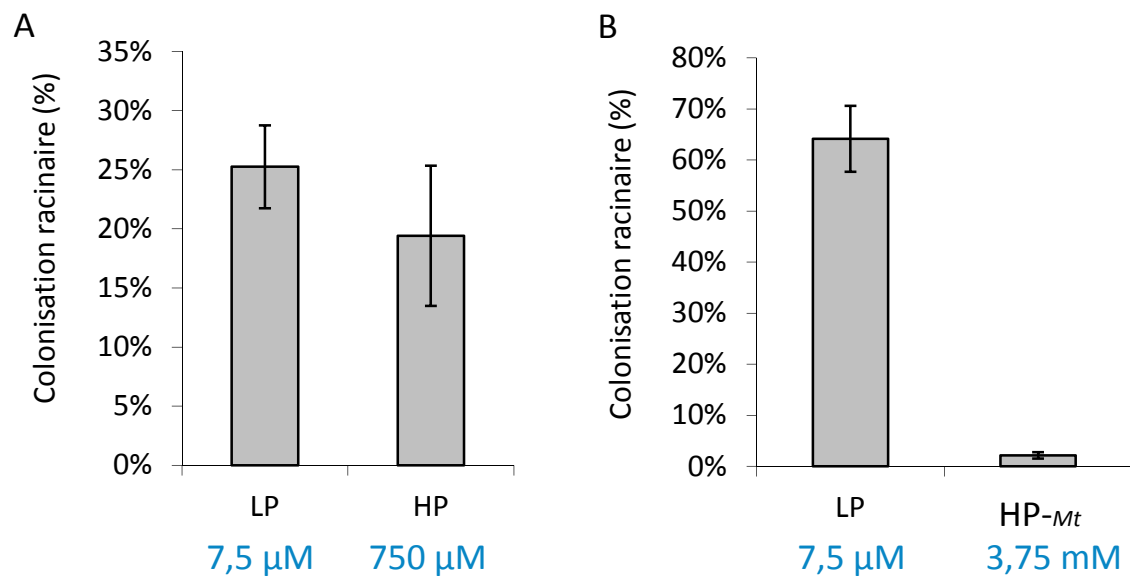


Figure 19 : Effet du phosphate sur la mycorhization de *Medicago truncatula*.

Des plantes ont été inoculées avec 90 spores/pot de *R. irregularis* et fertilisées avec de solutions nutritives contenant soit 7,5 μ M ou 750 μ M de Pi (A), soit 7,5 μ M ou 3,75 mM de Pi (B).

Les barres d'erreur représentent l'erreur type (SEM). n = 6 plantes par condition.

répondre de façon similaire au traitement GR24 (Figure 18-B), suggérant que la présence de phosphate en plus ou moins grande quantité dans le milieu n'affecte pas la capacité des spores à répondre aux strigolactones.

2 – 2b/ Effet du phosphate sur la mycorhization de *M. truncatula*

Par la suite, nous avons abordé des approches plus moléculaires (exemple : effet du phosphate sur l'expression de certains gènes végétaux). Pour cela nous avons dû changer de plante modèle et *M. truncatula* a été choisie pour les outils moléculaires disponibles. Les conditions expérimentales permettant d'avoir un effet net du phosphate sur la mycorhization ont dû être mises au point chez *M. truncatula*. Nos premiers essais avec des solutions d'arrosage LowP (7,5 μ M) et HighP (750 μ M) nous ont donné des taux de mycorhization similaires dans les deux conditions (Figure 19-A). D'une manière générale dans la littérature, les études sur les réponses au phosphate sont menées avec des concentrations supérieures pour le HighP, entre 1 et 3 mM [exemples : 1 mM chez le pois (Bonser *et al.*, 1996) ; 1 mM chez le haricot (Valdés-López *et al.*, 2008); 3 mM chez *A. thaliana* (Pant *et al.*, 2008) ; 2 mM chez *M. truncatula* (Hohnjec *et al.*, 2005), et même 5 mM pour inhiber fortement la mycorhization chez le pétunia (Breuillin *et al.*, 2010).

Me basant sur ces résultats, des expériences ont alors été réalisées avec une solution d'arrosage Long Ashton HighP adaptée à *M. truncatula* plus concentrée en phosphate appelée HighP-Mt (HP-Mt) contenant 3,75 mM de phosphate (soit 5 fois plus concentrée que le HighP du pois) (Figure 19-B). Le phénotype mycorhizien obtenu chez *M. truncatula* avec 3,75 mM de phosphate a alors été le même que celui retrouvé habituellement chez le pois avec 750 μ M de phosphate (peu/pas de mycorhization, beaucoup moins d'hyphopodes). Ce résultat confirme que l'effet d'une concentration donnée de phosphate sur la mycorhization dépend du modèle végétal utilisé. De plus, les résultats de la Figure 19-A montrent que les 750 μ M de phosphate apportés par la solution d'arrosage n'ont pas été capables d'empêcher le champignon de coloniser les racines ni de former des hyphopodes chez *M. truncatula*. Ces résultats ne favorisent pas l'hypothèse selon laquelle le phosphate lui-même (tout du moins à 750 μ M) générerait directement le développement du champignon.

2 – 2c/ Approche split-root

Pour aller plus loin et tester si l'arrêt précoce de la symbiose en condition HighP pourrait être dû à un effet direct du phosphate sur le champignon, des expériences de split-root ont été menées. Pour cela, les systèmes racinaires de plantes de pois sont séparés en deux. Comme illustré dans le schéma expérimental proposé en Figure 20-A, les deux compartiments sont inoculés avec des spores de *R. irregularis*. Les deux côtés des plantes « témoins » (notées LP/LP ou HP/HP) sont arrosés avec la même solution d'arrosage. Les plantes « essai » (notées LP/HP) sont arrosées avec de la solution LowP d'un côté et HighP de l'autre. Le développement des plantes au moment de la récolte est représenté sur la Figure 20-B; on retrouve l'effet de la fertilisation phosphatée sur le développement de la plante. Un apport de HighP conduit à une augmentation de la biomasse racinaire et aérienne chez les plantes LP/HP et encore plus en HP/HP (Figure 20-B).

Les teneurs en phosphate ont été déterminées dans les feuilles et racines de ces mêmes plantes split-root. Les plantes LP/HP accumulent le Pi dans les feuilles plutôt que dans les racines (Figure 20-C), indiquant que dans ces conditions les parties aériennes représentent un puits pour le phosphate plus fort que les racines.

Concernant les plantes témoins, les taux de mycorhization sont comparables à ceux obtenus avec des plantes intactes, c'est-à-dire un taux de mycorhization élevé en LowP et très faible en HighP (Figure 20-D). La colonisation très faible du côté HighP des plantes essai LP/HP est similaire à celle observée sur une plante HP/HP. L'observation la plus marquante est que du côté LowP des plantes LP/HP, les racines sont bien moins mycorhizées que dans des conditions uniquement LowP (LP/LP) (2 % de mycorhization contre 60 % respectivement). En d'autres termes, la mycorhization du côté LowP d'une plante LP/HP ne répond pas à la teneur en phosphate locale dans l'environnement. Cependant du côté HighP un tel effet direct du phosphate local sur le développement fongique (en plus de l'effet systémique) ne peut pas être exclu. On remarque que le taux de mycorhization corrèle négativement avec la teneur en phosphate dans les parties aériennes et non dans les racines. Ces résultats indiquent l'existence d'une régulation systémique liée aux teneurs en phosphate dans les feuilles et capable de réguler la mycorhization à travers la plante.

Cette régulation de la symbiose MA via une signalisation systémique montre que la très forte inhibition de la colonisation racinaire déclenchée en HighP implique des processus

dirigés par la plante et n'est pas seulement due à un effet direct et local du phosphate sur le champignon. Ces résultats sont cohérents avec les données issues de la littérature qui indiquent que la régulation systémique de la mycorhization par le phosphate était déjà connue (cf : Introduction 1 – 5d/). De plus, parallèlement à nos approches, une étude menée sur le pétunia par Breuillin *et al.* publiée en 2010 abordait la même question (effet direct du phosphate sur le champignon) par les mêmes expériences de split-root et donnait les mêmes résultats : la mycorhization est régulée de façon systémique via les teneurs en phosphate dans les parties aériennes. Cependant dans l'ensemble de ces études l'effet inhibiteur n'était pas aussi fort ni aussi précoce que dans notre cas (exemples : De Miranda *et al.*, 1989 ; Thomson *et al.*, 1991 ; Rausch *et al.*, 2001). Il était donc important de valider l'existence de cette régulation systémique dans nos conditions ; cela nous a aussi permis d'utiliser des plantes split-root pour aborder d'autres questions.

3/ Un mécanisme régulateur possible : rôle des signaux diffusibles végétaux et en particulier des strigolactones

Différents mécanismes pourraient expliquer la régulation de la formation des hyphopodes par la nutrition phosphatée. L'échange de molécules signal entre les deux partenaires durant la phase pré-symbiotique représente un élément régulateur potentiel. La production par les racines de composés diffusibles stimulateurs (en LowP) ou inhibiteurs (en HighP) et l'importance de ces signaux dans le contrôle de la mycorhization par le phosphate est une hypothèse que nous avons développée dans ce travail de thèse et les résultats obtenus sont présentés dans cette partie.

3 – 1/ Les strigolactones, molécules effectrices de la régulation par le phosphate ?

Les strigolactones ont été identifiées comme des molécules majeures contribuant à l'effet des racines hôtes sur la croissance pré-symbiotique du champignon et son métabolisme (Akiyama *et al.*, 2005 ; Bessener *et al.*, 2006, 2008). Des résultats supplémentaires ont mis en avant l'importance des strigolactones dans les événements de signalisation précoce lors de l'interaction (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). En effet, des mutants

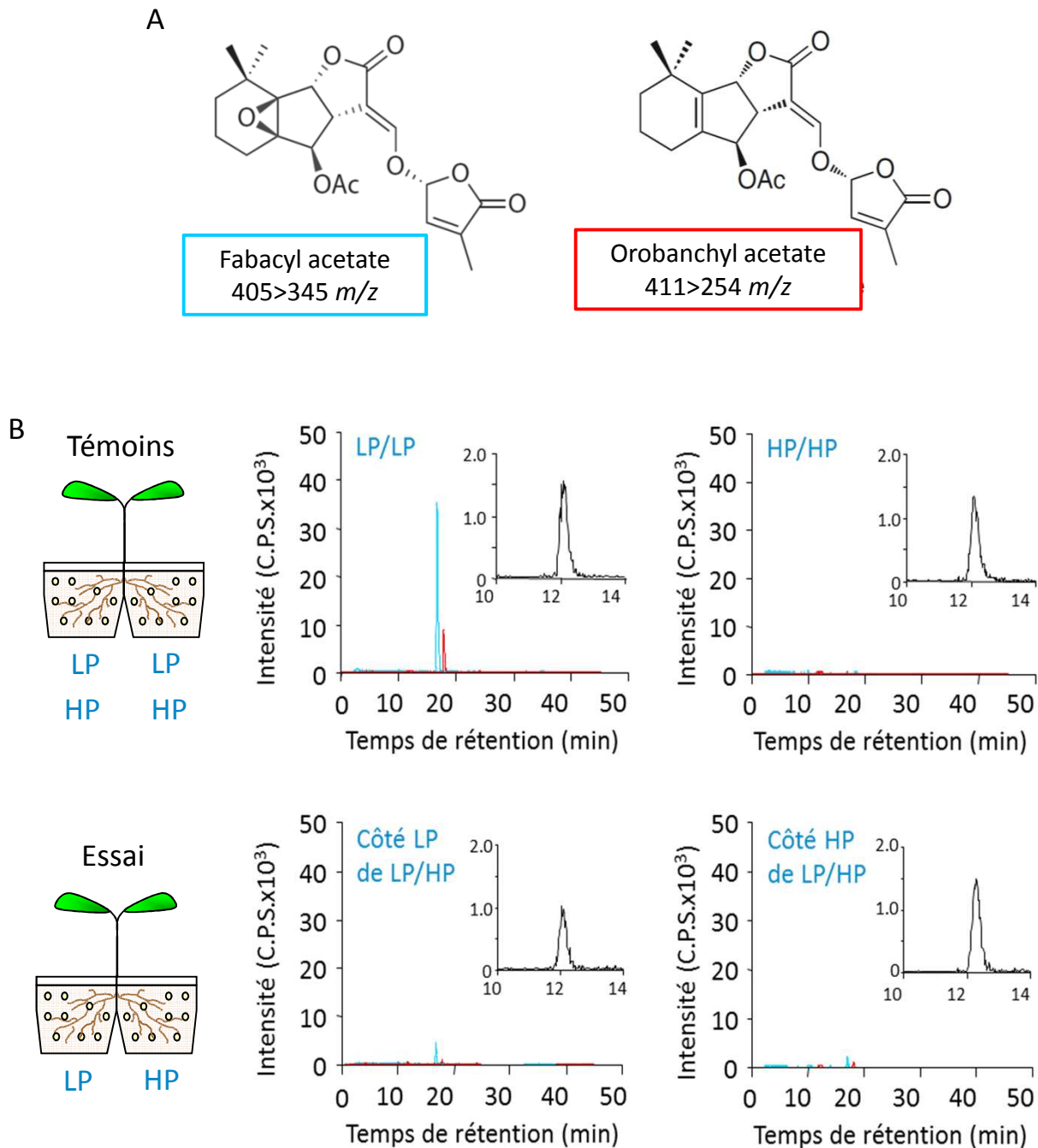


Figure 21 : Contrôle systémique de la production de strigolactones.

A : strigolactones présentes dans les exsudats racinaires de pois (fabacyl acetate et orobanchyl acetate) et transitions de masse correspondantes utilisées pour l'analyse.

B : chromatogrammes montrant une transition de masse pour chacune des deux strigolactones dans des extraits d'exsudats racinaires de plantes en split-root (analyse LC-MS/MS en mode MRM).

Du GR24 (analogue synthétique de strigolactone) a été ajouté au moment de l'analyse en quantité égale (à concentration de 100 nM) dans tous les échantillons en tant que standard externe. L'encart montre une transition correspondant au GR24 (299>202 m/z).

de pois affectés dans la production de strigolactones montrent une colonisation racinaire réduite par rapport à des pois sauvages. Une mycorhization normale peut être restaurée en grande partie chez les mutants par ajout exogène de strigolactone (GR24). Par ailleurs, il a été montré chez différentes espèces (le trèfle, le sorgho, le riz) que la production de strigolactones est régulée négativement par l'apport de phosphate à concentration élevée (Yoneyama *et al.*, 2007b, 2007a ; López-Ráez *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*, 2010).

Dans nos conditions LowP, MediumP et HighP, nous avons pu vérifier l'effet négatif du phosphate sur la teneur en strigolactones dans les exsudats de pois (résultats non présentés). De plus, l'analyse de broyats racinaires plutôt que d'exsudats a mené à des résultats similaires (présence de strigolactones en LowP, quasi absence en HighP, résultats non présentés), indiquant que la régulation via le phosphate a lieu au moment de la biosynthèse plutôt qu'au niveau de l'exsudation de ces molécules dans la rhizosphère.

Une hypothèse évidente a alors été envisagée : la moindre production de strigolactones en condition HighP serait responsable de la mycorhization réduite. Dans un tel cas, une régulation systémique de la production de strigolactones par le phosphate est donc attendue.

3 – 1a/ Effet du phosphate sur la production de strigolactones en système split-root

Des exsudats racinaires de plantes en split-root ont été analysés pour étayer cette hypothèse. Le système expérimental est similaire à celui décrit en Figure 16, mais les plantes ici ne sont pas inoculées. La Figure 21 montre les deux strigolactones produites par le pois : le fabacyl acetate (Xie *et al.*, 2009) et l'orobanchyl acetate (Yoneyama *et al.*, 2008) (Figure 21-A) et les chromatogrammes obtenus avec les exsudats (Figure 21-B). L'analyse des exsudats végétaux a été réalisée grâce à Virginie Puech-Pagès, biochimiste travaillant dans l'équipe, et à l'accès au spectromètre de masse de la plateforme Métatoul à Toulouse. Avec le mode de détection MRM (Multiple Reaction Monitoring) utilisé, chaque ligne (couleur) correspond à une transition de masse MS/MS caractéristique de chacune des deux strigolactones produites par le pois. Pour chaque strigolactone, deux transitions de masse sont enregistrées et donnent un signal au même temps de rétention (par souci de clarté, une seule des transitions est montrée sur les chromatogrammes). Les standards synthétiques de ces strigolactones éluent eux aussi aux mêmes temps de rétention (données non présentées), montrant que le signal enregistré correspond réellement aux strigolactones

recherchées. Du GR24 (strigolactone de synthèse) a aussi été ajouté en quantité égale dans chacun des échantillons en tant que standard externe pour visualiser de possibles artefacts dus à l'injection sur la colonne ou à un effet de la matrice sur la détection. Les signaux obtenus avec le GR24 sont similaires entre les différents échantillons, indiquant que la quantité des autres strigolactones dans ces échantillons peut être comparée sans erreur. Les chromatogrammes obtenus pour les témoins LP/LP et HP/HP sont similaires à ceux issus des exsudats de plantes intactes cultivées en LowP ou HighP respectivement (Figure 19-B et données non présentées). Ces résultats confirment chez le pois l'effet inhibiteur du phosphate sur la production de strigolactones.

De plus, le côté HP d'une plante LP/HP produit une quantité à peine détectable de strigolactones (comportement similaire à une plante intacte en HighP). En revanche, le côté LP de plantes LP/HP produit beaucoup moins de strigolactones qu'une plante témoin LP/LP. Ainsi, le côté HighP de la plante régule négativement la production de strigolactones du côté LowP de la plante, via une signalisation là aussi systémique.

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette signalisation systémique sont eux aussi inconnus et sont peut-être les mêmes que ceux impliqués dans la régulation systémique de la mycorhization. Cette régulation systémique de la production de strigolactones représente un nouveau résultat particulièrement intéressant dans le contexte du rôle hormonal récemment alloué aux strigolactones (Gomez-Roldan *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*, 2008). Elle serait compatible avec l'hypothèse très probable selon laquelle la mycorhization d'une plante est en partie sous contrôle hormonal.

3 – 1b/ Effet d'un traitement par des strigolactones exogènes?

Pour tester l'hypothèse d'un rôle régulateur des strigolactones sur la mycorhization en réponse au phosphate, des plantes cultivées en HighP ont été traitées avec du GR24 lors de l'arrosage. Les conditions expérimentales utilisées pour les traitements avec cette strigolactone synthétique (concentration = 10^{-8} M et fréquence d'application du traitement = 3 fois par semaine) ont été précédemment démontrées comme efficaces puisqu'elles sont capables de restaurer le phénotype mycorhizien de mutants de pois déficients en strigolactones (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). Le traitement GR24 n'a pas d'effet négatif sur le champignon puisque des plantes arrosées en LowP+GR24 sont mycorhizées normalement et

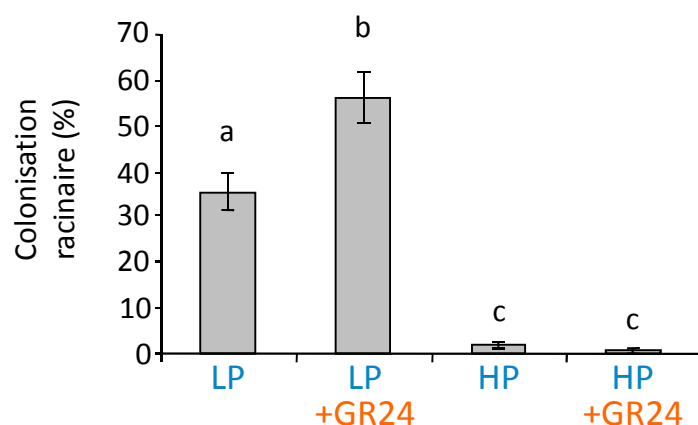


Figure 22 : Effet d'un traitement GR24 sur la mycorhization.

Des plantes de pois inoculées avec 150 spores de *R. irregularis* ont été fertilisées avec des solutions LowP ou HighP supplémentées ou non de GR24 à 10 nM. Le taux de colonisation racinaire a été déterminé après 6 semaines de culture.

Les barres d'erreur représentent l'erreur type (SEM). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre échantillons selon une ANOVA à une variable (Test de Tukey $p < 0,05$). $n = 7-8$ plantes par condition.

Tableau 2 : Effet d'un traitement GR24 sur la formation d'hyphopodes.

		Nombre d' hyphopodes / m de racine
<i>R. irregularis</i> (6 spi)	LP	112 +/- 42,4
	HP	6,67 +/- 1,67
	LP + GR	65,5 +/- 12,8
	HP + GR	5,00 +/- 1,67
<i>G. rosea</i> (7 spi)	LP	61,7 +/- 10,6
	HP	10,2 +/- 3,94
	LP + GR	63,3 +/- 13,4
	HP + GR	6,04 +/- 1,13

Les données correspondent à deux expériences indépendantes : une avec *R. irregularis* (150 sp/pot) et une avec *G. rosea* (100 sp/pot). Pour chaque condition, 60 cm de racines par plante ont été examinés microscopiquement à 6 ou 7 semaines après inoculation (spi), et les hyphopodes ont été dénombrés.

Les valeurs indiquent le nombre moyen d'hyphopodes par mètre de racine (+/- l'erreur type SEM). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre échantillons selon une ANOVA à une variable (Test de Tukey $p < 0,05$). $n = 3-4$ plantes pour *R. irregularis* et $n = 7-8$ plantes pour *G. rosea*.

parfois même plus intensément (Figure 22). De façon inattendue, la colonisation racinaire en condition HighP n'est pas améliorée par un traitement strigolactones (+GR24). La même observation a été faite par Breuillin *et al.* en 2010 avec le pétunia : des plantes arrosées en HighP+GR24 (même avec 100 nM) ne sont pas mieux colonisées.

Dans nos essais, le traitement GR24 n'est pas capable non plus de favoriser la formation d'hyphopodes à la surface des racines que ce soit avec *R. irregularis* ou *G. rosea* (Tableau 2). On sait d'après le bioessai exposé en Figure 18-B que le champignon est capable de répondre correctement en termes de ramification à un traitement par du GR24 en condition HighP. Dans les pots HighP+GR24, le blocage de la mycorhization doit donc avoir lieu après la ramification du champignon (à moins que le traitement GR24 n'ait pas été appliqué dans une cinétique appropriée), par exemple au moment de la différenciation de l'hyphopode.

Ces résultats nouveaux écartent l'hypothèse que des plantes cultivées en HighP ne sont pas mycorhizées simplement parce qu'elles ne sécrètent pas de strigolactones dans la rhizosphère (Yoneyama *et al.* 2007b ; Lopez-Raez *et al.* 2008). Bien que la production de strigolactone soit régulée par le phosphate, cette régulation ne représente pas le mécanisme expliquant à lui seul le contrôle de la mycorhization par le phosphate et montre que de nouveaux mécanismes restent à découvrir. Cependant, le rôle et le mode d'action *in planta* des strigolactones en temps qu'hormone pour le contrôle négatif de l'interaction ne peut pas être écarté (ce point sera développé dans la Conclusion générale et discussion).

3 – 2/ La métabolomique, une approche sans *a priori*

Après avoir testé l'hypothèse *a priori* d'un rôle régulateur des strigolactones, nous avons voulu évaluer des méthodes permettant de ne pas se limiter à des molécules candidates déjà connues. Dans le cadre d'un autre projet de thèse mené dans l'équipe par Jérôme Laparre, des analyses métabolomiques ont été réalisées sur des broyats de racines LowP ou HighP. Ces broyats racinaires ont été analysés en spectrométrie de masse, et des analyses statistiques multi-variées ont été effectuées sur les données afin de pouvoir comparer les profils métaboliques des différents échantillons. Ces analyses ont permis de détecter 34 ions différenciellement présents selon les conditions LowP ou HighP. Il est

intéressant de noter que parmi eux, la plupart des ions (28) sont en fait plus abondants dans les exsudats LowP par rapport aux exsudats HighP. Cette première approche (Laparra *et al.*, 2011) (Annexe 2) suggère que la carence phosphatée induit la production ou l'accumulation de composés dans les racines qui pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la mycorhization. Dans le but de rechercher des signaux diffusibles régulateurs, il faudrait refaire ces analyses à partir d'exsudats de plantes en LowP ou HighP (et non à partir de broyats racinaires). Dans tous les cas, pour aller plus loin, il faudrait arriver à déterminer quelle molécule biologique se cache derrière chaque ion trouvé. Il faut pour cela avoir des compétences en spectrométrie de masse afin d'éliminer les ions non pertinents et de réduire le nombre de molécules candidates, pour tester ensuite le rôle ces molécules dans le contrôle de la mycorhization par le phosphate.

Même si cette approche a montré son potentiel, le lourd travail d'identification de la structure chimique des molécules candidates n'a pas été réalisé pour le moment. Avant d'entreprendre cette identification, il est important de rechercher si les signaux racinaires diffusibles peuvent à eux seuls expliquer le phénotype mycorhizien en High P. Dans le cas contraire, il serait très difficile après avoir identifié un composé de démontrer expérimentalement son rôle régulateur. L'importance des signaux diffusibles sera donc abordée dans la partie suivante.

3 – 3/ Etude des signaux diffusibles végétaux

Avant de chercher la nature de tels signaux ayant un rôle dans la régulation, nous avons utilisé plusieurs approches afin de mettre en évidence l'implication de signaux diffusibles végétaux (en plus des strigolactones) agissant à des stades pré-symbiotiques. Parmi ces signaux, on peut considérer des activateurs ou des inhibiteurs du développement fongique précoce.

3 – 3a/ Effets d'exsudats racinaires sur le développement du champignon

Nous avons tout d'abord voulu savoir si les exsudats de plantes cultivées en LowP ou HighP contenaient des molécules différentes pouvant avoir un effet sur le développement du champignon. Afin de mettre en évidence de telles molécules, des extraits d'exsudats de

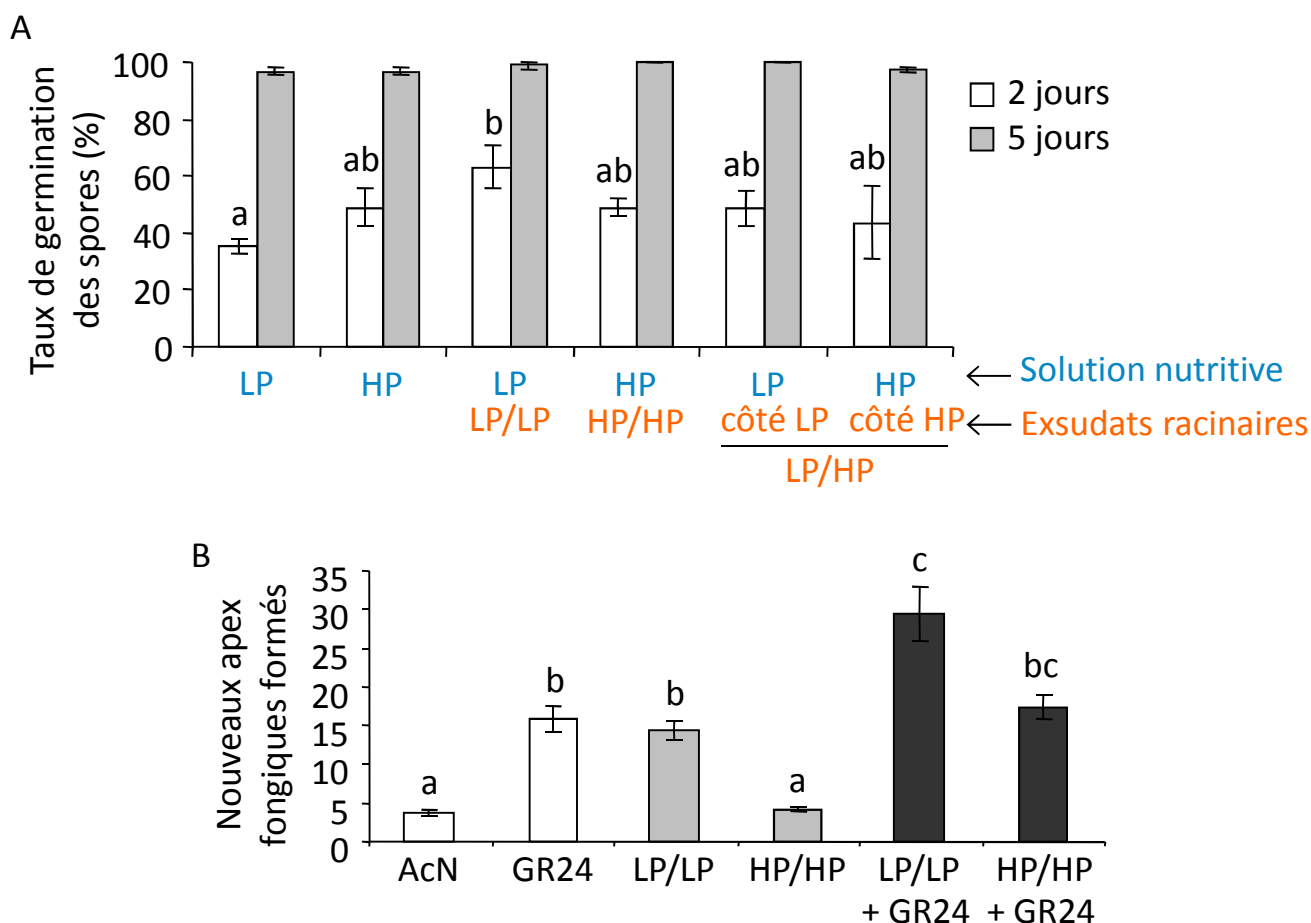


Figure 23 : Effet des exsudats racinaires sur le développement du champignon.

A : germination des spores de *R. irregularis*. Des spores de *R. irregularis* ont été incubées dans des solutions nutritives LowP ou HighP avec ou sans ajout d'exsudats racinaires provenant de plantes LP/LP, HP/HP ou LP/HP. Le taux de germination a été déterminé par observation microscopique.

B : ramification de *G. rosea*. Des spores germées de *G. rosea* ont été traitées avec du GR24 à 10 nM et/ou des exsudats racinaires provenant de plantes LP/LP ou HP/HP, ou avec du solvant seul (= témoin négatif Acétonitrile 10%, noté AcN). Les nouveaux apex formés 48 h après traitement ont été comptés. Barres blanches = échantillons témoins, barres grises = exsudats racinaire seuls, barres noires = exsudats racinaires additionnés de GR24.

Les barres d'erreur représentent l'erreur type (SEM). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre échantillon selon un test Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) (A) ou selon une ANOVA à une variable (Test de Tukey $p < 0,05$) (B). (A), $n = 4 \times 30$ spores par condition et (B), $n = 24-26$ spores par condition.

pois en split-root (LP/LP, HP/HP ou LP/HP) ont été produits. Ces exsudats ont été utilisés dans les deux bioessais suivants :

- effet des exsudats racinaires sur la germination des spores de *R. irregularis*.

Des spores ont été mises à germer dans des solutions d'arrosage LowP ou HighP supplémentées ou non avec des exsudats racinaires (Figure 23-A). Au temps 2 jours, on peut voir que la présence d'exsudats LP/LP dans la solution LowP favorise la germination par rapport à une condition LowP sans exsudat, signe de l'existence de molécules ayant un effet positif sur la germination du champignon dans les exsudats d'une plante LowP. La présence d'exsudats d'une plante HP/HP ou LP/HP ne favorise pas la germination au temps 2 jours (par rapport à des spores sans exsudat), indiquant l'absence de molécules positives dans ces exsudats, mais montrant aussi l'absence d'inhibiteurs forts de la germination des spores. Le fait que le taux de germination des spores atteigne presque 100 % après 5 jours de traitement quels que soient la solution utilisée et l'ajout ou non d'exsudats racinaires confirme l'absence de régulateurs négatifs forts en condition HighP. Cela indique que les exsudats racinaires n'ont pas d'impact important sur la germination des spores de champignons MA. De même, des exsudats d'oignons cultivés avec plus ou moins de phosphate n'ont pas d'effet sur la germination des spores de *Gigaspora margarita* (Tawaraya *et al.*, 1996). Cela est confirmé par nos résultats chez *R. irregularis*.

- effet des exsudats racinaires sur la ramification de *G. rosea*

Ces exsudats ont été testés sur la ramification de *G. rosea*, notamment pour savoir si dans les exsudats HighP il y aurait des molécules inhibitrices de la ramification du champignon. Dans la Figure 23-B, nous pouvons voir que le GR24 seul (témoin positif) et l'extrait d'exsudats provenant d'une plante LowP (LP/LP) sont capables de stimuler la ramification des hyphes du champignon. La combinaison des deux traitements (LP/LP+GR24) montre même un effet additif. L'extrait d'exsudats HighP (HP/HP) ne favorise pas la formation de ramifications par rapport au contrôle (AcN), ce qui pourrait être dû soit à l'absence de molécules stimulatrices (telles que les strigolactones), soit à la présence d'inhibiteurs. L'ajout de GR24 dans les exsudats HighP montre une activité similaire à celle observée avec du GR24 seul, ce qui suggère que ces extraits d'exsudats HighP ne contiennent pas d'inhibiteurs forts de l'effet des strigolactones.

Il faut cependant noter que ce sont des extraits d'exsudats racinaires (extraction Acétate d'Ethyle) et non des exsudats bruts qui ont été utilisés dans ce bioessai, pour

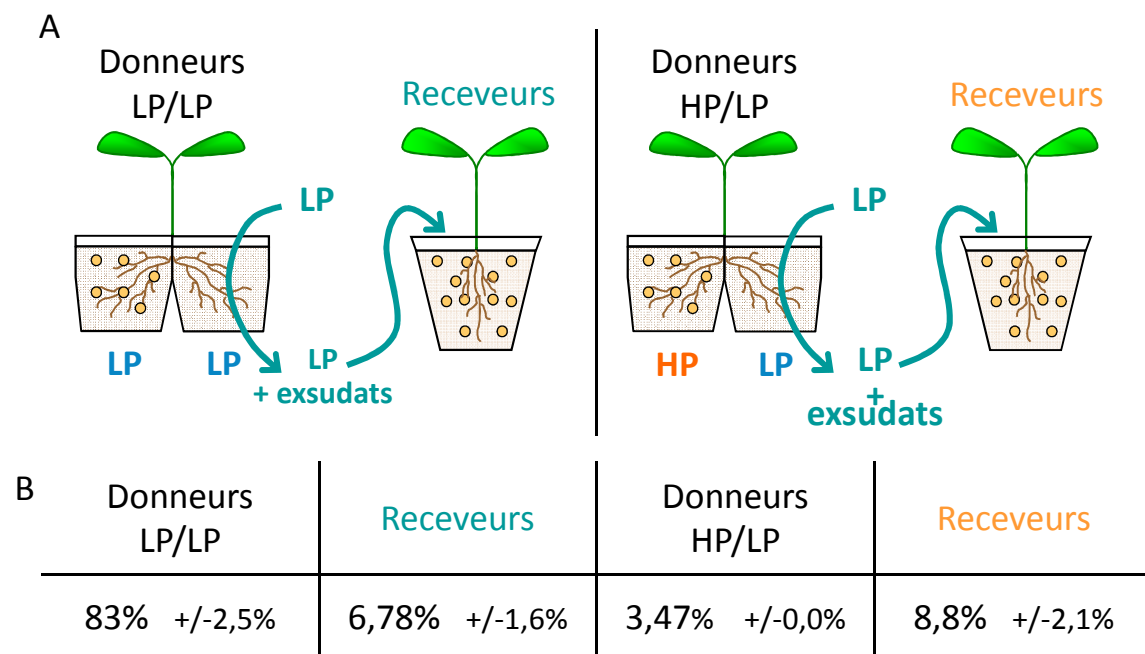


Figure 24 : Recherche d'inhibiteurs dans les exsudats végétaux bruts.

A : système expérimental. Des plantes en split-root (donneurs HP/LP ou LP/LP) ont été utilisées pour produire des exsudats quotidiennement afin d'utiliser ces exsudats directement pour arroser des plantes receveuses.

B : taux de colonisation racinaire (\pm l'erreur type (SEM), $n = 4$ plantes par condition).

permettre la concentration des échantillons. En plus de l'absence de stimulants dans la fraction organique des exsudats HighP, il ne peut pas être exclu que des inhibiteurs fongiques puissent exister dans la fraction aqueuse des exsudats racinaires HighP.

3 – 3b/ Effet des exsudats racinaires sur l'interaction

Nous avons voulu tester l'effet d'exsudats racinaires directement sur la mycorhization. Il fallait pour cela avoir des exsudats en grande quantité de façon à arroser quotidiennement des plantes avec. Nous avons mis en place un système de production d'exsudats racinaires bruts à travers un système de rinçage des pots. De la solution d'arrosage est apportée par le dessus d'un pot (pot donneur) afin de laver le substrat et de recueillir sous le pot la solution de rinçage contenant les molécules exsudées par la plante. De nouvelles plantes (pots receveurs) sont arrosées directement avec ces solutions contenant les exsudats « bruts ». Ce système de production d'exsudats par rinçage a par exemple été utilisé par certaines équipes pour mettre en évidence l'exsudation racinaire de strigolactones (Vogel *et al.*, 2010).

Recherche d'inhibiteurs dans les exsudats HighP

Nous avons d'abord recherché des molécules inhibitrices de la mycorhization dans des exsudats de plantes HighP. Il faut pour cela produire en continu des exsudats racinaires bruts provenant d'une plante HighP, et arroser des nouvelles plantes receveuses avec ces exsudats afin de voir si ces nouvelles plantes sont toujours capables de mycorhizer (ces dernières doivent donc être dans un environnement LowP). Pour produire les exsudats, il nous faut donc des plantes ayant les caractéristiques "HighP" tout en étant arrosées avec du LowP. Le système split-root a été utilisé, car il permet en condition HP/LP d'avoir des plantes ayant un phénotype HighP dans un compartiment LowP (cf Figure 20). De ce fait, on peut imaginer que dans le compartiment LP d'une plante HP/LP, les potentiels inhibiteurs sont produits, bien que nous soyons dans un environnement LowP. Nous avons donc produit des exsudats du côté LP de plantes split-root HP/LP (Donneurs HP/LP), ces exsudats sont ensuite appliqués à des plantes receveuses (schéma Figure 24-A). Les plantes receveuses sont donc dans un environnement LowP, mais en présence d'exsudats d'une plante HighP. Des plantes témoins ont été arrosées avec des exsudats de plantes LP/LP. Chez ces pots receveurs d'exsudats LP/LP, trop peu de mycorhization est observée (Figure 24-B). Le système

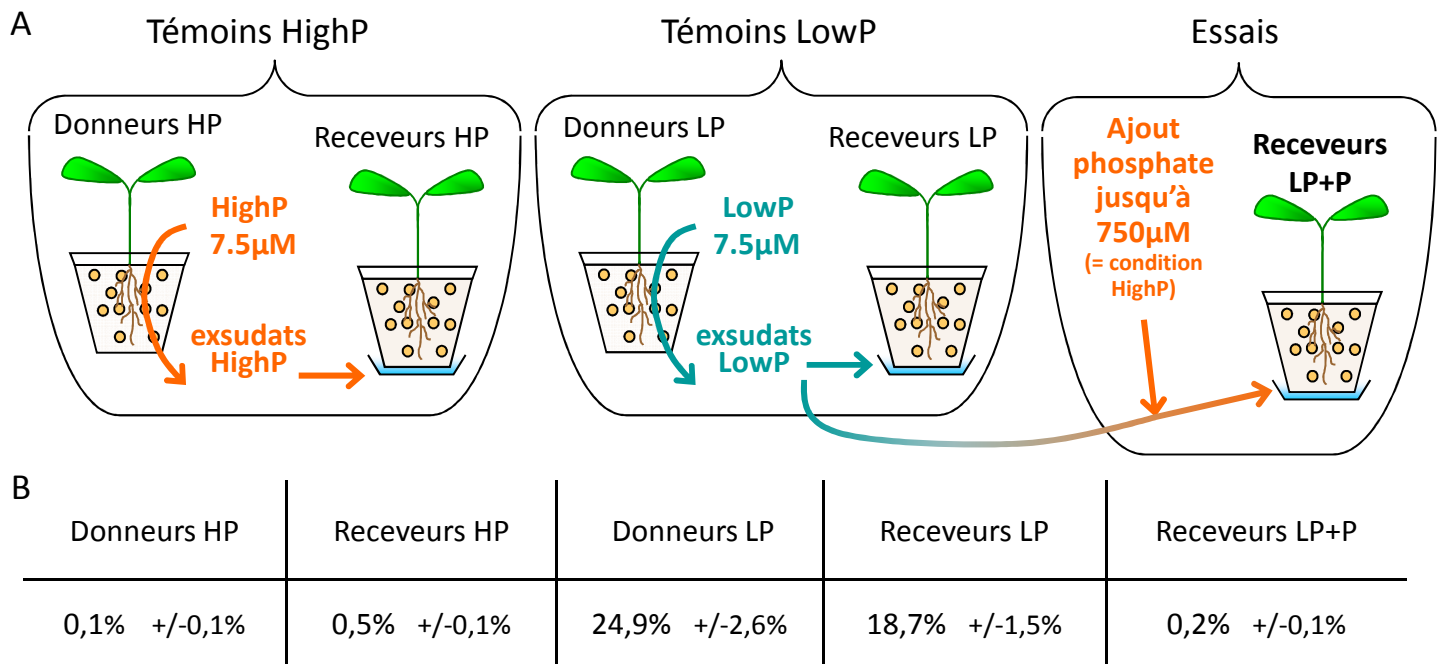


Figure 25 : Recherche d'activateurs dans les exsudats végétaux bruts LowP.

A : système expérimental. Des pois en LowP ou HighP (donneurs LP, ou donneurs HP) ont servi à la production d'exsudats. Pour les plantes témoins, les exsudats ont été utilisés pour arroser quotidiennement des pots receveurs LP ou HP respectivement. Une partie des exsudats LP sont complémentés en phosphate pour arroser des plantes « receveurs LP+P » (condition essai).

B : taux de colonisation racinaire (+/- l'erreur type (SEM), n = 3-8 plantes par condition).

expérimental consistant à arroser par le dessus gêne donc beaucoup la mycorhization. Les spores sont peut-être "lessivées", ou bien cet arrosage par le dessus pourrait éliminer des exsudats nécessaires à la mycorhization de ces témoins. Les plantes essai ayant reçu les exsudats des « Donneurs HP/LP » sont elles aussi un peu mycorhizées (plus que le côté HP des plantes HP/LP et autant que les plantes arrosées avec les exsudats des « Donneurs LP/LP »), ce qui suggère que ces exsudats ne possèdent pas d'inhibiteurs forts.

La recherche de molécules inhibitrices dans les exsudats HighP est compliquée par le fait que en produisant les exsudats nous récoltons aussi le phosphate de la solution HighP. Ceci nous a conduits à mettre en place le système expérimental décrit ci-dessus, et qui est malheureusement peu favorable à la mycorhization. Une autre façon de procéder serait par exemple de fertiliser les plantes par les parties aériennes. Les racines resteraient en LowP mais la plante serait physiologiquement HighP. Ce mode de fertilisation déjà testé dans plusieurs études, souvent à visée plutôt agronomique (Geneva *et al.*, 2010 ; Topalović *et al.*, 2011), semblait cependant difficile à mettre en œuvre (mise au point des conditions chez le pois, mode et fréquence des apports, éviter que le sol soit fertilisé...). Il faudrait aussi vérifier que de telles conditions d'apport en phosphate permettent bien d'avoir des phénotypes mycorhiziens semblables à ceux obtenus par un arrosage classique.

Recherche d'activateurs dans les exsudats LowP

Inversement, nous avons cherché à mettre en évidence l'existence de molécules activatrices de la mycorhization dans des exsudats de plantes LowP. Dans ce sens, le problème du phosphate dans la solution d'arrosage disparaît puisqu'ici nous avons récolté les exsudats d'une plante LowP, et nous avons ajouté du phosphate à ces exsudats jusqu'à obtenir une concentration HighP (schéma Figure 25-A). Nous avons donc des exsudats d'une plante LowP dans une solution HighP. Ces exsudats ont été apportés par arrosage dans la coupelle à des plantes receveuse. Les plantes témoins sont « Receveurs » LP ou HP ayant été arrosées avec des exsudats de « Donneurs » LP ou HP respectivement.

Nous pouvons voir que les témoins HighP « Donneurs » et « Receveurs » ne sont presque pas mycorhizés, ainsi le lessivage des pots « Donneurs » ne gêne pas le blocage de la mycorhization (schéma Figure 25-B). Concernant les témoins LowP, les « donneurs » sont mycorhizés bien que les racines des plantes soient rincées, et les « Receveurs LP » sont eux aussi bien mycorhizés. Les plantes essais « Receveurs LP+P » sont non mycorhizées. Ce

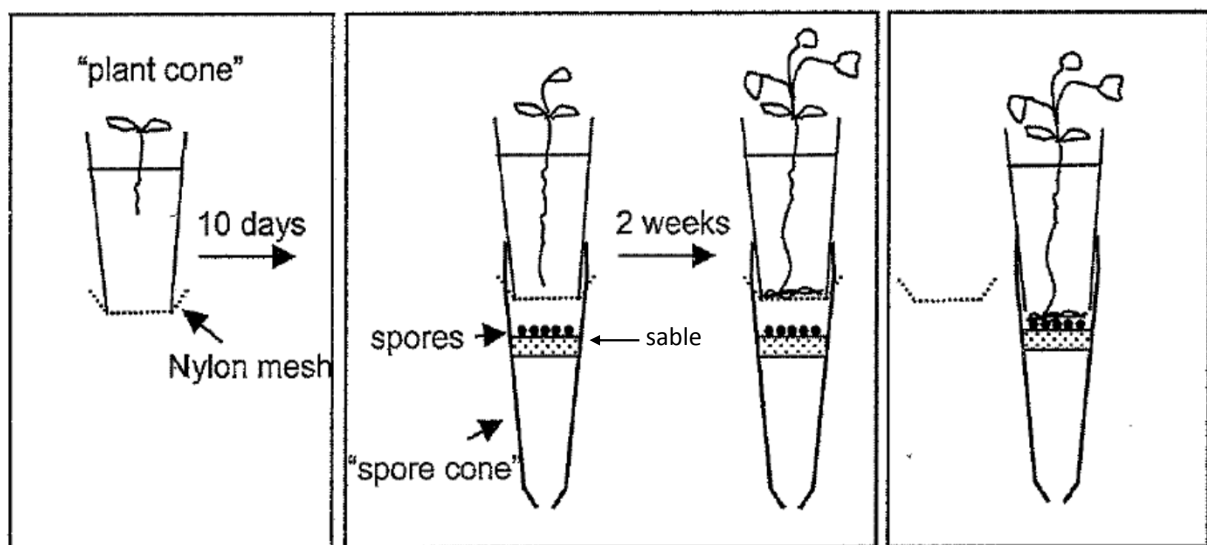


Figure 26 : système « double-cone » (Lopez-Meyer & Harrison, 2005).

Des plantules de *M. truncatula* âgées de 10 jours sont placées dans un cône sans fond fermé par du nylon (« plant-cone »). Elles sont placées au dessus d'un autre cône (« spore-cone ») contenant 500 spores de *R. irregularis* déposées sur un disque de miracloth lui-même placé sur du sable. Les « plant-cone » sont arrosés quotidiennement par le dessus à l'aide d'un goutteur, pour produire des exsudats qui vont tomber sur les spores et stimuler leur croissance pré-symbiotique. Après 15 jours de stimulation, le nylon est enlevé et les racines des plantes des « plant-cone » sont mises au contact des spores en dessous. La colonisation est regardée uniquement au niveau des racines étant dans la zone de contact entre les 2 partenaires.

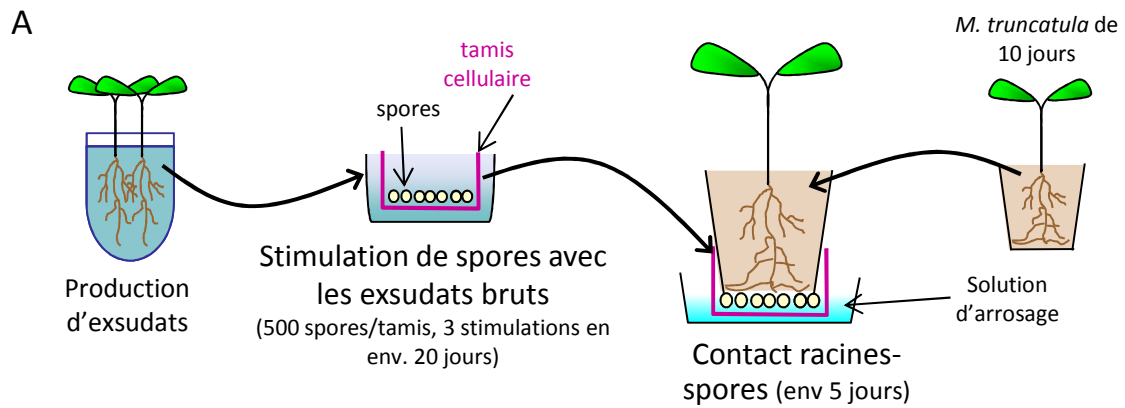
dernier résultat intéressant montre bien que malgré la potentielle présence de molécules activatrices provenant des exsudats LowP, le fait que la plante soit bien fertilisée bloque l'interaction, signe qu'en HighP le blocage ne passe pas uniquement par une modification de la production d'exsudats.

3 – 3c/ Utilisation d'un système «double-cône» pour découpler l'effet des exsudats de l'effet du phosphate environnemental

Parallèlement aux différentes approches exposées précédemment concernant les exsudats, un système « double-cône » a été utilisé afin d'essayer de savoir si les exsudats des plantes sont des éléments importants dans la régulation de la mycorhization par le phosphate.

Le système expérimental double-cône a été mis en place dans l'équipe de Maria Harrison (Lopez-Meyer & Harrison, 2005), dans le but de simplifier et de synchroniser les événements précoces de la symbiose afin d'obtenir une colonisation racinaire rapide. En effet, avec un inoculum composé uniquement de spores, la colonisation met un certain temps à s'installer, et les différentes étapes (germination, croissance des hyphes, formation des hyphopodes, pénétration, colonisation) sont asynchrones. Cela rend l'étude des événements précoces assez difficile à mener. Afin de s'affranchir de ce problème, des spores isolées peuvent être stimulées par des exsudats de plantes pour induire la germination et la croissance pré-symbiotique. Ces spores sont ensuite mises au contact de plantes cultivées indépendamment et le champignon peut alors rapidement coloniser les racines (en 24h les premiers arbuscules peuvent être observés) (Figure 26).

Dans notre cas, le principal avantage de ce système est de pouvoir découpler les effets du phosphate sur les spores, sur la production d'exsudats et sur la physiologie des racines (alors que dans une expérience classique, la plante et l'inoculum sont placés dans les mêmes conditions). On peut donc regarder la contribution respective de la plante, des exsudats végétaux et du champignon dans la régulation. Pour cela, des modifications ont été apportées au système décrit par Lopez-Meyer & Harrison (2005), de façon à appliquer des concentrations de phosphate différentes aux spores, aux plantes fournissant les exsudats et aux plantes à coloniser (système expérimental détaillé en Figure 27-A). Le système a été mis au point sur *M. truncatula*, dont le rythme de développement racinaire se prête mieux à ce dispositif. Tout d'abord les spores de *R. irregularis* sont stimulées pendant 3 semaines par



→ 6 conditions

	Spores ○○○○○○	Plantes 	Arrosage durant le contact 	nom
Témoins	LowP	LowP	LowP	sLP/pLP/aLP
	HighP	HighP	HighP	sHP/pHP/aHP
« Effet exsudats »	LowP	HighP	HighP	sLP/pHP/aHP
	HighP	LowP	LowP	sHP/pLP/aLP
« Effet arrosage »	LowP	LowP	HighP	sLP/pLP/aHP
	LowP	HighP	LowP	sLP/pHP/aLP

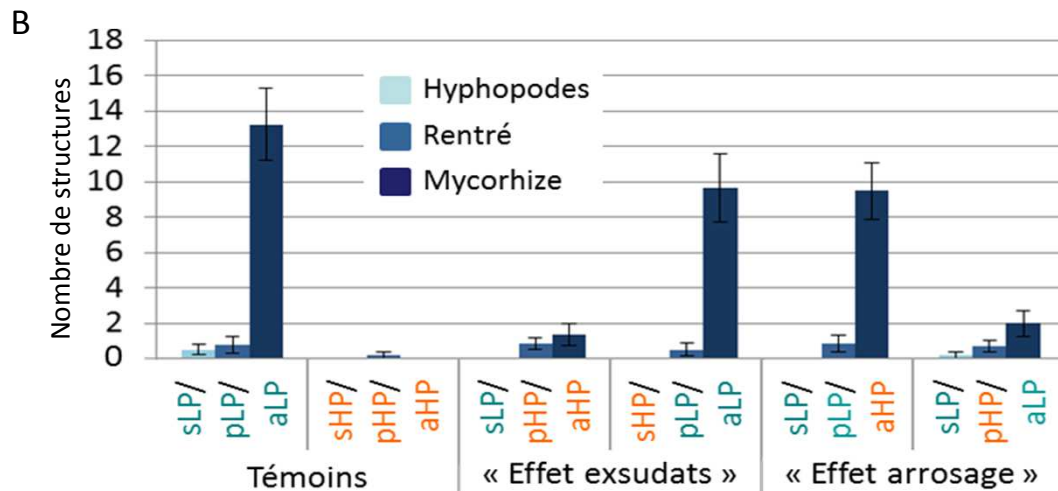


Figure 27 : Résultats du « double-cône » modifié.

A : système expérimental. Des plantes de *M. truncatula* produisent des exsudats bruts LowP ou HighP (ici HighP = HP-Mt 3,75mM) utilisés pour stimuler des spores de *R. irregularis*. Par ailleurs, d'autres plantules sont semées en LowP ou HighP (10 jours de croissance). Ces dernières sont mises au contact des spores pendant 5 jours, puis les racines sont récoltées. Six conditions différentes ont été testées : les témoins (tout en LowP ou tout en HighP, ensuite les « Effet exsudats » où au moment du contact les spores ont été interchangées avec les plantes, et les « Effet arrosage » réalisés en jouant sur l'arrosage durant le contact.

B : nombre de structures mycorhiziennes observées sur l'ensemble du système racinaire, on note les hyphopodes, les débuts d'infection (= lorsque le champignon est rentré dans la racine mais n'a pas encore formé d'arbuscule = Rentré), les zones de mycorhization avec arbuscules (= Mycorhize). (+/- l'erreur type (SEM), n = 6 plantes par condition).

des exsudats de *M. truncatula* LowP ou HighP (HP-Mt, 3,75 mM). Parallèlement des plantules de *M. truncatula* sont semées dans un petit pot sans fond fermé par du nylon et sont cultivées pendant 10 jours en LowP ou HighP (HP-Mt). Cette durée de culture permet d'obtenir un système racinaire réduit et de pouvoir observer l'interaction sur l'ensemble du système racinaire. Le nylon est ensuite enlevé et les racines sont mises au contact des spores. Quatre à cinq jours plus tard, les différents stades de l'interaction sont dénombrés (Figure 27-B). On note sur l'ensemble du système racinaire le nombre d'hyphopodes présents à la surface de l'épiderme, le nombre de fois où le champignon a réussi à rentrer dans les racines mais n'a pas encore formé d'arbuscules (appelé « rentré ») et le nombre de colonisation ayant donné des arbuscules (appelé « mycorhize »).

Nous pouvons voir pour les conditions témoins LowP (spores traitées avec des exsudats LowP, placées en contact avec des plantes LowP et arrosées avec du LowP = sLP/pLP/aLP) que le système racinaire est bien infecté par le champignon, de nombreux points de colonisation ont donné lieu à la mise en place d'arbuscules. Pour les témoins HighP (sHP/pHP/aHP), nous observons en revanche peu ou pas d'hyphopodes et peu ou pas de colonisation des racines. Ces témoins confirment les résultats obtenus en pot dans des conditions de mycorhization plus classiques et valident le système expérimental. Cela permet ainsi d'utiliser ce système pour découpler l'effet qui pourrait être lié à la stimulation (ou non) des spores par les exsudats, à l'état de la plante lorsqu'un champignon vient à sa rencontre ou encore à la solution d'arrosage durant le contact. Pour regarder l'importance de l'effet des exsudats végétaux sur la stimulation (ou non) des spores durant le contact, des spores sont traitées avec des exsudats LowP ou HighP mais au moment du contact avec les racines elles sont placées avec des plantes HighP ou LowP respectivement (l'arrosage est alors laissé le même que celui utilisé à l'origine pour les plantes) (conditions appelées « essais exsudats » correspondant à sLP/pHP/aHP et sHP/pLP/aLP). On remarque pour la condition sLP/pHP/aHP que bien que les spores soient stimulées avec des exsudats LowP, peu de colonisation est observée par rapport aux témoins LowP. De même la condition inverse sHP/pLP/aLP les plantes sont encore bien colonisées malgré le fait que les spores aient été traitées avec des exsudats HighP. On pouvait cependant se demander si l'environnement dans lequel étaient les spores durant les 5 jours de contact (arrosage) ne peut pas influencer ces réponses. Ainsi, nous avons fait varier l'arrosage durant la période de contact entre les spores et les plantes (conditions appelées « essais arrosage »).

correspondant à sLP/pLP/aHP et sLP/pHP/aLP). On remarque que l'arrosage durant cette période n'influence pas le résultat, les racines en condition sLP/pLP/aHP sont aussi colonisées que si l'arrosage avait été LowP (témoin LowP). De même la présence de LowP ne favorise pas la mycorhization de la condition spores LowP avec des plantes HighP. Les solutions d'arrosage n'influent donc pas l'infection durant les quelques jours de contact. L'ensemble de ces résultats nous permet de tirer plusieurs conclusions :

- les exsudats HighP ne contiennent pas d'inhibiteurs fort du champignon, puisque lorsque des spores HighP sont placées avec des plantes LowP, elles sont capables de coloniser fortement ces plantes.
- le fait de stimuler des spores avec des exsudats provenant de plantes LowP ne suffit pas pour restaurer la mycorhization de plantes HighP, signe que malgré le fait que les exsudats végétaux diffèrent selon le phosphate, c'est au niveau de la plante que le contrôle a lieu.

3 – 4/ Bilan sur les signaux diffusibles végétaux

L'ensemble de nos résultats indiquent que les signaux diffusibles végétaux présents dans les exsudats racinaires sont différents selon les conditions de fertilisation phosphatée : d'une part les strigolactones voient leur production inhibée par le phosphate (Figure 21), et d'autre part les extraits d'exsudats produits en LowP ou HighP n'ont pas la même activité sur la ramification du champignon (Figures 23-A et 23-B). L'utilisation d'extrait d'exsudats (résultats Figures 23-A et 23-B) et l'étude des exsudats bruts dans diverses expériences de mycorhization vont globalement plutôt à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle des molécules inhibitrices du champignon seraient produites en condition HighP (Figures 24-B, 25-B et 27-B). Des molécules activatrices (strigolactones, et éventuellement d'autres) sont exsudées par des plantes en LowP mais leur absence dans les exsudats HighP ne suffit pas pour expliquer la forte réduction de mycorhization en condition HighP (Figures 25-B et 27-B). Les résultats des expériences « double-cone » vont même plus loin et nous permettent de conclure que la plante (et non les exsudats) est l'élément ayant le plus de poids dans la régulation (Figure 27-B). Ces résultats indiquent que même si avec une approche métabolomique on arrivait à identifier d'autres molécules dans les exsudats LowP, ils ne

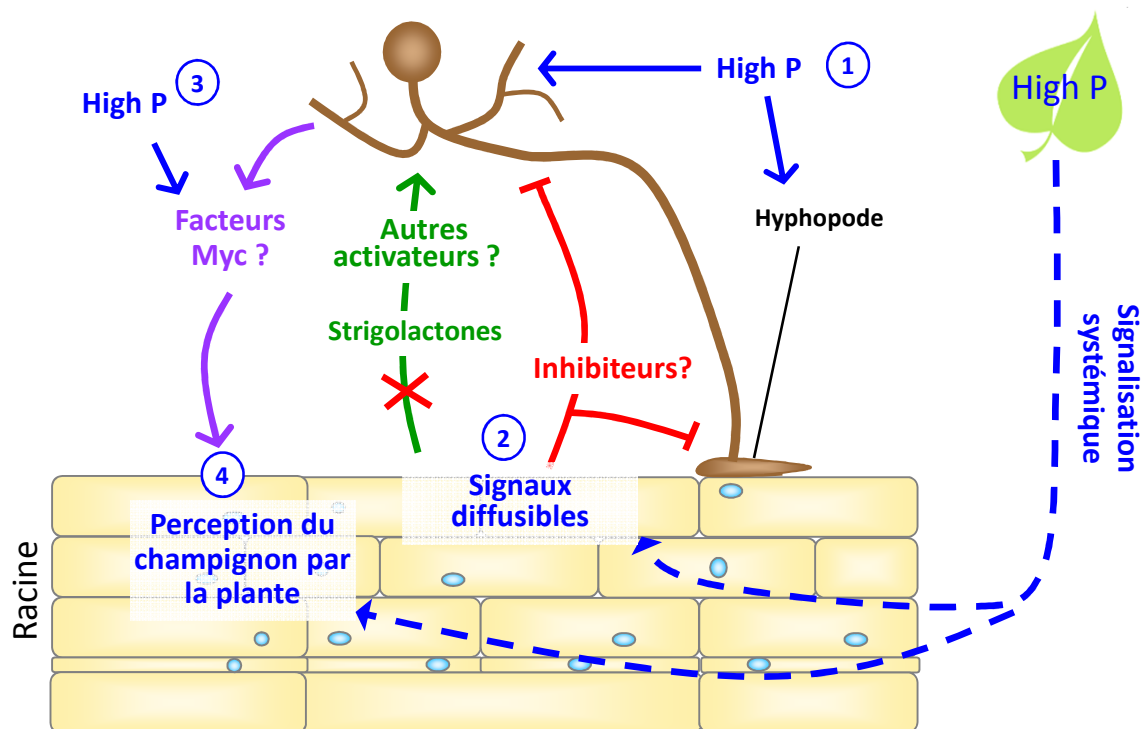


Figure 28 : Schéma de mécanismes régulateurs hypothétiques pouvant expliquer le phénotype mycorhizien observé en HighP.

- ① - Rôle direct du phosphate sur le développement du champignon (hypothèse écartée par plusieurs approches dont les expériences de split-roots)
- ② - Rôles des signaux diffusibles : absence de signaux activateurs (en plus des strigolactones), présence de signaux inhibiteurs dans les exsudats racinaires
- ③ - Effet direct ou indirect (via la plante) du HighP sur le champignon entraînant une modification de la production de signaux diffusibles fongiques
- ④ - Perturbation de la perception des signaux fongiques par la plante en condition HighP (champignon pas/mal reconnu)

permettraient surement pas de restaurer la mycorhization en HighP. Ainsi le contrôle de la mycorhization par la plante fait intervenir d'autres mécanismes forts de régulation.

4/ Autres mécanismes régulateurs possibles

Parmi les mécanismes de régulation possibles, un effet direct du phosphate (HighP) sur le champignon (hypothèse n°1) a été rapidement écarté par nos résultats (bioessais, conditions HighP pois versus *M. truncatula*, mais surtout split-roots). Ensuite, au-delà de l'échange de signaux diffusibles pendant la phase pré-symbiotique (Figure 28, hypothèse n°2), différents mécanismes régulateurs peuvent être imaginés comme intervenant dans le contrôle de la formation des hyphopodes en condition HighP. Le schéma présenté en Figure 28 présente quelques-unes de ces hypothèses alternatives développées ci-dessous.

4 – 1/ Hypothèse n°3 : signalisation fongique perturbée en HighP

La fertilisation HighP pourrait réguler la production de signaux diffusibles fongiques soit directement, soit plus vraisemblablement via la plante. Bien que les spores germent, se développent et répondent correctement aux strigolactones en condition HighP, on peut imaginer que la présence (ou l'absence) de signaux diffusibles d'origine végétale pourrait affecter la production par le champignon de signaux diffusibles (notamment les facteurs Myc) normalement produits par le champignon. Le partenaire fongique ne serait alors plus reconnu par la plante, cette dernière n'activerait pas les mécanismes nécessaires à l'accueil du champignon dans les racines. Cette hypothèse est cependant difficile à vérifier, surtout si l'on cherche à identifier et/ou quantifier les molécules qui pourraient intervenir.

Concernant les Myc-LCO, signaux fongiques récemment identifiés (Maillet *et al.*, 2011), il aurait été pertinent de chercher à savoir si la présence de phosphate dans le milieu affecte la production de ces signaux par le champignon. Les difficultés de production (grande quantité de spores nécessaires, très grande variabilité de production...) et de détection de ces molécules ont représenté un frein à l'étude de leur production par le champignon en fonction du phosphate. De plus, l'ensemble des molécules produites par le champignon nécessaires à l'établissement de l'interaction ne peut probablement pas se limiter aux seuls

Myc-LCO. Nous pouvons imaginer qu'au moment de la formation des hyphopodes des molécules fongiques spécifiques à la différenciation de cette structure soient produites. L'identification de ces molécules par des méthodes biochimiques semble impossible au vu de la difficulté d'analyser l'environnement immédiat des hyphopodes.

4 – 2/ Hypothèse n°4 : perception du champignon perturbée en HighP

Enfin, en condition HighP, la plante pourrait également ne plus reconnaître le champignon comme un partenaire symbiotique. Les racines en HighP pourraient ne plus percevoir les signaux fongiques exsudés par les spores ou présents au moment du contact des hyphes au niveau de l'épiderme (absence de récepteurs nécessaires, ou bien perception des signaux mais blocage dans la signalisation). La plante pourrait aussi percevoir correctement le champignon, mais au lieu d'activer des mécanismes de symbiose, favoriser la mise en place d'une défense efficace laissant le champignon hors des racines.

Dans la suite du projet, j'ai plus particulièrement axé mon travail sur les questions et approches liées à la signalisation plante-champignon (hypothèse n°4). Dans le Chapitre II/ seront développées les approches abordant les aspects de perception du champignon par la plante.

CHAPITRE II/ Effet du phosphate sur la perception du champignon par la plante

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le champignon serait différenciellement perçu par la plante en fonction de sa nutrition phosphatée, nous avons utilisé deux approches différentes. Elles sont basées sur des réponses connues comme induites chez les plantes suite à la perception de signaux diffusibles produits par les champignons MA (voir introduction partie 1 – 4/) : les oscillations calciques et l'expression de gènes. Ces deux types de réponses ont été étudiés chez *M. truncatula* et sont rapportés dans les deux parties suivantes.

1/ Etude des oscillations calciques nucléaires

1 – 1/ Introduction : les réponses calciques lors de la nodulation et de la mycorhization

1 – 1a/ Réponses calciques lors de la nodulation

La première étude mettant en évidence l'existence d'oscillations calciques lors de la nodulation montre des poils absorbants de racines de *Medicago sativa* traitées avec des Facteurs Nod. Des oscillations calciques sont alors enregistrées au niveau cytoplasmique grâce à un marqueur calcique chimique micro-injecté dans les poils absorbants (Ehrhardt *et al.*, 1996). Cette réponse s'est avérée dépendante de *DMI1* et *DMI2* mais indépendante de *DMI3* chez *M. truncatula*. Elle a été retrouvée chez le pois (grâce à des marqueurs chimiques micro-injectés) où elle a été caractérisée dans la zone proche du noyau (Walker *et al.*, 2000) puis chez le lotier (grâce à une sonde Cameleon cytoplasmique) (Miwa *et al.*, 2006). Des oscillations calciques ont ensuite été retrouvées chez *M. truncatula* au niveau du noyau grâce à l'utilisation d'une sonde Cameleon nucléaire, ces réponses calciques étant aussi dépendantes de *MtNFP*, *MtDMI1* et *MtDMI2* et indépendantes de *MtDMI3* (Sieberer *et al.*, 2009). Le fait qu'une CCaMK (calmoduline-kinase dépendante du calcium) (*LjCCaMK/MtDMI3*) pressentie pour le décodage des oscillations calciques soit nécessaire pour la nodulation mais aussi la mycorhization, laisse supposer que des oscillations calciques interviennent aussi dans l'interaction avec les champignons MA.

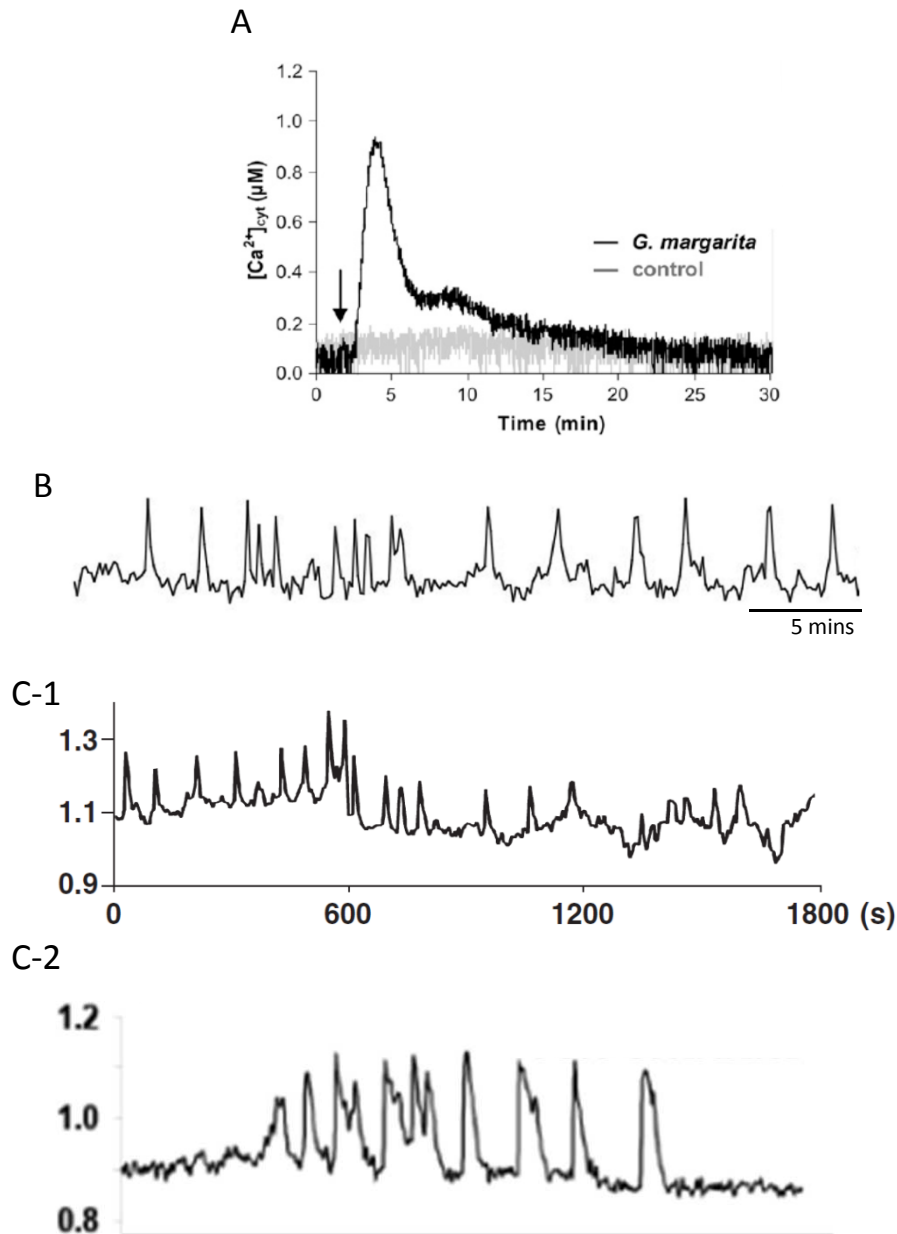


Figure 29 : Les réponses calciques induites par les champignons MA.

A : influx cytosolique : un influx calcique est obtenu dans des cellules de soja en culture traitées par exsudats de spores de *Gigaspora margarita* en germination (sonde aequorine cytoplasmique) (Navazio *et al.*, 2007).

B : oscillations calciques cytoplasmiques : des plantules de *M. truncatula* sont inoculées *in vitro* par du champignon *R. irregularis*. Avant le contact avec le champignon les poils absorbants répondent à la présence du champignon par des oscillations calciques cytoplasmiques (sonde Cameleon YC2.1 cytoplasmique) (Kosuta *et al.*, 2008).

C : oscillations calciques nucléaires : des « hairy-roots » de *M. truncatula* inoculées *in vitro* par des spores de *Gigaspora gigantea* répondent à la formation d'hyphopode par des oscillations calciques nucléaires (C-1). Une racine traitée avec des exsudats de spores en germination (GSE) produit des oscillations calciques nucléaires irrégulières (C-2) (sonde Cameleon 35S-NupYC2.1 nucléaire) (Chabaud *et al.*, 2011).

1 – 1b/ Réponses calciques lors de la mycorhization

La première étude faisant référence aux réponses calciques lors de l'interaction avec des champignons MA date de 2007. Des exsudats de spores en germination de *Gigaspora margarita* induisent un influx calcique cytoplasmique dans des cultures cellulaires de soja (Navazio *et al.*, 2007) (Figure 29-A). Une étude utilisant une sonde Cameleon cytoplasmique montre ensuite l'existence de réponses type oscillations calciques au niveau des poils absorbants proches d'hyphes mycorhiziens hyper-ramifiés (Kosuta *et al.*, 2008) (Figure 29-B). Cette réponse est dépendante de *MtDMI1* et *MtDMI2* et indépendante de *MtDMI3*.

Puis l'utilisation d'une sonde Cameleon nucléaire exprimée par des cellules racinaires permet de retrouver des oscillations calciques dans les noyaux des cellules végétales présentes au niveau des hyphopodes formés par le champignon (Chabaud *et al.*, 2011) (Figures 29-C-1). Dans la même étude, ces racines contenant la sonde Cameleon sont aussi utilisées pour examiner les réponses calciques dans les noyaux des cellules racinaires traitées avec des exsudats de spores en germination (Germinated Spore Exudates ou GSE) (Chabaud *et al.*, 2011) (Figures 29-C-2). Ces réponses calciques ont été observées dans des racines en culture de carotte (*Daucus carota*, plante non nodulable) et de *M. truncatula* chez qui ces oscillations sont dépendantes de *MtDMI1* et *MtDMI2* et indépendantes de *MtNFP* et *MtDMI3*. En réponse aux GSE, les réponses calciques ont principalement lieu dans la zone racinaire comportant des atrichoblastes (cellules épidermiques racinaires sans poils absorbants), et pour une racine donnée elles sont très variables d'un noyau à l'autre (en termes de hauteur et fréquence des pics) (Chabaud *et al.*, 2011). Cette sonde Cameleon nucléaire a pour principal intérêt de pouvoir étudier les oscillations calciques nucléaires dans plusieurs cellules en parallèle, mais surtout de pouvoir suivre ces réponses dans des racines au cours de l'infection par un champignon MA (ou des bactéries symbiotiques) (Sieberer *et al.*, 2012).

1 – 2/ Présentation du système Cameleon 35S-NupYC2.1

Le système permettant de suivre les concentrations en calcium présentes dans le noyau est basé sur l'expression d'une sonde Cameleon (35S-NupYC2.1). La sonde Cameleon YC2.1 (Yellow Cameleon) a été construite par Miyawaki *et al.*, (1999), puis elle a été couplée à une séquence d'adressage au noyau (la nucléoplasmine) pour former la NupYC2.1

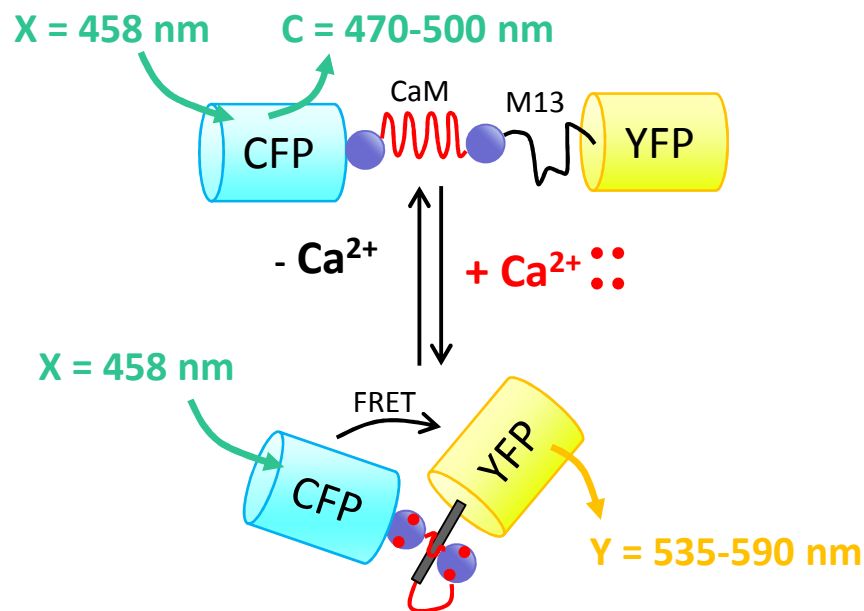


Figure 30 : Principe de la sonde Cameleon et du FRET (adapté d'après Ko *et al.*, 2011).

- La sonde Cameleon YC2.1 est une protéine de fusion composée de 4 domaines : la CFP (Cyan Fluorescent Protein), reliée à une CaM (Calmoduline ayant 4 domaines de liaison au calcium), puis un domaine M13 (domaine de liaison favorisant le repliement de la protéine en présence de calcium et donc favorisant le FRET) et la YFP (Yellow Fluorescent Protein).

- Principe du FRET : Lorsqu'il n'y a pas d'ion calcium, la sonde Cameleon est la CFP (donneur FRET) est physiquement distante de la YFP (accepteur FRET). Dans ces conditions, lorsque la CFP est excitée à une longueur d'onde donnée « X », la CFP émet à une longueur d'onde « C ».

Lorsque du calcium est présent, il se lie au niveau de la CaM induisant un changement de conformation de la sonde, rapprochant la partie CFP de la partie YFP. Si l'échantillon est excité à une longueur d'onde « X », un transfert d'énergie a lieu entre la CFP excitée capable lors de son émission d'exciter à son tour la YFP favorisant l'émission à la longueur d'onde « Y » de la YFP.

(Watahiki *et al.*, 2004). L'équipe de David Barker (LIPM : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, UMR CNRS-INRA 2594/441, Castanet-Tolosan) a récupéré la sonde NupYC2.1 auprès de M. Watahiki (Université Hokkaido, Sapporo, Japon), à laquelle ils ont ajouté un promoteur 35S pour former la sonde Cameleon 35S-NupYC2.1 (Sieberer *et al.*, 2009).

La sonde Cameleon YC2.1 est une protéine de fusion composée de 4 domaines : la CFP (Cyan Fluorescent Protein), reliée à une CaM (Calmoduline ayant 4 domaines de liaison au calcium), puis un domaine M13 (peptide de liaison à la CaM de la chaîne légère de la myosine = domaine de liaison favorisant le repliement de la protéine en présence de calcium et donc favorisant le FRET), et la YFP (Yellow Fluorescent Protein) (Miyawaki *et al.*, 1999) (Figure 30). La mesure de la concentration en calcium via la sonde Cameleon est basée sur le système de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer ou Förster Resonance Energy Transfer) (Figure 30). Lorsqu'il n'y a pas d'ion calcium, la sonde Cameleon est dans un état « relâché » où la partie CFP (donneur) est physiquement distante de la partie YFP (accepteur). Dans ces conditions, lorsque la CFP est excitée à une longueur d'onde donnée « X », la CFP émet de la fluorescence à une longueur d'onde « C ». Lorsque du calcium est présent, il se lie au niveau de la CaM induisant un changement de conformation de la sonde, rapprochant la partie CFP de la partie YFP. Dans cette configuration la CFP excitée émet une fluorescence à une longueur d'onde « C » qui va cette fois exciter la YFP par transfert d'énergie. Cette dernière fluoresce alors à une longueur d'onde « Y ». Ainsi, une mesure dans le temps de la fluorescence aux deux longueurs d'onde « C » et « Y » permet d'estimer les variations de concentrations calciques en calculant le rapport suivant : (fluorescence YFP/fluorescence CFP) (Miyawaki *et al.*, 1997). Si le rapport augmente c'est que la concentration en calcium augmente dans le système.

C'est cette même sonde Cameleon nucléaire (35S-NupYC2.1) qui a été utilisée pour notre étude portant sur l'effet du phosphate sur les oscillations calciques en réponse au champignon. Pour cela, nous avons entamé une collaboration avec David Barker et Mireille Chabaud du LIPM, équipe qui a adapté cet outil Cameleon nucléaire à l'étude des endosymbioses racinaires. Notre objectif était de comparer les réponses calciques dans des conditions LowP et HighP soit en présence du champignon (sous les hyphopodes), soit suite à un traitement par des signaux fongiques.

1 – 3/ Effet du phosphate sur les oscillations calciques nucléaires

1 – 3a/ Conditions d'étude des réponses calciques nucléaires végétales

Dans un premier temps, la sonde a été utilisée dans des racines en culture « hairy-roots » exprimant la 35S-NupYC2.1 (Chabaud *et al.*, 2011). Les « hairy-roots » sont en fait des racines issues de la transformation par *Agrobacterium rhizogenes*, qui peuvent pousser en boîte de Petri en absence de partie aérienne si l'on apporte du sucre dans le milieu gélosé. Ces racines peuvent être inoculées et mycorhizées *in vitro* par des champignons MA et sont donc particulièrement utiles pour observer le développement du champignon à l'approche de la racine (Bécard & Fortin, 1988). Des plantes transformées de façon stable avec la sonde Cameleon 35S-NupYC2.1 ont aussi été utilisées afin d'intégrer une potentielle régulation issue des parties aériennes. Elles ont été générées par Céline Remblière (service de transgénèse du LIPM) selon le protocole de Chabaud *et al.*, 2003. Les résultats présentés ici concernant la régulation phosphatée des réponses calciques ont été obtenus par Mireille Chabaud et moi-même.

La collaboration avec l'équipe de David Barker nous a amené à considérer un nouveau signal mycorhizien potentiel : des petits oligomères chitiniques (notamment des tétramères de N-actétylglucosamine ou CO₄). En effet, cette équipe en collaboration avec Andrea Genre et Paola Bonfante (Université de Turin, Italie), ont cherché à déterminer la nature du signal fongique présent dans les GSE capables de déclencher des réponses calciques nucléaires dans les racines. Ils ont montré que le traitement des GSE par des chitinases aboutissait à la perte des réponses calciques (Genre *et al.*, manuscrit en préparation). Des expériences complémentaires ont ensuite mis en évidence que des CO purs (CO₄ et CO₅) pouvaient induire des réponses calciques similaires à celles obtenues par des GSE. Ces oscillations, observées dans des racines « hairy-roots » de *M. truncatula* où il a été montré qu'elles étaient dépendantes de *MtDMI1* et *MtDMI2* et indépendantes de *MtNFP* et *MtDMI3*, elles ont également été retrouvées dans des racines de plantes entières. Des oscillations similaires ont aussi été obtenues dans des racines « hairy-roots » de carotte mais pas dans des racines « hairy-roots » de la plante non-hôte *A. thaliana*. Ces CO courts ont ensuite été retrouvés par spectrométrie de masse dans les GSE de *R. irregularis*, et lorsque les spores ont été traitées avec du GR24 lors de la production de GSE, les teneurs en

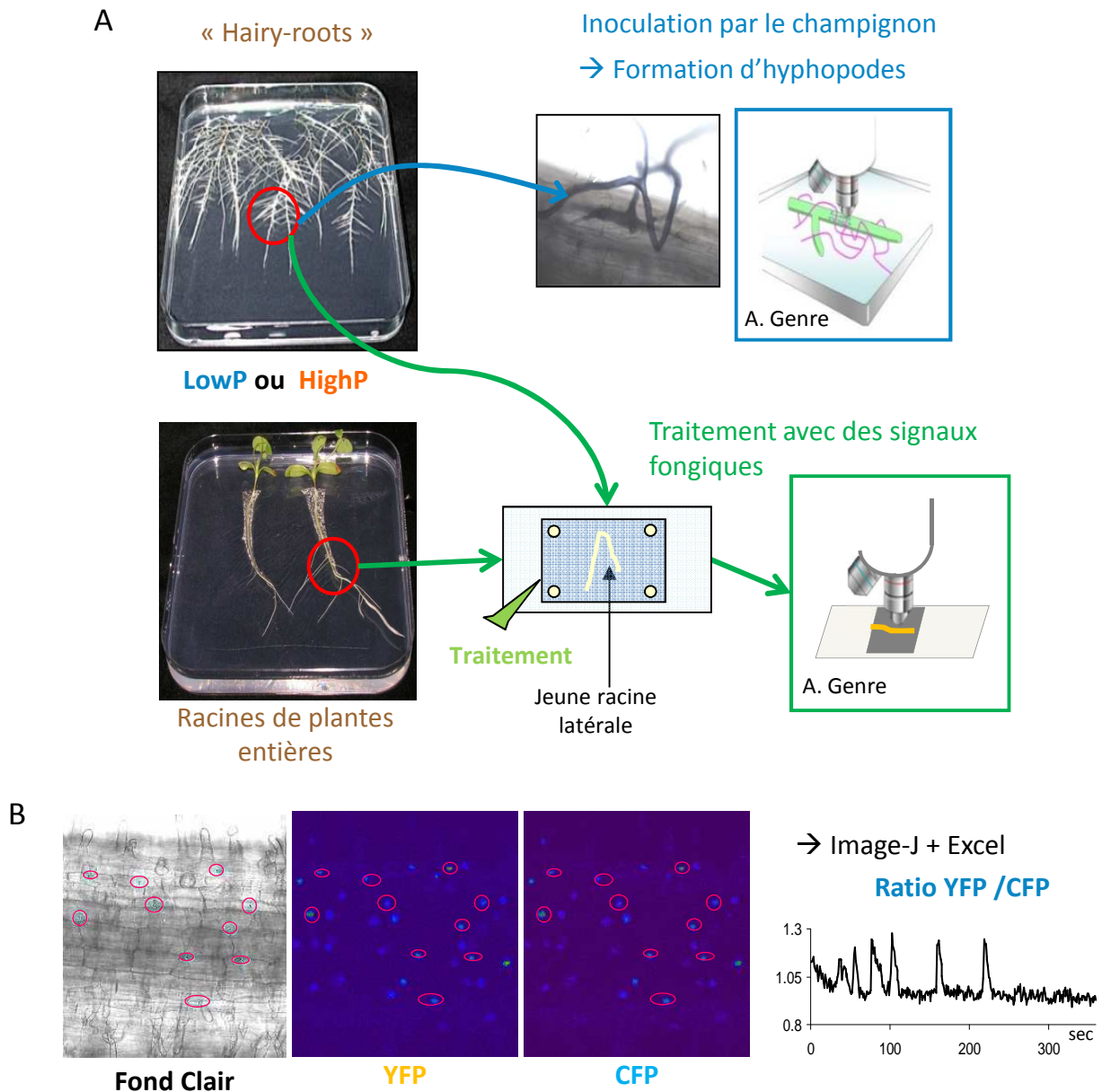


Figure 31 : Etude des oscillations calciques nucléaires dans les racines.

A : schéma du système expérimental : des racines « hairy-roots » ou de plantes entières exprimant la sonde nucléaire Cameleon 35S-NupYC2.1 sont utilisées :

- soit les racines sont inoculées avec du champignon et les réponses calciques sont observées directement dans la boîte dans les cellules situées sous les hyphopodes du champignon.
- soit une jeune racine latérale est prélevée et placée entre lame et lamelle et un traitement avec une solution contenant des signaux fongiques est appliqué sous la lamelle. Les réponses calciques sont ensuite observées.

B : données obtenues et transformation en graphe : lors de l'enregistrement des images au microscope confocal, à chaque acquisition 3 images sont générées : une image en fond clair, une image correspondant à la fluorescence de la YFP et une pour la CFP. Une acquisition est faite toutes les 5 secondes pendant 10 ou 30 minutes. Les valeurs de fluorescence de la YCP et de la CFP de chaque noyau sont ensuite récupérées avec le logiciel Image-J et le rapport (YFP/ CFP) est calculé avec Excel pour obtenir une représentation graphique des oscillations calciques mesurées par noyau.

CO₄ et CO₅ ont augmenté de façon importante. L'ensemble de ces résultats a conduit à proposer que les petits CO représentent un nouveau type de signal produit par les champignons MA et potentiellement impliqué dans la symbiose (Genre *et al.*, manuscrit en préparation). Durant ma thèse, j'ai pris part à ce projet « CO » en participant à la production de GSE par différents champignons MA, permettant la mise en évidence de la présence de CO courts dans les GSE et l'induction de leur production par les strigolactones. Pour étudier l'influence du phosphore sur les mécanismes de signalisation précoce entre les partenaires de la symbiose MA, Mireille Chabaud (LIPM) et moi-même avons exploité cette activité des CO₄ sur les oscillations calciques. Ces molécules sont commercialement disponibles, relativement aisées à manipuler et leur activité biologique est mesurable de façon suffisamment reproductible pour être étudiée dans différentes conditions expérimentales. Elles ont aussi été utilisées dans la partie suivante consacrée à l'effet du phosphate sur la régulation de l'expression génique.

Ainsi, nous avons examiné les réponses calciques nucléaires dans plusieurs matériels biologiques exprimant la sonde 35S-NupYC2.1 sous différentes conditions expérimentales (illustration en Figure 31-A) :

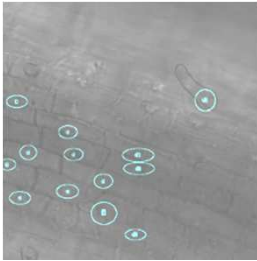
- des « hairy-roots » inoculées avec du champignon MA ont permis d'enregistrer les réponses calciques nucléaires dans les cellules racinaires situées sous les hyphopodes.
- des racines provenant de « hairy-roots » ou de plantes entières ont été traitées avec des molécules fongiques (GSE ou CO₄) et les réponses calciques nucléaires ont été enregistrées suite au traitement.

Les « hairy-roots » ou les plantes entières ont été cultivées pendant environ deux semaines sur milieu M (Bécard & Fortin, 1988) contenant plus ou moins de phosphate. Les conditions LowP représentent ici 7,5 µM ou 35 µM de phosphate (35 µM correspond à la concentration dans le milieu M normal) et les conditions HighP correspondent à 3,5 mM ou 3,75 mM (selon que les expériences ont été menées sur des racines préparées par Mireille ou moi-même).

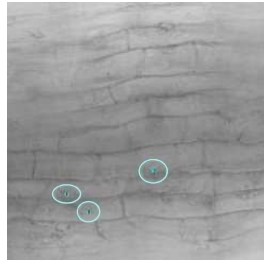
Dans toutes les observations réalisées, une racine est observée à la fois. Une acquisition est faite toutes les 5 secondes pendant la durée d'enregistrement. A chaque acquisition 3 images sont enregistrées : une image en fond clair, une image correspondant à

Racines LowP

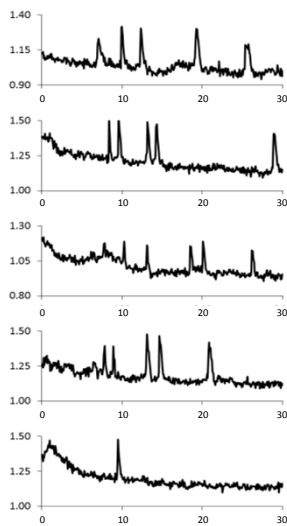
A-1



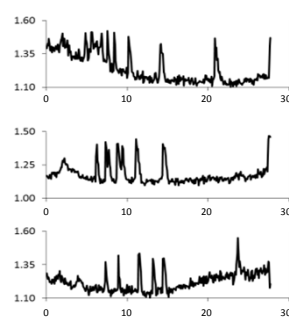
A-2



B-1

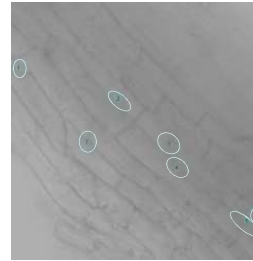


B-2

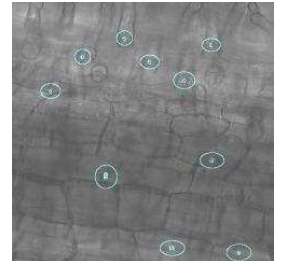


Racines HighP

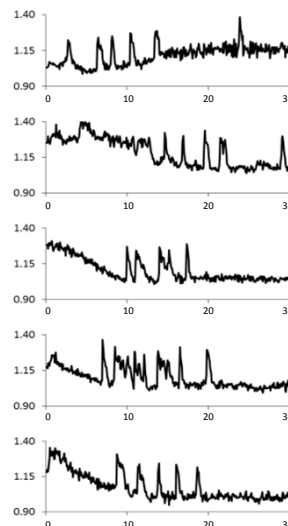
C-1



C-2



D-1



D-2

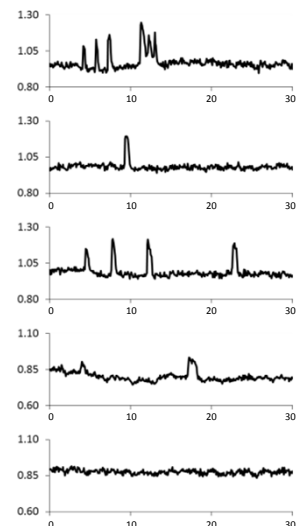


Figure 32 : Oscillations calciques nucléaires en réponse à un traitement avec des CO_4 à 10^{-8}M .

Des racines « hairy-roots » exprimant la sonde Cameleon nucléaire 35S-NupYC2.1 sont cultivées en LowP ou HighP. Une racine latérale est prélevée, placée entre lame et lamelle et traitée avec 100 μL de CO_4 à 10^{-8}M . Les réponses calciques sont mesurées durant 30 minutes dans une dizaine de noyaux présents dans le plan focal.

- A, C : images en fond clair des racines traitées en LowP (A-1 et A-2) ou HighP (C-1 et C-2), un rond bleu clair délimite chaque noyau étudié durant l'enregistrement.

- B, D : graphes représentant les oscillations calciques mesurées pendant 30 minutes dans plusieurs noyaux différents en LowP (B-1 et B-2) ou en HighP (D-1 et D-2). Légendes des graphes : ordonnée = unité arbitraire du rapport (fluorescence FYP/fluorescence CFP); abscisse = temps (minutes).

Les résultats illustrés proviennent de 4 expériences différentes (voir Tableau 3 suivant).

la fluorescence en YFP et une à la fluorescence en CFP (Figure 31-B). Les valeurs de fluorescence en CFP et YFP sont ensuite récupérées grâce au logiciel Image-J et le rapport (fluorescence YFP/fluorescence CFP) est calculé sous Excel. Les graphes correspondants aux oscillations calciques sont ensuite générés. Il est important de noter que pour chaque enregistrement, les valeurs de fluorescences émises par l'ensemble des noyaux situés dans le plan focal peuvent être récupérées, et donc plusieurs noyaux (jusqu'à une dizaine) sont observables durant la même acquisition. Lors de l'analyse des images, on peut ainsi calculer le nombre de noyaux qui répondent positivement par la formation d'oscillations (est considéré positif, un noyau formant au moins un pic durant l'enregistrement), et donc un pourcentage de noyaux positifs analysés par racine (on peut parler aussi de cellules positives). Ensuite, par noyau ayant répondu positivement, le nombre d'oscillations (ou pics) est recensé.

1 – 3b/ Signalisation calcique nucléaire végétale en réponse à des signaux fongiques (GSE et CO₄)

Quel que soit le traitement appliqué, l'échantillon racinaire a été préparé comme suit : une jeune racine latérale (en général 2^{ème} ordre, 1 cm de long environ) est prélevée stérilement et placée entre lame et lamelle sous laquelle le traitement est appliqué. La zone racinaire où les réponses sont enregistrées se situe à environ 5 mm de l'apex racinaire. Les signaux mesurés proviennent de l'épiderme ou parfois du cortex externe.

En condition LowP, suite à un traitement avec des CO₄ à 10⁻⁸M, les cellules racinaires répondent par des oscillations calciques. Entre 70 et 100 % (en moyenne 86 %) des noyaux observés répondent positivement avec en moyenne 4 oscillations par noyau sur une durée d'enregistrement de 30 min (Figures 32-A et 32-B) (Tableau 3). Cependant, on observe une très forte variabilité intra-racinaire d'un noyau à l'autre (hauteur des pics, fréquence, nombre de pics...). En condition HighP, les cellules répondent dans la majorité des cas (66 % des noyaux en moyenne), avec en moyenne 5 pics par noyau et une variabilité intra-racinaire toujours présente (Figures 32-C et 4-D) (Tableau 3).

Que ce soit en LowP ou HighP, une variabilité inter-racinaire assez forte s'ajoute à la viabilité intra-racinaire déjà présente. Ce phénomène est observé y compris pour des racines provenant de la même boîte et traitées le même jour avec la même solution de CO₄. Ces différents niveaux de variabilité compliquent fortement l'interprétation des données. Par

Tableau 3 : Les réponses calciques nucléaires induites par les traitements.

	n° manip	solution de reprise de l'échantillon	milieu de culture des racines	% cellules positives	nombre moyen de pics/ 30 min/ cellule positive	gamme du nombre de pics/ 30 min/ cellule positive
Hairy-roots CO4						
CO4 ★	M3	eau	LP 35 µM	92	4,50	1 à 9
CO4 (20 min)		eau	LP 35 µM	86	3,00	2 à 5
CO4	M4	eau	LP 35 µM	70	2,00	1 à 5
CO4 ★	M13	LP 35 µM	LP 35 µM	100	7,33	7 à 9
CO4		LP 35 µM	LP 35 µM	70	3,14	1 à 5
Moyenne LP				84	4	
CO4	M3	eau	HP 3,5 mM	0		0
CO4		eau	HP 3,5 mM	93	10,69	7 à 15
CO4		eau	HP 3,5 mM	7		0 à 1
CO4 (20 min)		eau	HP 3,5 mM	90	5,56	0 à 10
CO4		eau	HP 3,5 mM	90	2,56	1 à 5
CO4 ★	M4	eau	HP 3,5 mM	80	2,50	1 à 6
CO4		eau	HP 3,5 mM	15	2,00	2
CO4	M5	eau	HP 3,5 mM	60	3,67	1 à 8
CO4	M13	HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	100	8,20	6 à 10
CO4		HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	87	1,46	0 à 2
CO4 ★		HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	100	7,00	5 à 12
Moyenne HP				66	5	
Plantes entières CO4						
CO4	M19	LP 35 µM	LP 35 µM	40		
CO4		LP 35 µM	LP 35 µM	40	5,25	1 à 10
CO4		LP 35 µM	LP 35 µM	90	7,00	5 à 10
CO4		LP 35 µM	LP 35 µM	100	8,60	1 à 15
CO4	M24	LP 35 µM	LP 35 µM	100	6,75	1 à 15
Moyenne LP				74	7	
CO4	M19	HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	80	3,00	2 à 4
CO4		HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	100	2,17	2 à 4
CO4		HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	100	9,50	4 à 13
CO4	M24	HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	100	2,57	1 à 5
CO4		HP 3,5 mM	HP 3,5 mM	100	3,29	1 à 5
Moyenne HP				96	4	
Hairy-roots GSE						
GSE <i>G.rosea</i>	M3	eau	LP 35 µM	47	3,57	2 à 5
GSE <i>G.rosea</i>		eau	HP 3,5 mM	27	2,75	2 à 4
Plantes entières GSE						
GSE <i>R.irregularis</i>	M24	eau	HP 3,5 mM	50	4,25	3 à 7

Réponses calciques enregistrées suite à un traitement avec des CO₄ à 10⁻⁸M ou des GSE effectué sur des racines provenant de « hairy-roots » ou de plantes entières. Sont répertoriés le % de cellules analysées qui répondent au traitement (en rouge) et le nombre de pics observés par cellule positive (en bleu). Les réponses calciques illustrées en Figure 32 sont notées par une étoile noire.

exemple en condition HighP, on voit que deux racines n'ont pas répondu au traitement CO₄ (Tableau 1) faisant baisser la moyenne de cellules positives analysées à 66 %. On peut cependant indiquer que les racines cultivées en HighP sont généralement capables de percevoir les CO₄ et d'y répondre par des oscillations calciques nucléaires de façon similaire à celles observées en condition LowP.

Des plantes entières ont aussi été utilisées. Ici les CO₄ sont appliqués dans une solution LowP ou HighP selon la fertilisation appliquée précédemment aux racines. Que ce soit en LowP ou HighP, les racines répondent très bien aux traitements appliqués avec en LowP en moyenne 74 % des noyaux qui répondent et 7 pics/cellule positive, et en HighP 96 % des noyaux qui répondent avec 5 pics/cellules positive (Tableau 3). Que ce soit en condition LowP ou HighP, la plante perçoit les CO₄ et est capable de former des réponses calciques nucléaires suite à cette perception. Nous savons que les parties aériennes sont importantes pour le contrôle de la mise en place de certaines réponses à la carence phosphatée. Les réponses calciques obtenues en « hairy-roots » similaires en LowP ou HighP auraient pu s'expliquer par une absence d'éléments régulateurs normalement émis par les parties aériennes. Le fait de trouver aussi des réponses calciques similaires dans des racines LowP ou HighP issues de plantes entières indique que ce n'est pas le cas.

Des essais ont aussi été réalisés avec des GSE. Ces derniers correspondent à un traitement plus complet que les seuls CO₄ pour représenter les signaux diffusibles fongiques auxquelles les racines sont susceptibles de répondre par des oscillations calciques. Les GSE de *Gigaspora rosea* induisent des réponses calciques qui semblent similaires dans les deux conditions LowP et HighP (Tableau 3). Un essai avec des exsudats de *R. irregularis* en condition HighP sur racine provenant d'une plante entière a également montré des oscillations calciques (Tableau 3). Le faible nombre de racines testées ne permet pas de conclure de façon certaine, mais il semble que les GSE n'induisent pas des réponses très différentes selon que la racine est issue d'une condition LowP ou HighP.

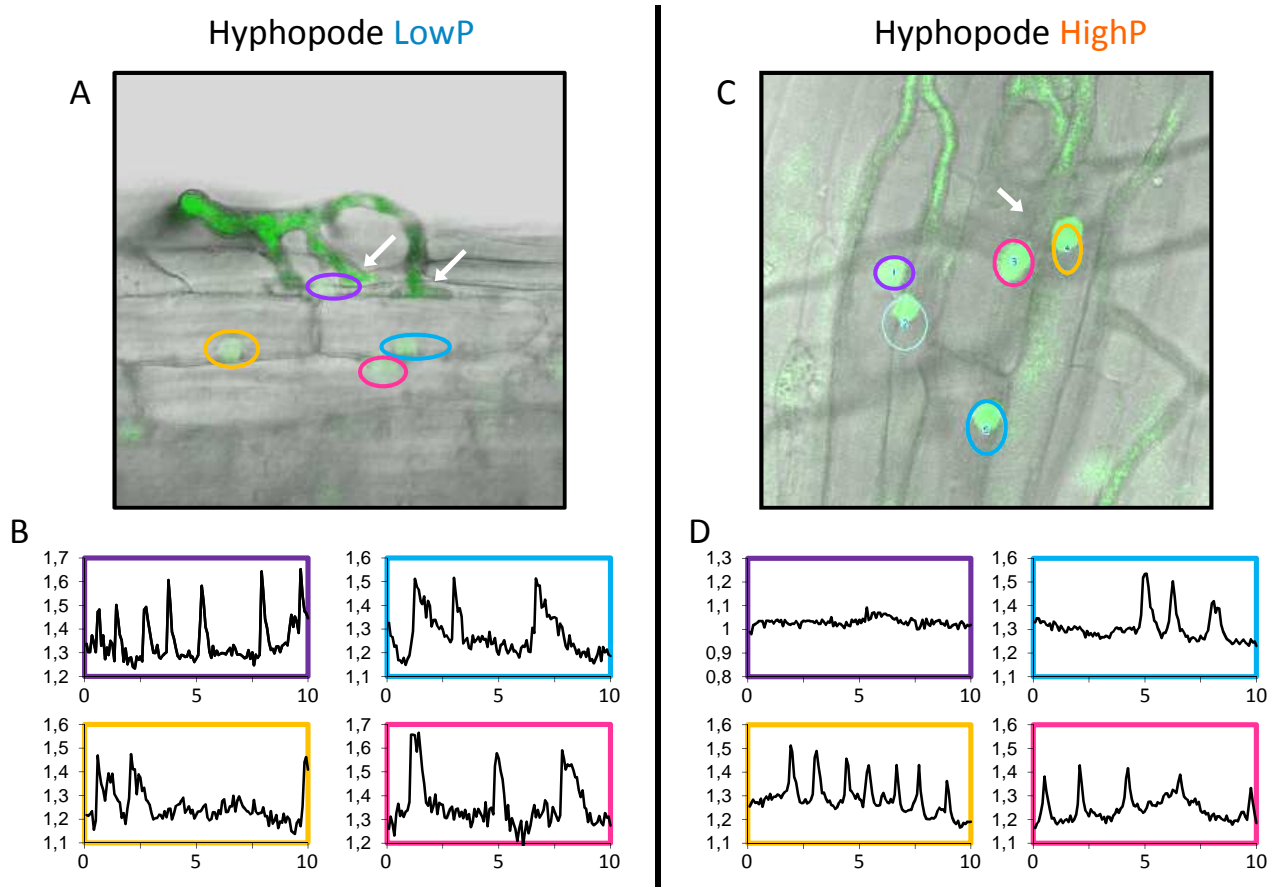


Figure 33 : Oscillations calciques dans les noyaux végétaux présents sous les hyphopodes.

Des racines « hairy-roots » exprimant la sonde Cameleon nucléaire 35S-NupYC2.1 sont cultivées en LowP ou HighP et sont inoculées par des spores de *Gigaspora gigantea*. 15 jours après inoculation, les réponses calciques sont mesurées durant 10 minutes dans les noyaux présents sous les hyphopodes.

- A, C : images des hyphopodes (flèches blanches) en LowP (A) ou HighP (C). Les images correspondent à une image fond clair sur laquelle les données de fluorescence récupérées par traitement d'image ont été rajoutées (en vert). On peut voir en vert les noyaux contenant la sonde Cameleon fluorescente, mais aussi les hyphes auto-fluorescents du champignon. Un rond coloré délimite chaque noyau étudié durant l'enregistrement. L'image A est prise presque perpendiculairement par rapport à la position de l'hyphopode. L'image C a été prise en dessous de l'hyphopode, ce dernier est visible par les hyphes gris foncés.

- B, D : graphes représentant les oscillations calciques mesurées dans les différents noyaux d'une racine en LowP (B) ou en HighP (D) (la couleur du graphe correspond à la couleur du noyau entouré). Légendes des graphes : ordonnée = unité arbitraire du ratio (fluorescence FYP/fluorescence CFP); abscisse = temps (minutes).

1 – 3c/ Signalisation calcique nucléaire dans les cellules racinaires au contact des hyphopodes

Des racines « hairy-roots » cultivées sur du milieu M LowP (35 μ M) ou HighP (3,5 mM) sont inoculées avec des spores de *Gigaspora gigantea*. Le tout est recouvert d'une membrane transparente appelée Biofolie qui permet une observation microscopique directement dans la boîte (le Biofolie remplaçant ici la lamelle). Environ 15 jours après l'inoculation, le développement du champignon est observé sous loupe binoculaire et les zones où les hyphes sont fortement ramifiés sont délimitées. Cette hyper-ramification correspond à la réponse caractéristique du champignon suite à la perception de signaux diffusibles végétaux, c'est dans ces zones que les hyphopodes ont les meilleures chances d'être trouvés. Ensuite les racines sont observées directement dans la boîte avec le microscope confocal, et les hyphopodes sont recherchés dans les zones sélectionnées. Les réponses calciques sont enregistrées dans les noyaux des cellules situées sous l'hyphopode durant 10 minutes.

Les conditions *in vitro* permettent ici de suivre le développement du champignon jusqu'à l'approche des racines. En LowP comme en HighP, le champignon germe et les hyphes se développent et se ramifient (jusqu'à environ 4 degrés de ramification) sur l'ensemble de la boîte. Les hyphes contournent le plus souvent les racines sans former de ramification, et dans quelques cas une hyper-ramification est observée. Cette hyper-ramification est beaucoup plus fréquente en LowP qu'en HighP, signe que le champignon perçoit des signaux diffusibles activateurs en condition LowP. En condition HighP, le champignon forme peu de structures hyper-ramifiées, mais son développement ne semble pas pour autant inhibé par de potentiels signaux végétaux inhibiteurs (pas d'arrêt de croissance ou de déviation des hyphes aux abords des racines HighP).

Suite à cette ramification, des hyphopodes sont produits à la surface des racines et, comme retrouvé dans les conditions d'inoculation en pot, il y a davantage d'hyphopodes en LowP qu'en HighP. Cette diminution du nombre d'hyphopodes se traduit par une moindre mycorhization des racines en condition HighP (par exemple : en HighP sur 2 boîtes inoculées il n'y a aucune zone avec arbuscules et 1 seul hyphopode, et en LowP 6 zones avec arbuscules et 3 hyphopodes). Dans la condition LowP, les noyaux des cellules présentes sous les hyphopodes (Figure 33-A) répondent par des oscillations calciques de forte fréquence

(exemple : graphe vert ; Figure 33-B), et les noyaux plus éloignés de l'hyphopode répondent moins fortement (exemples : graphes violet, jaune et rose ; Figure 33-B) (résultats similaires à ceux publiés par Chabaud *et al.*, 2011 et Sieberer *et al.*, 2012). Bien que difficiles à trouver en condition HighP, les hyphopodes induisent le même type de réponses calciques nucléaires (Figures 33-C et 33-D). Ainsi, ce qui est limité en condition HighP semble être la réponse d'hyper-ramification du champignon à l'approche des racines et la formation d'hyphopodes. Une fois l'hyphopode formé, la plante répond de la même façon à la présence du champignon à la surface de l'épiderme.

1 – 4/ Conclusion

Les plantes sont capables de percevoir le champignon (par les signaux diffusibles qu'il produit ou les hyphopodes qu'il forme à la surface des racines) et de répondre à sa présence par des oscillations calciques nucléaires. Ces réponses calciques nucléaires ont lieu quelles que soient les conditions de fertilisation phosphatée, signe que les racines perçoivent le champignon dans les deux conditions. L'utilisation de plantes entières transgéniques apporte les mêmes résultats que l'analyse de « hairy-roots », indiquant que les réponses calciques observées ne font pas intervenir une régulation via les parties aériennes. Bien que la perception du champignon menant aux réponses calciques ne semble pas perturbée par le phosphate, on peut envisager que les réponses en aval de cette voie (ou bien d'autres réponses pour le moment non caractérisées) sont affectées. En effet, des voies de perception et de signalisation parallèles faisant intervenir la signalisation phosphatée pourraient exister, régulant des réponses en aval ou indépendantes des réponses calciques étudiées ici.

Le système utilisé pour cette étude montre une forte variabilité de réponses pour un même traitement sur une racine donnée, variabilité exacerbée si l'on compare plusieurs racines entre elles. Il est donc possible que des différences existent entre les réponses obtenues en LowP et en HighP, mais que ces dernières soient trop difficiles à mettre en évidence à cause de cette variabilité. Il aurait fallu des différences plus nettes en termes de fréquence ou de nombre de cellules qui répondent pour pouvoir les identifier. Cela représente ici la principale limite du système tel que nous l'utilisons. Il faudrait pouvoir réaliser un plus grand nombre d'expériences indépendantes, mais ces expériences sont

lourdes à mettre en place (environ 8 explants racinaires maximum par jour lorsque il n'y a aucun problème). Le développement d'une analyse mathématique/statistique qui modéliserait les réponses (par exemple en créant différents profils de réponse caractéristiques, permettant de classer les oscillations observées dans différents groupes) serait un plus. Enfin, l'utilisation d'une sonde Cameleon plus dynamique ou surtout d'un système d'acquisition plus rapide pourrait peut-être révéler des différences non visibles actuellement avec notre système expérimental.

2/ Approche expression de gènes (Fluidgim®)

Parallèlement aux résultats concernant les réponses calciques qui laissent penser que le champignon est perçu par les plantes quelles que soient les conditions phosphatées, nous avons voulu savoir si les plantes répondaient aussi de façon identique à la présence du champignon en termes d'expression de gènes. Pour cela, nous avons analysé l'expression de plusieurs gènes chez des plantes de *M. truncatula* cultivées en LowP ou HighP soumises à différents traitements fongiques. Pour choisir les gènes à étudier, nous nous sommes en partie basés sur différentes données transcriptomiques disponibles issues de la littérature sur la symbiose MA.

2 – 1/ Synthèse bibliographique : étude de la symbiose mycorhizienne à travers des approches transcriptomiques

Plusieurs études ont fait appel à des approches transcriptomiques pour identifier des gènes végétaux impliqués dans l'établissement de la mycorhization (mis en revue dans Formey *et al.*, 2012).

La première étude sur puce à ADN a été réalisée en 2003 (Liu *et al.*, 2003) comparant l'expression de gènes de plantes de *M. truncatula* inoculées ou non par *Glomus versiforme*. 92 gènes ont été identifiés comme surexprimés lors de la mycorhization. De même en 2003, une analyse transcriptomique SSH (suppression subtractive hybridization) a été menée chez *M. truncatula* entre racines colonisées ou non (Wulf *et al.*, 2003). En 2004, une analyse transcriptomique a été réalisée pour comparer la nodulation et la mycorhization (Manthey *et al.*, 2004). Elle a montré l'existence de gènes communs ou spécifiques entre les deux

interactions. En 2005, l'analyse d'expression de gènes exprimés lors de la colonisation de *M. truncatula* par *R. irregularis* ou *Glomus mosseae* a permis de faire ressortir 201 gènes exprimés durant les 2 interactions (Hohnjec *et al.*, 2005).

Des études ont aussi cherché à cibler précisément chacune des étapes de la mycorhization, se confrontant à la complexité liée au développement asynchrone de cette interaction. Les gènes induits lors de la formation des hyphopodes ont été analysés chez *M. truncatula*, ces derniers sont aussi activés suite à perception de signaux mycorhiziens diffusibles et *MtDMI3* est nécessaire pour l'expression de ces gènes (Weidmann *et al.*, 2004). L'expression des gènes induits durant la formation du PPA a aussi été analysée (Siciliano *et al.*, 2007). Concernant les arbuscules, la microdissection laser a permis notamment d'isoler les cellules végétales hébergeant ces structures pour mettre en évidence les gènes qui y étaient induits spécifiquement (Hogekamp *et al.*, 2011 ; Gaude *et al.*, 2012). Ces deux dernières études ont notamment examiné avec attention l'expression de différents transporteurs permettant les échanges entre les deux partenaires (Hogekamp *et al.*, 2011).

Des études transcriptomiques ont aussi été réalisées chez d'autres espèces mycotrophes comme le riz (Güimil *et al.*, 2005), le lotier (Kistner *et al.*, 2005 ; Deguchi *et al.*, 2007 ; Guether *et al.*, 2009a) ou le pétunia (Breuillin *et al.*, 2010) permettant de faire ressortir des gènes « myc » communs entre ces plantes.

Parmi les gènes exprimés lors de l'interaction mycorhizienne issus de ces analyses, des gènes reliés à des mécanismes de défense sont souvent apparus. En effet, il est connu que des réponses dites « de défense » soient mises en place lors de l'interaction mycorhizienne (Harrison & Dixon, 1993 ; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Ruiz-lozano *et al.*, 1999 ; Guenoune *et al.*, 2001). Ces réponses sont de faible amplitude et transitoires. Elles comprennent l'expression de gènes tels qu'une chalcone synthase, des PR protéines (PR10), et des chitinases retrouvés chez *M. truncatula* ou le pois (Ruiz-lozano *et al.*, 1999; Bonanomi *et al.*, 2001 ; Salzer *et al.*, 2000). Une étude réalisée chez le riz a comparé les réponses obtenues lors de l'infection par deux agents pathogènes ou par un champignon mycorhizien. Elle indique que l'expression de 40 % des gènes affectés par la mycorhization est aussi affectée dans les mêmes sens par au moins un des deux champignons pathogènes testés, signe qu'un nombre relativement grand de gènes est impliqué dans les deux types d'interaction (Güimil *et al.*, 2005). Peu d'études récentes ont comparé les interactions avec

des symbiotes et des pathogènes, notamment en ce qui concerne les réponses liées à la perception des signaux diffusibles. Dernièrement, deux études (Kloppholz *et al.*, 2011 ; Plett *et al.*, 2011) ont montré que les champignons MA et ectomycorhiziens sécrétaient des petits peptides effecteurs capables de réguler négativement l'expression de gènes de défense et favoriser l'interaction. Ces résultats renforcent encore plus l'intérêt que l'on peut vouloir porter à l'étude des liens existants entre la symbiose MA et les mécanismes de défense des plantes.

À ce jour, les études portant uniquement sur la perception des signaux diffusibles mycorhiziens par les plantes et les réponses transcriptomiques qui en découlent sont rares. En effet, la nature des facteurs Myc est longtemps restée inconnue, limitant l'utilisation de signaux mycorhiziens purs pour aborder cette question. Cependant, plusieurs approches utilisant des signaux diffusibles mycorhiziens ont tout de même permis de progresser. L'utilisation d'une membrane de cellophane permettant de séparer les deux partenaires tout en laissant passer les signaux fongiques a permis de mettre en évidence l'induction du gène rapporteur *ENOD11* (Kosuta *et al.*, 2003). D'autres analyses suggérant l'existence de signaux diffusibles fongiques capables de modifier l'expression génique de *M. truncatula* ont été réalisées (Weidmann *et al.*, 2004 ; Kuhn *et al.*, 2010). La production d'exsudats de spores en germination (GSE) est aussi un moyen pour obtenir des signaux fongiques (Chabaud *et al.*, 2011 ; Mukherjee & Ané, 2011) qui peuvent être utilisés en analyse transcriptomique. La découverte des Myc-LCO produits par les champignons MA (Maillet *et al.*, 2011) permet aujourd'hui de tester l'effet de ces molécules pures sur l'expression des gènes végétaux (dans la limite de la disponibilité de ces molécules, difficiles à produire). Une étude récemment publiée a comparé l'effet des Myc-LCO (sulfatés ou non, ou en mélange) à celui des FNod sur l'expression de gènes chez des plantes de *M. truncatula* sauvages ou affectées dans la voie SYM (mutants *nfp* et *dmi3*) (Czaja *et al.*, 2012). Cette étude a montré que des gènes sont exprimés en réponse à ces molécules : 329, 151 et 279 gènes sont surexprimés au moins 1,5 fois 6 heures après traitement avec respectivement des Myc-LCO sulfatés (10^{-8} M), non sulfatés (10^{-7} M) ou en mélange. Certains gènes sont communs aux différents traitements et d'autres sont spécifiques de chacun des traitements. L'utilisation des mutants a permis de montrer que les gènes *NFP* et *DMI3* sont importants pour la mise en place de ces réponses.

Enfin, concernant la mycorhization et sa régulation par le phosphate, peu d'études d'expression de gènes ont été menées. Chez *M. truncatula* les réponses transcriptomiques obtenues en condition de mycorhization ou de non carence phosphatée (+P) ont été comparées, notamment dans le but de savoir si les gènes différentiellement exprimés chez les plantes mycorhizées n'étaient pas en fait le résultat d'une nutrition phosphatée améliorée (Grunwald *et al.*, 2009). Les résultats ont alors indiqué que des certains gènes sont effectivement exprimés de la même manière dans ces deux conditions. Suite à des analyses des teneurs en phosphate dans les plantes mycorhizées, les auteurs ont alors expliqué ces résultats par la meilleure nutrition phosphatée obtenue par les plantes mycorhizées, équivalente à une condition +P. Enfin, la régulation de la mycorhization par le phosphate a été étudiée au niveau transcriptomique chez le pétunia (Breuillin *et al.*, 2010). Dans cette étude, le phénotype mycorhizien en condition HighP (mycorhization diminuée, et arbuscules anormaux) est différent du nôtre (blocage avant la formation des hyphopodes). Ainsi l'analyse transcriptomique réalisée n'a pas porté sur les réponses précoces à des signaux fongiques diffusibles mais sur la comparaison entre différentes conditions (plus ou moins phosphate et plus ou moins inoculation) à 5 semaines. Les résultats indiquent que le phosphate agirait plutôt sur les voies de biosynthèse des strigolactones inhibées en HighP et sur l'expression de transporteurs de phosphate reliés à la mycorhization (Breuillin *et al.*, 2010).

Ainsi, parmi toutes ces études transcriptomiques, aucune n'a été réalisée dans le but de regarder si le phosphate pouvait altérer la perception et la réponse précoce des plantes à des signaux de champignons mycorhiziens. Cependant, l'ensemble de ces approches ont permis d'identifier plusieurs gènes associés aux différentes étapes de l'interaction mycorhizienne. Bien que la majorité de ces gènes ne soient pas caractérisés fonctionnellement, ils représentent de potentiels marqueurs « myc » pour l'étude de cette symbiose. C'est pourquoi, riches des résultats issus de l'ensemble de ces études, nous avons décidé de regarder si le phosphate pouvait modifier l'expression des gènes « myc » de *M. truncatula* suite à des traitements par différents signaux mycorhiziens.

2 – 2/ Choix de la technique, des conditions et des gènes

2 – 2a/ Choix de la technique et conditions utilisées

Pour regarder les réponses végétales au niveau de l'expression de gènes, plusieurs techniques s'offraient à nous, avec chacune des avantages et des inconvénients. En partant du plus petit nombre de gènes analysables en une expérience (bas débit) au plus grand nombre (haut débit) voici quelques exemples des différentes technologies possibles :

- la qRT-PCR qui permet d'analyser l'expression de plusieurs gènes dans plusieurs conditions. Cette technique sensible est pertinente lorsqu'on analyse l'expression d'un petit nombre de gènes. Elle est cependant limitée par le faible nombre d'échantillons que l'on peut analyser en même temps, et aussi par la réalisation obligatoirement manuelle des plaques d'analyse.

- la technologie Fluidigm® Biomark Dynamic Array™ IFCs (appelée ici Fluidigm®) qui permet d'analyser l'expression de 96 gènes sur 96 échantillons. Le système utilise une puce constituée d'un réseau de micro-fluide, de valves et de chambres permettant de croiser 96 paires d'amorces avec 96 échantillons d'ADNc pour réaliser 9216 réactions individuelles de RT-qPCR en une seule fois. Cette technique permet ainsi de combiner la sensibilité de la qPCR avec l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Le débit reste par contre moyen pour ce qui concerne le nombre de gènes.

- les puces à ADN, qui permettent d'analyser en une fois l'ensemble des transcrits de l'organisme présents sur la puce (exemple puce Affymetrix *M. truncatula*). Elles représentent donc un système haut débit mais coûtent relativement cher, et surtout une puce ne permet d'analyser qu'une seule condition.

- le séquençage haut-débit des ADNc issus de la retro-transcription des ARN (RNAseq). Ces techniques permettent d'avoir accès à l'ensemble des transcrits de l'échantillon ; elle est particulièrement intéressante pour l'étude des transcrits faiblement exprimés. Comme les puces à ADN, c'est un système haut débit qui coûte cher et ne permet d'analyser qu'une seule condition par série de séquençage.

Nous avons travaillé avec *M. truncatula* sous deux conditions de fertilisation phosphatée, LowP et HighP-*Mt* (appelée pour cette partie HighP). Dans nos conditions HighP, le blocage de la mycorhization a lieu précocement, avant la formation des hyphopodes. Nous

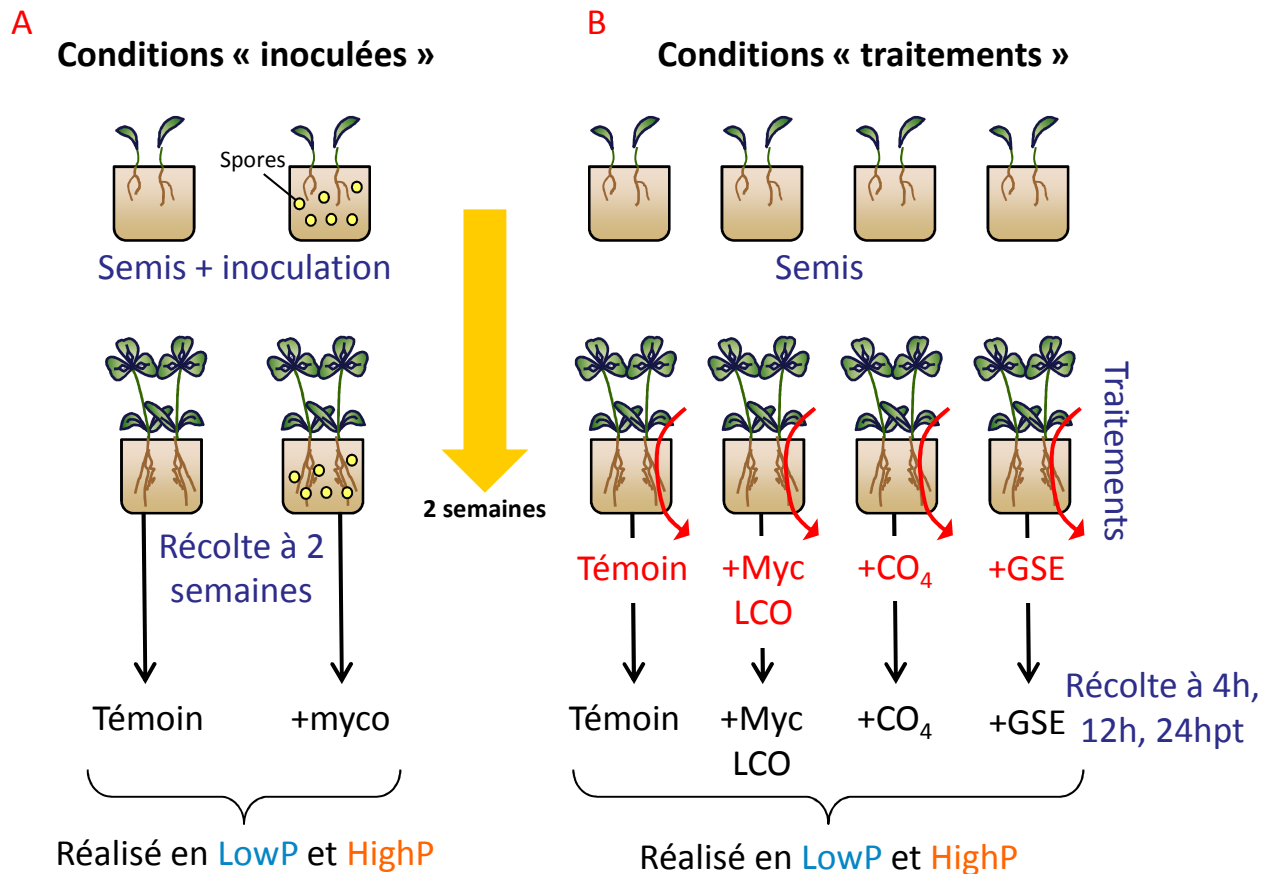


Figure 34 : Organisation de l'expérience Fluidigm®.

Des plantes de *M. truncatula* sont cultivées en condition LowP ou HighP (2 plantes par pot et 2 pots par condition).

A : conditions « inoculées » : les plantes inoculées ou non avec 150 spores de *R. irregularis* par pot sont cultivées deux semaines puis sont récoltées.

B : conditions « traitements » : les plantes sont cultivées deux semaines puis sont traitées avec différentes solutions. Le traitement se fait par apport de 25ml de solution appliqués par le dessus des pots. Les solutions de traitement sont : la solution d'arrosage seule (Témoin) ou contenant des Myc-LCO (NS+S à 10^{-7} M chacun), ou des CO₄ (10^{-8} M), ou des GSE (de *R. irregularis* produits dans du LowP ou HighP). Ensuite les racines sont récoltées à 4h, 12h ou 24h post-traitement.

L'ensemble de ce système expérimental a été reproduit 3 fois de façon indépendante.

avons choisi un temps de culture des plantes de deux semaines de façon à essayer de nous placer dans une période précoce de l'interaction (à ce moment de l'interaction, on n'observe pas encore d'hyphopodes). Le fait de devoir travailler avec des traitements (ou inoculation), à différents temps de récolte après traitement (car nous ne connaissions pas les cinétiques de réponse) avec à chaque fois deux fertilisations phosphatées (LowP et highP) multipliait le nombre de conditions à analyser et comparer. Cela était difficilement compatible avec l'analyse des gènes via une approche transcriptomique globale haut-débit, car il aurait fallu un grand nombre de puces ou de séquençages RNAseq. De plus, nous connaissions différentes classes de gènes (gènes de réponse aux Myc-LCO, gènes impliqués dans la voie SYM, gènes de défense...) dont l'expression nous intéressait plus particulièrement. Nous avons donc favorisé la technologie Fluidigm® à moyen débit qui permettait à la fois d'analyser l'expression d'un nombre raisonnable de gènes et surtout de multiplier les conditions expérimentales testées.

Nous avons choisi d'analyser les conditions suivantes (Figure 34) à chaque fois en LowP et HighP sur des plantes âgées de deux semaines :

- (i) inoculation avec des spores de *R. irregularis* (150 spores/pot),
- (ii) traitement avec des CO₂ (10^{-8} M),
- (iii) traitement avec des Myc-LCO (sulfatés (S) et non-sulfatés (NS) en mélange à 10^{-7} M),
- (iv) traitement avec des exsudats de spores en germination (GSE LowP ou HighP).

Dans le cas des traitements, une cinétique de récolte post-traitement (4h, 12h et 24hpt) a été réalisée.

Trois réplicats biologiques indépendants ont été produits.

2 – 2b/ Choix des gènes

La principale difficulté de cette technologie est le nombre relativement restreint de gènes (96) à sélectionner. Parmi les paires d'amorces s'imposaient une paire permettant de visualiser de potentielles contaminations des échantillons par de l'ADN génomiques (une amorce dessinée sur un intron et une sur un exon) et plusieurs paires d'amorces correspondant à des gènes constitutifs dits « gènes de référence ».

Plusieurs catégories de gènes ont été choisies selon leurs profils d'expression rapportés dans différents articles (Annexe 3) :

- 5 gènes de référence dont l'expression est réputée constitutive chez *M. truncatula* : *Helicase* et *Ubiquitine* (Mbengue *et al.*, 2010), *EF1 α* (Maillet *et al.*, 2011), *PDF2* et *PPRep* (Kakar *et al.*, 2008).

- des gènes marqueurs de la nutrition phosphatée des plantes, pour valider nos conditions LowP et HighP, tels que des transporteurs de phosphate (*PT1* à *PT6*) (Liu *et al.*, 1998 ; Harrison *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2008a ; Grunwald *et al.*, 2009) et des gènes de la voie de signalisation PHO2/miR3999 (Hohnjec *et al.*, 2005 ; Branscheid *et al.*, 2010).

- des gènes connus pour être induits suite à un traitement avec des Myc-LCO, identifiés pour certains dans l'article Maillet *et al.*, 2011 et pour d'autres par Céline Camps (LIPM, communication personnelle), ou bien répondant de façon précoce à la présence du champignon (Kuhn *et al.*, 2010).

- des gènes reliés à la voie SYM.

- des gènes connus comme exprimés lors de la symbiose (issus d'analyses transcriptomiques lors de la mycorhization, le plus souvent à des temps plus tardifs de l'interaction), ou des gènes caractérisés comme nécessaires à l'établissement d'une symbiose grâce à l'étude de mutants affectés dans la mycorhization ou la nodulation.

- des gènes connus comme impliqués dans des réactions de défense (Salzer *et al.*, 2000 ; Kloppeholz *et al.*, 2011), notamment induits précocement en réponse à l'oomycète *Aphanomyces euteiches* (informations fournies par Thomas Rey et Amaury Nars ; LRSV, équipe Immunité Végétale et Effecteurs).

- des gènes reliés à des voies de signalisation hormonale, principalement aux strigolactones (Liu *et al.*, 2011a), mais aussi aux cytokinines et à l'éthylène.

2 – 3/ Obtention des échantillons et traitement des données

Toutes les paires d'amorces ont été testées au préalable en qPCR classique sur des mélanges d'ADNc issus de plantes carencées ou non et inoculées ou non. Ainsi ont été retenues uniquement 96 paires d'amorces permettant une bonne efficacité de la réaction (comprise entre 1.8 et 2). Une plaque 96 puits contenant les 96 paires d'amorces a été préparée.

Les échantillons biologiques (ADNc) issus des différentes conditions sont obtenus comme suit : extraction des ARN, vérification de la quantité et de la qualité des ARN, traitement DNase, retro-transcription en ADNc. Une plaque 96 puits contenant les ADNc est préparée, elle comprend aussi un puits avec de l'eau (témoin négatif) et une gamme de dilution en 4 points contenant un mélange des différents ADNc de façon à tester aussi l'efficacité des amorces en interne lors du Fluidigm®.

Ces deux plaques ont ensuite utilisées pour la réalisation de la puce au niveau de la plateforme Génotoul (Toulouse).

Nos traitements DNase semblent avoir bien fonctionné puisque la paire d'amorces intron/exon n'a rien amplifié dans nos échantillons, indiquant que ces derniers ne sont pas contaminés par de l'ADN génomique. Parmi les cinq gènes de référence choisis, quatre ont été retenus pour les calculs d'expression (les résultats correspondant à l'ubiquitine ayant été écartés car son expression était finalement assez variable et l'efficacité des amorces était la plus mauvaise). Pour comparer l'expression d'un gène en fonction de différentes conditions (phosphate, traitements...), un rapport a été calculé entre l'expression du gène dans une condition donnée par rapport à une condition témoin. Une transformation des données en $\log(2)$ a été réalisée pour une meilleure visualisation des données. Une moyenne de ces rapports a ensuite été calculée pour les 3 répétitions biologiques, et l'erreur type (SEM) a été déterminée.

2 – 4/ Résultats

Deux paires d'amorces ciblant des gènes fongiques ont été utilisées notamment pour rechercher la présence du champignon en condition d'inoculation. Une de ces deux paires d'amorces (*Glomus* Alpha-tubulin) s'est révélée non spécifique, et la deuxième n'a jamais amplifié de produit, signe que deux semaines après l'inoculation (en LowP ou en HighP) le champignon n'est pas encore présent à l'intérieur des racines.

En enlevant les 8 gènes « contrôle » (5 gènes de référence, 1 contrôle intron/exon, 2 gènes fongiques) il reste 88 gènes d'intérêt. Parmi ceux-ci, 16 ont été exclus de l'analyse. En effet, une partie de ces derniers était trop faiblement exprimée (expression non détectable) comme pour *MtPT4*, *miR399h*, *miR399j*, *142502*, *40700*, *MtBcp1*. D'autres étaient

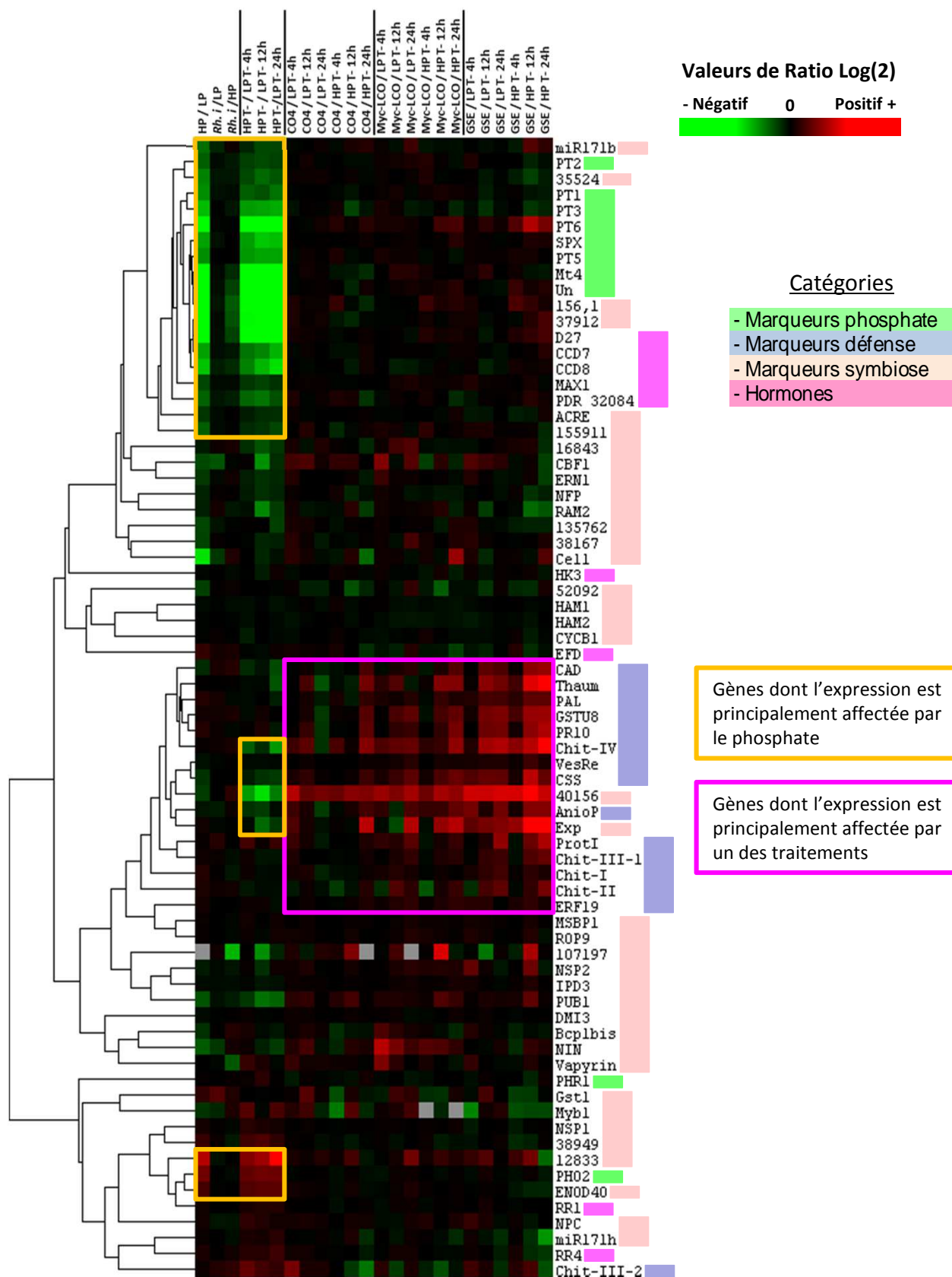


Figure 35 : Clustering hiérarchique des gènes selon leur profil d'expression = rapport (expression dans la condition testée/expression dans la condition contrôle correspondante).

Les valeurs de rapport (expression entre condition traitée/expression condition témoin) sont analysées avec le logiciel Cluster3.0 et sont mises en forme grâce au logiciel JavaTreeView. L'ordre des rapports (en haut) est fixe alors que les gènes (à droite) sont regroupés par profil d'expression. Un code couleur (rectangles roses, bleus, verts) correspondant aux catégories auxquelles appartiennent les gènes est rajouté à droite du nom du gène de façon à visualiser plus simplement les types de gène par groupe de profil d'expression.



faiblement exprimés mais l'efficacité de la réaction était trop mauvaise pour pouvoir prendre en compte les résultats, comme pour *miR399b*, *IsoFR*, *ENOD11*, *106351*, *160016*, *112474*, *MtChitIII-3* et *MtChitIII-4*, *MtCBF2*, *PDR2427*. (Annexe 3, gènes marqués d'un triangle noir). Il reste alors 72 gènes pour lesquels les résultats sont analysables.

L'expression de ces 72 gènes est représentée selon leurs profils d'expression en Figure 35 (clustering hiérarchique). On peut voir le rapport de l'expression de chaque gène dans une condition donnée par rapport à son expression dans la condition témoin correspondante. Ici les rapports entre les conditions sont fixés (légende horizontale en haut) et les gènes sont classés en groupes (ou clusters) selon leur profil d'expression dans les différentes conditions (légende verticale à droite). Cette figure permet surtout de visualiser deux grandes tendances (détaillées dans les deux points suivants 2 – 4b/ et 2 – 4c/) :

- une partie des gènes (17 entourés en jaune sur la Figure 35) voient leur expression principalement affectée par la condition LowP ou HighP (notamment moins exprimés en HighP qu'en LowP). Ces gènes font principalement partie des marqueurs de la carence phosphatée ou sont des gènes de biosynthèse des strigolactones, mais quelques gènes normalement attendus en réponse aux Myc-LCO sont aussi retrouvés dans ce groupe.

- une autre partie des gènes (16 entourés en rose sur la Figure 35) voient leur expression affectée par les différents traitements réalisés (ils sont généralement induits par le traitement, que ce soit dans les conditions LowP ou HighP). De façon inattendue, ces gènes font principalement partie des marqueurs de défense.

Par ailleurs, 24 gènes (soit 1/3 des gènes analysables) ne voient leur expression affectée par aucune des conditions ou des traitements appliqués ici. Cela concerne principalement les gènes de la voie SYM, les gènes reliés aux cytokinines et à l'éthylène, et des gènes sélectionnés comme associés à l'interaction mycorhizienne ou à la nodulation (Annexe 3, triangles rouges). Il reste donc 48 gènes dont l'expression a été affectée par au moins un des traitements.

2 – 4a/ Effet de l'inoculation des plantes sur l'expression des gènes

L'inoculation par des spores de champignon MA (Figure 34), n'a induit l'expression d'aucun des gènes testés, ni en condition LowP, ni en HighP. Ces résultats pourraient

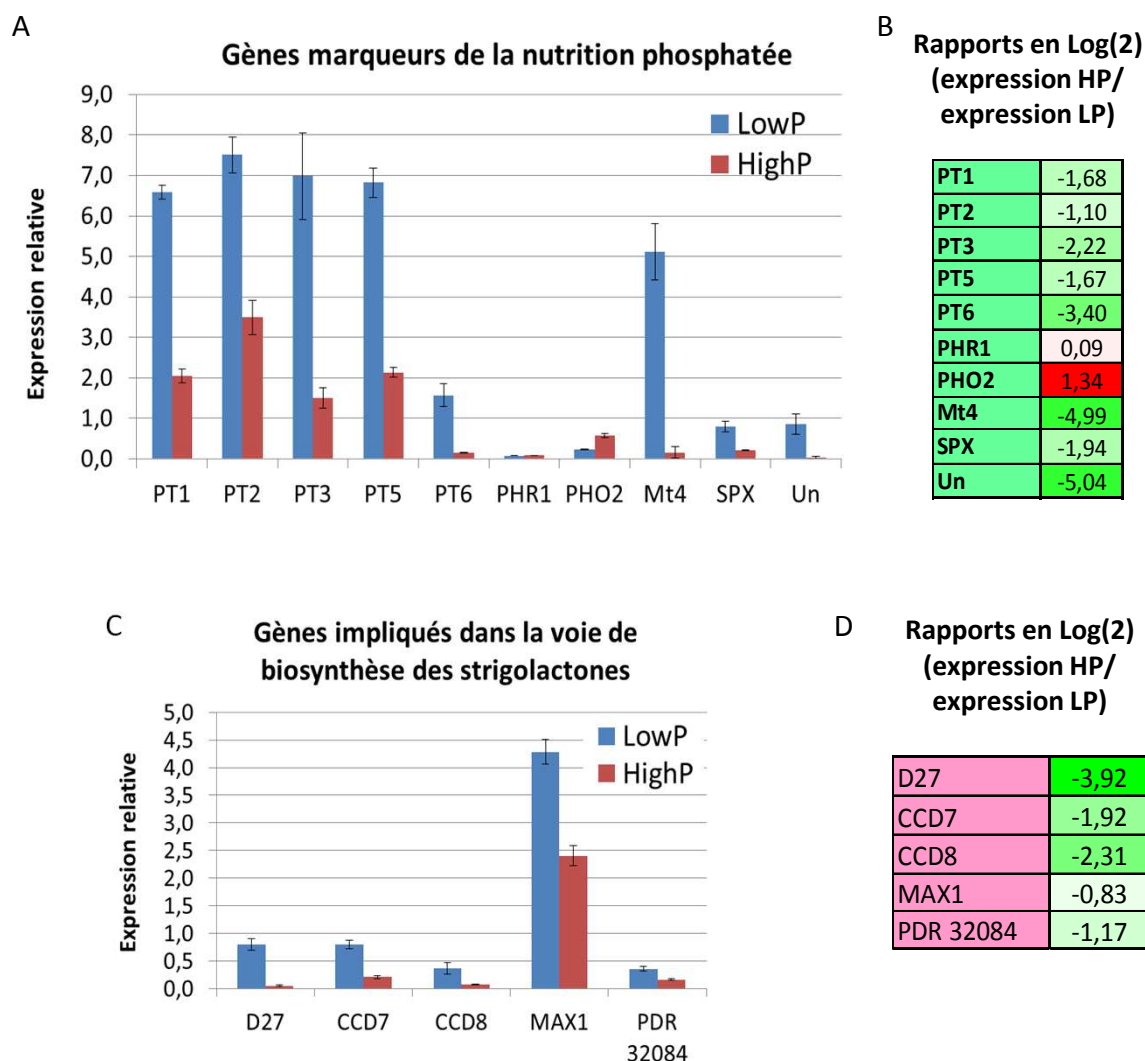


Figure 36 : Effet du phosphate sur l'expression de gènes marqueurs de la carence phosphatée ou impliqués dans la voie de biosynthèse des strigolactones.

A et C : Expression des gènes marqueurs de la carence phosphatée (A) ou des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de strigolactones (C) dans les plantes témoins LowP ou HighP non inoculées*.

B et D : Rapports d'expression des gènes marqueurs de la carence phosphatée (B) ou des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de strigolactones (D) dans la condition HighP par rapport à leur expression dans la condition LowP **.

* expression relative par rapport aux gènes de référence moyennée entre les 3 répétitions biologiques, barres d'erreur = SEM.

** moyenne des rapports issus des 3 répétitions biologiques. Les données sont exprimées en Log(2), plus la case est verte et plus le gène est sous exprimé en HighP par rapport au LowP, plus elle est rouge et plus il est exprimé en condition HighP par rapport au LowP.

s'expliquer par un temps de récolte trop précoce ou trop tardif par rapport à la cinétique d'interaction (2 semaines de co-culture). Le champignon n'est peut-être pas encore assez proche de la racine pour pouvoir induire l'expression de gènes (soit par des signaux fongiques, soit lors d'un contact). Ou alors, le champignon via des signaux diffusibles a déjà induit des réponses chez les plantes mais avant que nous ayons récolté. Il aurait fallu tester une cinétique d'interaction plus fine pour mieux déterminer à partir de quel moment des réponses végétales sont observées en conditions favorables. De même, on peut imaginer qu'un inoculum plus fort, ou l'utilisation d'un système double-cone avec des spores « stimulées » par des exsudats auraient pu nous permettre d'accélérer la mise en place de l'interaction et d'observer des réponses chez les plantes.

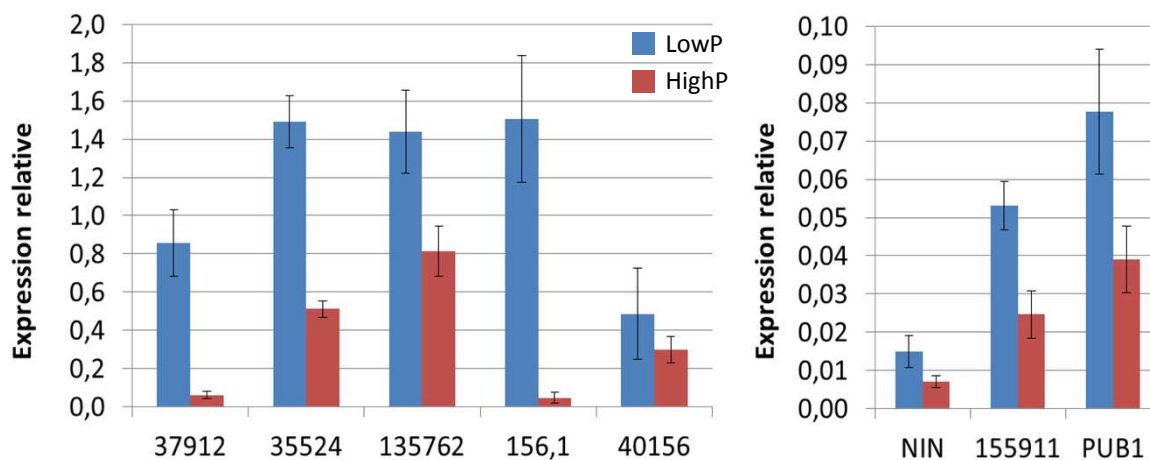
2 – 4b/ Gènes dont l'expression est affectée par la fertilisation phosphatée

Nous allons comparer ici les plantes témoins non inoculées ayant été cultivées en LowP ou HighP (Figure 34).

Parmi les gènes dont l'expression est affectée par le phosphate, on retrouve naturellement les gènes marqueurs de la carence phosphatée (Figures 36-A et 36-B). Ces derniers comprennent plusieurs transporteurs de phosphate induits en LowP (MtPT1 à MtPT6), le transcrite Mt4 et les gènes *MtSPX* et *MtUn*. En revanche l'expression du facteur de transcription *MtPHR1* n'est pas affectée par le phosphate, ce qui correspond au résultat attendu (l'activité de ce facteur de transcription est régulée au niveau post-traductionnel, Miura *et al.*, 2005). MtPHO2 étant un inhibiteur des réponses liées à la carence il est donc comme attendu plus exprimé en condition HighP. L'expression de l'ensemble de ces gènes va dans le sens des résultats décrits dans la littérature et nous permet de valider nos conditions expérimentales LowP et HighP, où les plantes sont bien dans un état physiologique carencé en condition LowP par rapport à la condition HighP.

Une autre catégorie de gènes dont l'expression est affectée par la nutrition phosphatée comprend les gènes impliqués dans la production de strigolactones (Figures 36-C et 36-D). En effet, ces gènes *D27*, *CCD7*, *CCD8* et *MAX1*, sont moins exprimés en condition HighP que LowP, cela va dans le sens d'une moindre production de strigolactones dans ces conditions. On remarque que la présence de phosphate a un effet inhibiteur particulièrement prononcé sur l'expression de *D27* qui code pour l'enzyme connue comme

A Gènes de réponse aux Myc-LCO exprimés plus fortement en LowP



**B Rapports en Log(2)
(expression HP/ expression LP)**

37912	-3,78
35524	-1,54
135762	-0,82
156,1	-4,98
40156	-0,70
NIN	-1,08
155911	-1,11
PUB1	-0,99

Figure 37 : Effet du phosphate sur l'expression de gènes liés à la perception de Myc-LCO.

A : Expression des gènes normalement induits suite à la perception de MycLCO : ces gènes sont plus fortement exprimés en condition LowP (A) dans les plantes LowP non inoculées*.

B : Rapport d'expression des gènes dans la condition HighP par rapport à leur expression dans la condition LowP **.

* expression relative par rapport aux gènes de référence moyennée entre les 3 répétitions biologiques, barres d'erreur = SEM.

** moyenne des rapports issus des 3 répétitions biologiques. Les données sont exprimées en Log(2), plus la case est verte et plus le gène est sous exprimé en HighP par rapport au LowP, plus elle est rouge et plus il est exprimé en condition HighP par rapport au LowP.

intervenant le plus en amont dans la voie de biosynthèse (Figures 36-C et 36-D). Globalement, ces résultats bien qu'attendus sont intéressants car jusqu'à présent nous n'avons pas réussi à mesurer l'effet du phosphate sur la production de strigolactones chez *M. truncatula*. En effet, les strigolactones produites par cette espèce (le didehydro-orobanchol et l'orobanchol (Liu *et al.*, 2011a)), sont pour le moment non détectables dans nos analyses biochimiques. L'étude de l'expression des gènes nous permet ici d'évaluer indirectement la production de strigolactones. Nos résultats confirment des données transcriptomiques obtenues chez *M. truncatula* où une carence phosphatée de 24h est capable d'induire l'expression de D27 chez des jeunes plantules (Liu *et al.*, 2011a). De même l'effet inhibiteur du phosphate sur l'expression de *CCD8* a été observé chez le pétunia à des temps plus tardifs (5 semaines) (Breuillin *et al.*, 2010).

Enfin, le transporteur de strigolactones *PDR1* découvert chez le pétunia possède trois séquences homologues chez *M. truncatula* (Mtr.2427.1.S1_at, Mtr.32084.1.S1_at et Mtr.18815.1.S1_at) (séquences et amorces fournies par Jean-Philippe Combier, LRSV). Deux de ces trois gènes ont été choisis au hasard (*PDR2427* et *PDR32084*) pour l'analyse Fluidgim®. L'expression de *PDR2427* n'a pas pu être exploitée (le gène étant trop faiblement exprimé), mais celle de *PDR32084* s'avère affectée par le phosphate puisque ce gène est environ deux fois plus exprimé en condition LowP que HighP (Figures 36-C et 36-D). Cela correspond au facteur d'induction trouvé chez le pétunia où un traitement correspondant à une carence phosphatée d'une semaine appliquée à des plantules de 2 semaines induit d'un facteur 2,5 environ l'expression de *PDR1* (Kretschmar *et al.*, 2012).

Nous pouvons aussi noter que l'expression des gènes reliés à la voie de biosynthèse des strigolactones n'a pas été affectée par les différents traitements réalisés (CO₄, Myc-LCO, GSE).

D'autres gènes normalement connus comme induits en réponse à un traitement par des Myc-LCO se sont avérés affectés par le phosphate : ils sont plus exprimés en condition LowP qu'en condition HighP (Figures 37-A et 37-B). On retrouve les gènes 37912 et 156.1 (Mtr.37912.1.S1_at et Mtr.156.1.S1_at) qui sont environ respectivement 10 fois et 30 fois moins exprimés en HighP qu'en LowP. Ces gènes sont connus pour être induits en réponse aux Myc-LCO (un traitement à 10⁻⁸M avec des Myc-LCO NS induit l'expression de 156.1 d'un facteur 2,5 et 37912 d'un facteur 5,9 (Maillet *et al.*, 2011) mais aussi pour être plus exprimés

A

Rapports en Log(2) (expression plantes traitées / expression plantes témoins non traitées)

B

Rapports en Log(2)
(traitement HP/
traitement LP)

	rapport (GSE LP /T- LP)			rapport (GSE HP /T- HP)			GSE HP/ GSE LP		
	4h	12h	24h	4h	12h	24h	4h	12h	24h
CAD	0,05	1,12	0,92	0,13	1,64	1,78	0,09	0,52	0,87
Protl	-0,03	0,35	1,71	-0,17	1,25	2,02	-0,14	0,90	0,32
AnioP	1,39	0,35	1,33	0,28	1,54	1,54	-1,16	1,39	0,22
GSTU8	0,25	1,35	1,49	0,84	1,78	1,84	0,59	0,43	0,35
PAL	0,41	0,84	0,77	0,52	1,10	1,09	0,11	0,26	0,32
Thaum	0,12	1,63	1,30	0,80	2,64	3,45	0,68	1,02	0,80
CSS	0,95	1,17	1,15	0,30	2,23	1,18	-0,65	0,92	0,25
PR10	-0,01	1,25	1,33	0,25	1,65	2,05	0,25	0,39	0,72
Chit-I	0,27	0,56	0,76	0,11	0,53	0,34	-0,16	-0,03	-0,42
Chit-II	-0,53	0,82	1,13	-0,07	0,58	1,39	0,45	-0,24	0,26
Chit-III-1	-0,05	0,59	0,72	-0,16	0,93	1,18	-0,12	0,33	0,46
Chit-IV	0,41	1,91	2,07	1,61	2,17	3,87	1,20	0,26	1,81

Figure 38 : Effet des traitements GSE sur l'expression de gènes de défense.

A : Rapport d'expression entre la condition traitée GSE et la condition témoin non traitée correspondante : les traitements GSE induisent l'expression de gènes reliés à des réponses de défense surtout aux temps 12h et 24h*.

B : Rapport de l'effet traitement GSE en HP/effet du traitement GSE en LowP : on remarque globalement que les gènes de défense semblent légèrement plus induits en condition HighP*.

* moyenne des rapports issus des 3 répétitions biologiques. Les données sont exprimées en Log(2), plus la case est verte et plus le gène est sous exprimé en HighP par rapport au LowP, plus elle est rouge et plus il est exprimé en condition HighP par rapport au LowP.

dans des racines mycorhizées (Hohnjec *et al.*, 2005 ; Gomez *et al.*, 2009). Les autres gènes (35524, 135762, 40156, *NIN*, 155911, *PUB1*) sont environ 2 fois moins exprimés en condition HighP que LowP.

Le fait qu'une dizaine de gènes qui sont normalement activés en réponse au champignon (MycLCO, ou mycorhization) soient régulés négativement par la présence de phosphate peut laisser penser que les plantes sont moins à même de répondre à la présence de signaux fongiques mycorhiziens lorsqu'elles sont en condition HighP. Ces résultats nouveaux vont dans le sens d'une perception différentielle du champignon en fonction de la nutrition phosphatée de la plante.

Remarque : Les différences d'expression présentées ici (Figures 36 et 37) sont celles observées entre les plantes non inoculées HighP et LowP. Elles ont aussi été observées pour les témoins HighP et LowP correspondant aux plantes non traitées récoltées à 4h, 12h et 24h (Figure 34), confirmant ces tendances.

2 – 4c/ Effet des traitements sur l'expression des gènes marqueurs de défense

Parmi les gènes testés, 18 sont reliés à des réactions de défense. Une majorité de ces gènes ont été induits par les différents traitements réalisés (CO₄, Myc-LCO et GSE) (Figure 35). Je vais détailler ici les réponses obtenues avec les traitements GSE car ce sont les traitements induisant les plus fortes réponses. En effet, on observe que les traitements GSE induisent des réponses de défense dans les deux conditions phosphatées LowP et HighP (Figure 38-A). Ces gènes sont majoritairement induits à 12h et plus encore à 24h. On retrouve le gène *PR10* connu comme induit en réponse à des pathogènes comme par exemple lors d'une infection des racines de *M. truncatula* par le champignon *Colletotrichum trifolii* (Kloppholz *et al.*, 2011). Des gènes codant pour des chitinases sont aussi connus comme induits par des agents pathogènes (tels que des champignons et des oomycètes) mais aussi dans des interactions symbiotiques rhizobiennes ou mycorhiziennes (Salzer *et al.*, 2000). Nous retrouvons ici suite à un traitement avec des GSE les expressions de Chit-I, Chit-II, Chit-III-1 et Chit-IV, qui sont (à l'exception de Chit-I) les mêmes que celles induites dans les étapes précoces de l'interaction mycorhizienne (Salzer *et al.*, 2000). Comme attendu, les gènes Chit-III-2, Chit-III-3 et Chit-III-4 normalement induits lors d'une mycorhization bien

établie ne sont pas retrouvés ici. De plus, de façon intéressante, nous pouvons voir que la majorité de gènes sont légèrement plus induits en condition HighP que LowP (Figure 38-B).

De façon intéressante, ces mêmes gènes sont aussi induits suite à un traitement par des Myc-LCO ou des CO₄ (Annexe 4).

Les traitements Myc-LCO induisent (en LowP et HighP) des réponses similaires à celles obtenues avec les GSE mais avec une amplitude moins grande. Au niveau cinétique, les gènes sont aussi majoritairement induits à 12h et plus encore à 24h, et ils sont légèrement plus induits en condition HighP que LowP.

Les traitements CO₄ (en LowP et HighP) activent également l'expression de gènes de défense. On remarque cependant que la cinétique est légèrement différente. En LowP, les CO₄ induisent légèrement des réponses de défense à 4h et 12h et ces réponses sont plutôt inhibées à 24h. Par contre, en condition HighP, ces gènes sont uniquement activés au temps 24h. Le rapport des réponses obtenues en HighP vis-à-vis de celles obtenues en LowP (Annexe 4, colonne B), souligne encore plus cette différence de cinétique, laissant penser qu'en condition HighP, les gènes seraient même un peu moins exprimés qu'en LowP aux temps 4h et 12h et seraient plus induits à 24h. La signification biologique de ces résultats dans les mécanismes régulateurs recherchés ici mérite d'être examinée. Des expériences supplémentaires appuyées sur une analyse de cinétique plus poussée pourraient par exemple être réalisées. Nous présentons ici les premiers résultats de transcriptomique obtenus en réponse à des CO courts. Les concentrations et les conditions d'application de ces derniers pourraient certainement être améliorées.

Nous pouvons comparer nos résultats avec ceux obtenus dans l'étude transcriptomique menée chez le pétunia dans des conditions de mycorhization croisées avec des niveaux de fertilisation phosphatée différents (Breuillin *et al.*, 2010). En effet, dans cette étude la mycorhization établie en LowP induit fortement l'expression de gènes de défense (certains appartenant aux mêmes familles de gènes que ceux testés dans notre étude : Glutathione-S-transferase, Chitinases, PR10...). Par contre, ces réponses de défense sont plus fortes en condition LowP que HighP (où la plante est un peu colonisée). Les auteurs concluent que leurs résultats ne sont pas en faveur d'une induction des mécanismes de défense en condition HighP qui aurait pu être responsable de l'inhibition de la mycorhization

A

Rapports en Log(2) (expression plantes traitées / expression plantes témoins non traitées)

B

Rapports en Log(2)
(traitement HP/
traitement LP)

Traitement	Genes	rapport (Traité LP /T- LP)			rapport (Traité HP /T- HP)			Traité HP/ Traité LP		
		4h	12h	24h	4h	12h	24h	4h	12h	24h
Myc-LCO	107197	-0,07	0,79	#	0,08	2,59	-0,29	-0,76	3,07	#
	16843	0,18	0,76	0,94	-0,10	-0,19	-0,15	-0,28	-0,95	-0,35
	Vapyrin	1,46	0,48	-0,01	0,30	-0,03	-0,21	-0,57	-0,51	0,20
	NIN	2,18	1,43	0,71	1,01	0,92	0,56	-1,17	-0,51	-0,07
	156,1	-0,06	-0,02	-0,03	0,68	0,33	0,45	0,73	0,35	0,77
	40156	1,82	1,51	1,94	1,29	1,98	1,72	-0,53	0,47	-0,10
	PUB1	0,37	0,35	0,29	0,15	0,94	0,62	-0,34	0,59	0,64
GSE	107197	-0,06	-1,39	0,13	-0,35	2,03	0,09	1,33	4,45	-0,73
	12833	0,62	0,94	0,06	0,67	1,34	-1,22	0,05	0,39	-1,28
	40156	2,46	2,41	2,56	2,54	3,60	2,36	0,08	1,19	-0,20
	PUB1	0,10	0,31	0,25	0,28	1,11	0,13	-0,03	1,37	-0,44
CO4	107197	0,36	-0,30	0,42	0,33	1,50	#	-0,03	1,52	#
	40156	2,15	1,18	1,38	1,24	1,61	1,50	-0,91	0,43	0,12
	PUB1	0,47	0,58	0,05	0,43	0,78	0,05	-0,30	0,21	0,00

Figure 39 : Effet des différents traitements (Myc-LCO, CO₄ ou GSE) sur l'expression de gènes de réponse « myc ».

A : Rapport d'expression entre la condition traitée et la condition témoin non traitée correspondante *.

B : Rapport de l'effet du traitement en HighP par rapport à l'effet du traitement en LowP *.

* moyenne des rapports issus des 3 répétitions biologiques. Les données sont exprimées en Log(2), plus la case est verte et plus le gène est sous exprimé en HighP par rapport au LowP, plus elle est rouge et plus il est exprimé en condition HighP par rapport au LowP.

en HighP. Au contraire, la plus faible expression des gènes de défense en HighP pourrait être liée à la plus faible colonisation des racines dans cette condition. Dans nos conditions expérimentales nous appliquons les molécules signal en concentration identique sur les plantes LowP et HighP (au moins pour les traitements CO₄ et Myc-LCO). Cette différence, associée au fait que nous nous plaçons dans des conditions de réponses précoces à des signaux diffusibles et non dans une situation de mycorhization établie, peut expliquer les réponses différentes obtenues.

2 – 4d/ Effet des traitements sur l'expression des gènes reliés à la symbiose

Parmi les gènes testés, on compte notamment une vingtaine de gènes connus comme induits en réponse aux Myc-LCO (principalement issus des travaux de Céline Camps (LIPM) et de Maillet *et al.*, 2011), mais aussi des gènes connus comme induits en réponse à des signaux diffusibles mycorhiziens (avant contact) (Kuhn *et al.*, 2010). L'ensemble de ces gènes seront appelés « myc ». Si l'on regarde les gènes « myc » induits par les traitements Myc-LCO à 10⁻⁷M, on remarque que très peu de gènes sont exprimés en réponse à ces traitements quelles que soient la durée du traitement et la fertilisation phosphatée (Figure 39-A). En effet, le traitement Myc-LCO induit l'expression de seulement 4 gènes avec une différence d'expression d'au moins un facteur 2 entre traité et non traité (Figure 39-A). Les gènes 40156, NIN et la VAPYRIN sont principalement induits aux temps 4h en condition LowP. Le gène 107197 est quant à lui induit spécifiquement à 12h et plus fortement en condition HighP.

Dans l'analyse transcriptomique globale réalisée à partir de plantules de *M. truncatula* traitées avec des Myc-LCO (Czaja *et al.*, 2012), l'expression des gènes a été analysée à 6h ou 24h post-traitement. C'est au temps 6h que le nombre de gènes induits est le plus important, ce qui correspond à la réponse précoce que nous observons ici. Une partie des gènes que nous trouvons comme induits par nos traitements sont aussi retrouvés comme induits dans cette analyse (*Vapyrin*, *NIN*, *156.1*, *PUB1*), confirmant la capacité de ces gènes à être induits par les Myc-LCO (même dans des conditions de traitement différentes).

Enfin, nos résultats indiquent que la plante est capable de répondre aux Myc-LCOs dans les deux conditions LowP et HighP (Figure 11-A) mais qu'il semble y avoir un léger effet du phosphate sur le niveau d'induction des gènes (Figure 11-B). Au temps de récolte 4h, une réponse légèrement plus forte est généralement observée en LowP. Ces résultats combinés

au fait qu'en condition HighP les gènes de réponse aux Myc-LCO sont moins exprimés avant traitement (Figures 9-A et 9-C), semblent indiquer que les réponses aux Myc-LCO sont moindres en condition HighP.

Les différences observées entre nos résultats et ceux issus des analyses transcriptomiques réalisées par ailleurs (Maillet *et al.*, 2011 ; Czaja *et al.*, 2012) peuvent en partie s'expliquer par les conditions de traitements utilisées ici. En effet, dans les études déjà publiées, les traitements Myc-LCO sont réalisés en conditions stériles, sur des plantules cultivées environ 1 semaine en boîtes de Petri et traitées dans des tubes en milieu liquide. Nous avons travaillé avec des plantes de 2 semaines cultivées en pot ayant un système racinaire plus complexe. Dans le but de mettre en place nos conditions de traitement pour l'expérience de Fluidgim®, nous avons réalisé des tests préliminaires sur des plantules de *M. truncatula* cultivées comme décrit dans ces études avec pour seule différence le fait de cultiver les plantes sur des milieux gélosés LowP ou HighP. Malheureusement nous n'avons pu valider avec ce protocole nos conditions (LowP et HighP) de fertilisation phosphatée. Une étude par RT-qPCR de l'expression de quelques marqueurs de la nutrition phosphatée (*PT1*, *PHO2*, *MtUn...*) n'a pas montré d'expression différentielle entre les plantes LowP et HighP, comme si les plantes cultivées en LowP étaient physiologiquement semblables aux plantes cultivées en HighP. Après des essais de changement de plusieurs paramètres de culture (utilisation de milieu sans phosphate du tout pour la condition LowP, remplacement du phytigel par de l'agar) n'ayant pas permis d'avoir des plantes carencées en condition LowP, nous avons donc décidé d'utiliser des plantes en pot de 2 semaines comme celles utilisées pour la condition inoculation. En effet chez ces plantes-là, à ces temps-là et dans ces conditions en pot, nos tests avaient confirmé la nature carencée et non carencée des plantes cultivées avec des fertilisations LowP et HighP.

Les autres traitements réalisés avec les GSE ou les CO₄ induisent encore moins l'expression de gènes « myc » que les traitements Myc-LCO (Figure 39). En commun entre tous les traitements on retrouve les gènes *107197*, *40156* et *PUB1*. Ils jouent peut-être un rôle important dans la perception des signaux symbiotiques en général. Le gène *40156* est le plus fortement induit dans tous les cas. De plus, bien que cela ne soit pas visible en regardant les rapports d'expression exposés en Figure 39, le gène *40156* est environ 5 fois plus fortement exprimé en condition LowP que HighP lors d'un traitement Myc-LCO

(données non présentées). D'après la banque de données « *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas » (MtGEA <http://mtgea.noble.org/v2/>), le gène 40156 code pour une protéine de type 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A. Il est aussi exprimé notamment lors de la nodulation (Moreau *et al.*, 2011) et encore plus fortement lors de stress salin (Gruber *et al.*, 2009). Le gène 107197 est toujours plus fortement induit au temps 12h et plus fort en HighP que LowP. Ce gène est connu pour être induit en réponse à des signaux de champignon MA ou spécifiquement durant la mycorhization (Liu *et al.*, 2007 ; Kuhn *et al.*, 2010). Enfin, de façon surprenante, ces deux gènes 107197 et 40156 ne sont pas retrouvés comme induits dans les analyse transcriptomiques de Czaja *et al.*, 2012.

2 –5/ Conclusion et discussion autour des résultats de Fluidigm®

Pour conclure, je commencerai par discuter des limites de l'approche utilisée ici :

- Concernant les conditions de culture, bien que l'on s'intéresse à des mécanismes précoces (vraisemblablement pré-symbiotiques), le temps deux semaines ne semble finalement pas être le bon moment pour étudier l'effet de l'inoculation puisque avec nos conditions d'inoculation nous n'avons trouvé aucun gène induit chez la plante. Des ajustements de temps de culture et de conditions d'inoculation devront être faits avant de relancer des analyses comparatives d'expression de gènes. Par contre, des plantules de deux semaines représentent un matériel biologique adéquat pour analyser l'effet des différents traitements sur ces plantes.

- concernant la technologie Fluidigm®, la principale contrainte réside dans le nombre limité de gènes analysés (96). Avec un nombre de gènes plus grand peut-être en aurions-nous trouvé dont la différence d'expression aurait été plus importante et surtout plus clairement dépendante des conditions de fertilisation phosphatée. Une autre contrainte est la sensibilité de la méthode (mauvaise efficacité des réactions ? dilution trop forte des ADNc ? effet de la pré-amplification ?), insuffisante pour étudier des gènes faiblement exprimés. Ce défaut de sensibilité a pu limiter notre analyse de certains gènes comme par exemple les gènes « myc » qui sont faiblement induits en réponse aux Myc-LCO.

- Concernant le choix des conditions, cette étude représente la première analyse réalisée dans l'équipe sur des plantules de cet âge avec les différents traitements appliqués. Le contrôle de la nutrition phosphatée nécessitait de se placer dans des conditions de

culture et de traitement autres que celles utilisées par Maillet *et al.* (2011) et Czaja *et al.* (2012) pour les réponses Myc-LCO. Les GSE et les CO₄ représentaient des nouveaux traitements pour lesquels nous n'avions pas de recul et nous aurions pu ajuster différemment. Les analyses préliminaires effectuées pour déterminer les conditions de culture permettant les traitements et les résultats obtenus permettent de souligner l'effet important des conditions de cultures (et en particulier de l'âge des plantes) sur l'expression des gènes d'intérêt.

Malgré tout, nous pouvons tirer deux principales conclusions des résultats de cette expérience :

- Les différents traitements réalisés (CO₄, Myc-LCO et GSE) induisent l'expression de gènes liés aux réactions de défense et ce, quelle que soit la fertilisation phosphatée.
- Parmi les gènes connus comme activés en réponse aux Myc-LCO certains voient leur expression affectée par la présence de phosphate. Ces gènes sont moins exprimés en réponse à un traitement fongique (Myc-LCO, GSE) en condition HighP.

2 – 5a/ Importance de la défense en réponse aux signaux fongiques MA

Quelle que soit la fertilisation phosphatée, suite à la perception de signaux fongiques provenant de champignons MA (CO₄, Myc-LCO et GSE), la plante exprime des gènes de défense. Cette induction est plutôt tardive puisque le temps 24 hpt représente le moment où nous observons les réponses les plus fortes. Dans l'ordre, les CO₄, puis les Myc-LCO et enfin les GSE induisent des réponses de plus en plus importantes. Nous n'avons pas observé une expression plus forte des gènes de défense en condition HighP (condition sans traitement) excluant l'hypothèse un peu simpliste selon laquelle les plantes limitent l'infection mycorhizienne en HighP parce qu'elles élèvent par défaut le niveau d'expression de leurs gènes de défense. Par contre, de façon intéressante, nos résultats semblent indiquer que ces gènes sont plus fortement activés par les traitements CO₄, Myc-LCO et GSE lorsqu'ils sont appliqués en condition HighP.

Le fait d'identifier comme principales réponses suite aux traitements par des signaux mycorhiziens l'activation de gènes de défense donne envie de vouloir mieux définir ces réponses de défense. On sort ici de la question de départ concernant la régulation de la mycorhization par le phosphate pour regarder ces réponses plutôt dans un esprit de

meilleure compréhension des points communs et des différences ayant lieu entre réponses symbiotiques et réponses aux pathogènes.

Afin de pouvoir mieux interpréter les résultats obtenus concernant les réponses de défense suite aux différents traitements réalisés ici, on pourrait envisager des études incluant des éliciteurs de réactions de défense avérés. On pourrait ainsi comparer si les cinétiques et les amplitudes de réponses sont les mêmes en fonction des signaux utilisés (par exemple entre un traitement CO₄ et un traitement CO₈) dans le but de déterminer des réponses communes ou spécifiques. Actuellement, nous pouvons comparer nos données avec celles obtenues sur ces mêmes gènes après élicitation de plantules de *M. truncatula* par des filtrats de culture de l'oomycète *Aphanomyces euteiches* (Thomas Rey (LRSV) communication personnelle). Dans notre cas les gènes de défense sont induits de façon beaucoup moins forte, et plus tardive. Les résultats obtenus avec *A. euteiches* n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions que nos analyses (plantules plus jeunes, milieu liquide, pas de cinétique...). Il faudrait refaire des expériences spécifiques avec des plantules de même âge et avec la même cinétique de récolte pour pouvoir vraiment comparer les deux types de réponses. En plus de comparer l'expression de gènes végétaux en réponse à des signaux symbiotiques ou pathogènes, d'autres types de réponses habituellement analysées en conditions de défense pourraient être comparées (production de ROS, production de phytoalexines, réponses calciques...). Cela permettrait de progresser dans la compréhension des mécanismes de perception et de signalisation lors des différentes interactions étudiées dans le but de mieux caractériser ce que l'on appelle réponses symbiotiques et réponses de défense.

De plus, il a été montré que les champignons MA sont capables de sécréter des peptides effecteurs (SP7) régulant négativement des réponses de défense des plantes, jouant ainsi un rôle positif dans l'établissement de l'interaction (Kloppholz *et al.*, 2011). On peut imaginer que la présence d'un champignon actif, et pas seulement celle des signaux testés ici, donnerait des réponses différentes du fait notamment de la production de ces peptides effecteurs et d'autres molécules. Pour vérifier cette hypothèse, on pourrait par exemple comparer les réponses végétales obtenues suite à un traitement avec des GSE ou lors d'une interaction précoce avec un champignon MA. Cela pose la question suivante : quelle part joue le champignon MA dans la régulation des réponses de défense mises en place par les plantes pour favoriser une interaction compatible?

Aujourd'hui, de plus en plus de personnes s'intéressent à la comparaison des interactions symbiotiques et pathogènes. Les mutants disponibles bloqués dans la mise en place d'interactions symbiotiques ou pathogènes sont autant d'outils permettant des approches croisées entre symbiose et pathogénicité. Cela permettrait de mieux comprendre comment la plante met en place des réponses appropriées selon le micro-organisme qu'elle a perçu et les conditions dans lesquelles il a été perçu. Ce genre d'approche a déjà été mis en place chez le pois en interaction avec un champignon MA. Chez une plante sauvage l'expression de gènes de défense est induite faiblement et transitoirement durant les étapes précoces de l'infection (durant la formation des hyphopodes) (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996 ; Ruiz-Lozano *et al.*, 1999). Ces réponses ont été analysées chez des mutants de pois affectés notamment dans la voie SYM, et il s'est avéré que l'expression des gènes de défense était plus forte chez ces mutants affectés dans la mycorhization tout comme d'autres éléments associés à la défense tels le dépôt de callose et la production de phytoalexines (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996 ; Ruiz-Lozano *et al.*, 1999). Des approches similaires sont aujourd'hui abordées notamment dans notre laboratoire (équipe Immunité Végétale et Effecteurs, LRSV) où l'étude du mutant *nfp* de *M. truncatula* (affecté dans la mise en place de la nodulation et non de la mycorhization) a révélé que *nfp* est plus sensible à l'infection par l'oomycète *Aphanomyces euteiches* (Thomas Rey et Christophe Jacquet, communication personnelle). Ces résultats renforcent l'idée que des liens étroits existent entre interaction symbiotiques et pathogènes. NFP étant une protéine connue pour être impliquée dans la perception de signaux symbiotiques diffusibles, ces résultats ainsi que les nôtres (réponses à des signaux diffusibles) indiquent que dès l'étape de la perception, des acteurs moléculaires peuvent être communs aux deux types d'interactions.

Des données concernant les réactions de défense mises en place chez les plantes lors de la perception de la chitine, indiquent que des récepteurs de type LySM-RLK sont impliqués comme OsCEBiP chez le riz (Kaku *et al.*, 2006) et AtCERK1 chez *A. thaliana* (Miya *et al.*, 2007) (Shinya *et al.*, 2012). Les récepteurs de type LySM-RLK étaient déjà connus pour être impliqués dans la perception des facteurs Nod dans le cadre de la symbiose rhizobienne (Madsen *et al.*, 2003 ; Radutoiu *et al.*, 2003 ; Limpens *et al.*, 2003 ; Arrighi *et al.*, 2006). La similitude entre les récepteurs impliqués dans la mise en place des réactions de défense et ceux impliqués dans la nodulation, laisse envisager des processus similaires de perception ou de signalisation.

Au final l'ensemble de ces études laissent imaginer des éléments de réponse communs entre interactions symbiotiques et interaction pathogènes compatibles. Quelles sont les différences aboutissant à une défense efficace (interaction incompatible), et des réponses de défense laissant s'installer la maladie ou la symbiose ? Quel rôle jouent les microorganismes et les signaux qu'ils émettent dans la mise en place de l'interaction ?... sont autant de questions qui au travers d'approches croisées (entre symbiose et défense) permettront de mieux intégrer nos résultats et nos conclusions.

2 – 5b/ Perturbation par le phosphate des gènes de réponse « myc »

Parmi les gènes connus comme activés en réponse aux Myc-LCO certains voient leur expression affectée par la présence de phosphate, ces gènes sont moins exprimés en condition HighP. Ainsi en réponse à un signal fongique, bien qu'induit avec des rapports similaires entre condition traitée et non traitées en LowP et HighP (parfois moins fort en HighP), ces gènes sont au final moins exprimés en condition HighP. Ces derniers résultats suggèrent que la plante serait moins à même d'induire des réponses symbiotiques lorsqu'elle n'est pas carencée. Ces résultats nouveaux représentent des pistes de régulation potentielle qui méritent d'être confirmées et explorées.

Parmi les gènes de réponse aux Myc-LCO étant affectés par le phosphate, on retrouve *PUB1* et *NIN*. Des mutants de *M. truncatula* correspondant à ces gènes sont actuellement disponibles. Le mutant *Mtpub1*, contrairement à *Mtnin* (Marsh *et al.*, 2007) est affecté dans la mycorhization (Camut *et al.*, 2012). Mais la majorité des gènes exprimés en réponse aux Myc-LCO codent pour des protéines de fonction inconnue, dont l'analyse fonctionnelle au cours de la symbiose n'a pas été réalisée. Les gènes tels que *156.1* et *37912*, étant les plus négativement affectés par le phosphate, représentent des candidats intéressants. Dans une première approche, on pourrait envisager la surexpression de ces gènes tout d'abord dans des plantes composites, ou bien d'étudier les mutants correspondants à ces gènes s'ils existent et d'examiner leur phénotype mycorhizien en condition LowP et HighP. Mais puisque nous pouvons voir que c'est un ensemble de gènes dont l'expression est moins forte en HighP, cette approche gène par gène s'avère risquée.

Nous pourrions également tester l'hypothèse selon laquelle un facteur de régulation en amont de la voie de signalisation (par exemple intervenant dans la voie SYM) régulerait

l'ensemble de ces gènes en inhibant leur expression en condition HighP. Pour vérifier cette hypothèse, on pourrait par exemple tester des mutants disponibles de la voie SYM (exemple *dmi3*) et voir si en condition HighP, la régulation négative de ces gènes est maintenue. Une récente étude menée chez *M. truncatula* compare les réponses transcriptomiques obtenues suite à des traitements Myc-LCO chez des plantes sauvages ou des mutants *nfp* et *dmi3* (Czaja *et al.*, 2012). Les résultats indiquent qu'une voie SYM fonctionnelle est importante pour l'induction de gènes suite à la perception des Myc-LCO, confirmant l'intérêt que nous pouvons porter à l'étude de cette voie dans le futur si l'on veut poursuivre l'hypothèse d'une perception affectée par le phosphate en condition HighP.

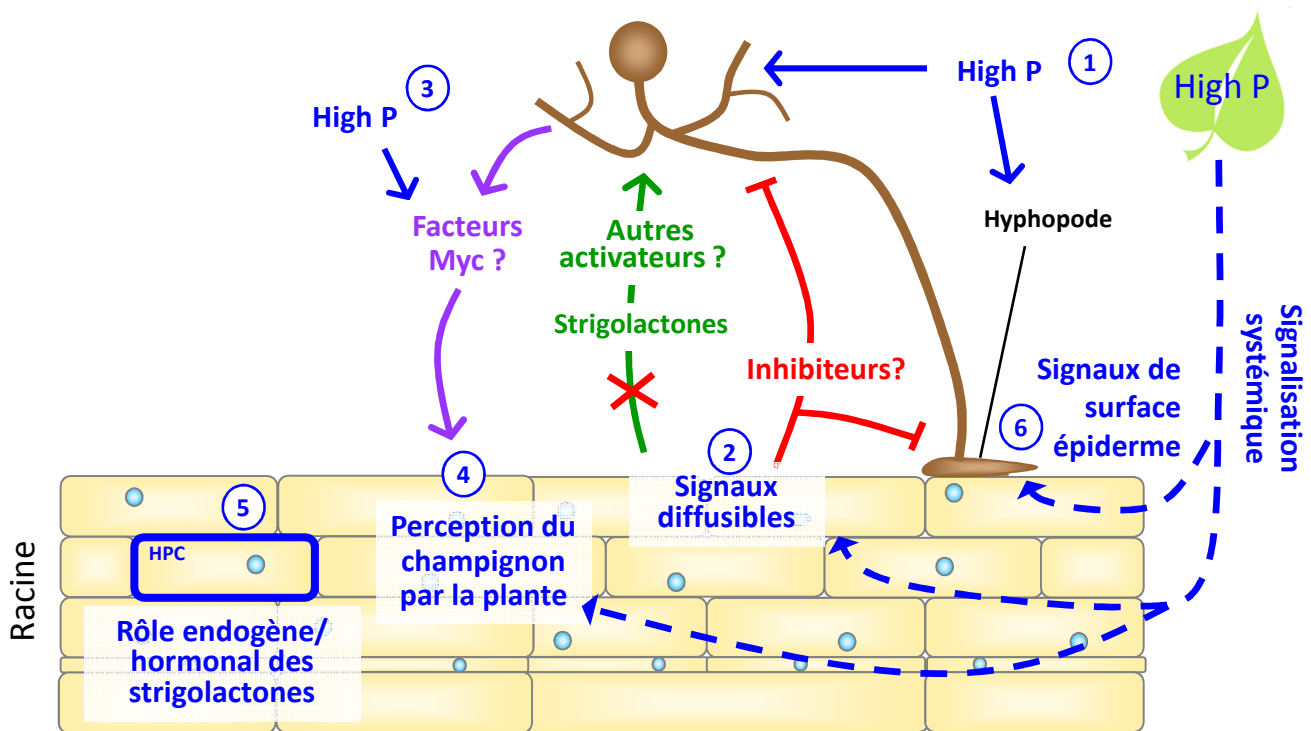


Figure 40 : Schéma de mécanismes régulateurs hypothétiques pouvant expliquer le phénotype mycorhizien observé en HighP.

- ① - Rôle direct du phosphate sur le développement du champignon (hypothèse écartée par plusieurs approches dont les expériences de split-roots)
- ② - Rôles des signaux diffusibles : absence de signaux activateurs (en plus des strigolactones), présence de signaux inhibiteurs dans les exsudats racinaires
- ③ - Effet direct ou indirect (via la plante) du HighP sur le champignon entraînant une modification de la production de signaux diffusibles fongiques
- ④ - Perturbation de la perception des signaux fongiques par la plante en condition HighP (champignon pas/mal reconnu)
- ⑤ - Rôles endogènes des strigolactones (fonctions hormonales, importance des HPC (hypodermal passage cells)?)
- ⑥ - Absence de signaux de surface normalement présents en LowP qui seraient nécessaires au champignon pour différencier des hyphopodes (relief et composition de l'épiderme, rôle du mucilage?)

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1/ Mécanismes de régulation de la symbiose par le phosphate : bilan, hypothèses et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de découvrir les mécanismes régulateurs mis en place par le partenaire végétal pour contrôler la mycorhization de ses racines selon ses besoins nutritionnels en phosphate. Dans un premier temps, nous avons pu voir que nos conditions HighP permettaient d'inhiber très fortement la mycorhization à un stade précoce de l'interaction, avant même la formation des hyphopodes. L'utilisation de plantes en split-root nous a permis de déterminer que cette régulation était systémique et liée aux teneurs en phosphate présentes dans les parties aériennes. Ces données, ainsi que d'autres résultats (bioessais *in vitro* avec le champignon, utilisation de *M. truncatula*) nous ont permis de réfuter l'hypothèse d'une inhibition de la mycorhization à cause d'un effet direct des concentrations en phosphate dans le sol sur le champignon (hypothèse n°1 de la Figure 40). Nous avons envisagé plusieurs mécanismes de régulation hypothétiques qui pouvait expliquer l'inhibition de la mycorhization en condition HighP (Figure 40).

Parmi ces mécanismes, le rôle des signaux diffusibles produits par les racines végétales étaient la première hypothèse que nous avons abordée (hypothèse n°2 de la Figure 40). En effet, en début de projet l'hypothèse de travail était tournée vers les strigolactones émises dans les exsudats racinaires. Ces molécules en tant que signal diffusible étaient pressenties comme pouvant jouer un rôle majeur dans la régulation par le phosphate de l'interaction mycorhizienne (Bouwmeester *et al.*, 2007). L'effet positif des strigolactones sur le développement du champignon était bien établi (Akiyama *et al.*, 2005 ; Besserer *et al.*, 2006, 2008). Dans les conditions HighP, cet effet positif est probablement absent puisque la concentration des strigolactones produites par les racines est fortement réduite (Yoneyama *et al.*, 2007b ; Balzergue *et al.*, 2011 ; Yoneyama *et al.*, 2012). Au vu de nos essais qui n'ont pu améliorer la mycorhization en condition HighP après un ajout exogène de GR24, nous sommes arrivés à la conclusion que ce mécanisme ne pouvait pas expliquer à lui seul la régulation négative de la mycorhization par le phosphate.

Reconsidérant notre hypothèse, ces résultats nous ont poussés à en formuler de nouvelles. Nous avons alors tenté d'évaluer, de façon moins ciblée, l'importance des

exsudats racinaires produits en LowP et en HighP, considérant qu'ils devaient être différents en qualité, et pas seulement au niveau des strigolactone considérant qu'ils devaient contenir des métabolites différents (et pas seulement au niveau des strigolactones) (Laparra *et al.*, 2011). Pour cela nous avons dû développer des bioessais et des systèmes de culture plus ou moins originaux dans le but de décrypter l'importance des exsudats racinaires dans la régulation qui nous intéresse. Nos expériences n'ont pas révélé la présence, dans les exsudats HighP, d'inhibiteurs du développement du champignon. Elles ne nous ont pas conduits non plus à conclure que les exsudats LowP étaient suffisants et nécessaires pour permettre une bonne mycorhization. L'utilisation du système double-cône nous a permis d'affiner nos résultats quant à l'identification du paramètre (phosphate du sol, exsudats, spores, racines) pouvant avoir le plus de poids dans le contrôle de l'interaction. L'ensemble de nos résultats permettent au final de placer les mécanismes majeurs de régulation plutôt au niveau de la plante elle-même.

Une hypothèse alors imaginée serait que la plante perçoit différemment le champignon (ou ses signaux) selon qu'elle est en état de carence phosphatée ou non (hypothèse n°4, Figure 40). Pour vérifier cela, deux approches ont alors été menées en parallèle. Tout d'abord, nous avons étudié les oscillations calciques nucléaires qui ont lieu sous les hyphopodes ou suite à la perception de signaux fongiques. Une collaboration avec David Barker et Mireille Chabaud a donc eu lieu, apportant des échanges et la découverte d'approches nouvelles pour l'équipe, qui m'ont permis d'aborder la régulation sous un angle nouveau. Il ressort de ce travail que le phosphate ne semble pas influencer clairement la perception menant à la réponse calcique nucléaire puisque cette réponse a été observée, avec les mêmes caractéristiques (fréquence, intensité), dans les deux fertilisations phosphatées testées.

La deuxième approche, consistant à étudier l'effet de la nutrition phosphatée sur l'expression des gènes végétaux en réponse à différents signaux fongiques, m'a permis d'expérimenter un outil d'analyse semi-transcriptomique (via la technologie Fluidigm®). C'était une analyse exploratoire mais qui nous a permis de mettre en évidence que les plantes répondent à la présence du champignon (CO₄, Myc-LCO, GSE) notamment par l'induction d'un certain nombre de gènes de défense. Ces gènes semblent légèrement plus induits en condition HighP que LowP. Comme décrit dans la discussion du chapitre II (2 – 5),

des réponses de défense ont déjà été décrites dans la littérature lors de l'interaction MA. La comparaison des réponses de défense observées ici avec celles obtenues dans des conditions d'interaction avec un agent pathogène permettrait de mieux interpréter les réactions obtenues dans nos conditions. Les plantes répondent aussi (principalement lors des traitements Myc-LCO) par l'induction de gènes déjà décrits comme induits en réponse aux Myc-LCO. De manière intéressante, l'expression de plusieurs gènes de cette dernière classe (réponse Myc-LCO) est régulée négativement en condition HighP (sans traitement). Au final l'expression de ces gènes en réponse aux signaux fongiques est donc moins importante en HighP que LowP, laissant penser que les plantes seraient moins à même d'induire des réponses symbiotiques lorsqu'elles ne sont pas carencées.

Le fait que les réponses calciques semblent non affectées par le phosphate mais que les réponses transcriptomiques le soient n'est pas foncièrement contradictoire. En effet, l'effet le plus fort de la nutrition phosphatée sur l'expression des gènes est surtout retrouvé sur des gènes de réponse aux Myc-LCO dont l'expression est réduite en condition HighP. Dans ce cas-là, cette régulation négative est observée uniquement du fait d'être en condition HighP, sans qu'il n'y ait un traitement par des signaux fongiques. Cette inhibition est peut-être complètement indépendante de la voie SYM et donc des oscillations calciques qu'on lui associe. Il faut noter que lorsque des traitements ont été appliqués avec les signaux fongiques l'expression des gènes liés à la défense et liés à la réponse « myc » ont été induits dans les deux conditions LowP et HighP, tout comme les réponses calciques.

À travers ces approches nous abordons ici des questions qui touchent aux mécanismes de perception et de réponse aux signaux mycorhiziens. Ces voies et les signaux symbiotiques vraiment pertinents, avérés par des approches génétiques, sont aujourd'hui encore mal connus. L'exploitation des approches que nous avons utilisées ici, mais en testant davantage de signaux symbiotiques, en les comparant avec de vrais éliciteurs de réaction de défense, dans des fonds génétiques mutés et sauvages, pourraient nous apporter des informations complémentaires précieuses pour préciser les mécanismes de régulation et peut-être mettre en évidence d'autres voies de signalisation impliquées dans la symbiose MA (en plus de la voie SYM).

Notre étude sur la régulation de la mycorhization par le phosphate révèle l'existence probable de processus complexes faisant intervenir plusieurs niveaux de régulation. Dès le

début de l'étude, plusieurs mécanismes hypothétiques de régulation pouvaient être proposés pour expliquer le phénotype mycorhizien observé en condition HighP (Figure 40). La limite de temps que représente la thèse nous a obligés à sélectionner une partie de ces mécanismes afin de tester leur implication dans la régulation de la mycorhization par le phosphate (hypothèses n°1 à n°4 présentées en Figure 28, reprises ici dans la Figure 40). D'autres mécanismes régulateurs non abordés dans notre travail peuvent aussi être envisagés (hypothèses n°5 et n°6 détaillées en Figure 40 et dans les parties suivantes 1 – 1/ et 1 – 2/ respectivement).

1 – 1/ Hypothèse n°5 : les strigolactones n'ont pas dit leur dernier mot...

1 – 1a/ Importance des HPC et des transporteurs de strigolactones ?

Une nouveauté intéressante concernant les strigolactones est le transporteur PDR1 découvert très récemment chez le pétunia. Ce transporteur est exprimé dans les cellules de l'hypoderme racinaire et permet la sécrétion de strigolactones (Kretzschmar *et al.*, 2012). Le mutant *pdr1* ne sécrète plus de strigolactones et il est moins mycorhizé. Une fois rentré dans les racines de *pdr1*, le champignon développe des structures normales (tout comme dans nos expériences en condition HighP) et les auteurs expliquent la moindre mycorhization de ce mutant par une diminution du nombre de points de pénétration. *PDR1* est surexprimé en condition de carence phosphatée et il est fortement exprimé dans les cellules contenant des arbuscules bien développés. Les cellules de l'hypoderme sont ici notre point d'intérêt. En effet, certaines plantes possèdent deux types de cellules hypodermiques : des cellules dont la paroi est subérisée et d'autres dépourvues de subérine appelées « cellules de passage hypodermiques » ou HPC (hypodermal passage cells) nommées ainsi pour leur capacité à laisser passer de l'eau et des minéraux vers l'intérieur des racines (Sharda & Koide, 2008). Une étude menée sur des plantes comportant des proportions variables de HPC parmi les cellules hypodermiques montre que quel que soit le taux de HPC présent, le champignon passe exclusivement via les HPC pour coloniser les racines (Sharda & Koide, 2008). De plus, les résultats concernant PDR1 montrent que le transporteur est justement présent au niveau de ces HPC (Kretzschmar *et al.*, 2012). Les auteurs proposent que l'exsudation des strigolactones via les HPC en condition LowP permet la création d'un gradient local de strigolactones, qui guide le développement du champignon MA vers les HPC facilitant

l'initiation de l'interaction. Puisque la présence de HPC semble facile à détecter (via une simple coloration), il serait intéressant d'évaluer leur nombre et leur répartition en HighP et LowP.

1 – 1b/ Les strigolactones, signaux systémiques ?

On sait aujourd'hui que certaines réponses à la nutrition phosphatée sont régulées de façon systémique. Parmi ces réponses on trouve principalement les réponses qui concernent les processus liés au maintien de l'homéostasie du phosphate comme par exemple la mise en place des transporteurs de Pi (Thibaud *et al.*, 2010 ; Péret *et al.*, 2011) et aussi la mycorhization. Pour certaines de ces réponses, le signal systémique régulateur est connu (ex : miR399) mais dans le cas de la mycorhization, le signal systémique régulateur n'est pas encore identifié. Nos résultats montrent que la production de strigolactones est elle aussi régulée de façon systémique par le phosphate. De plus, Breuillin *et al.* (2010) ont montré que le phosphate peut réguler de façon systémique l'expression de gènes impliqués dans la production de strigolactones, et Yoneyama *et al.* (2012) ont indiqué que l'azote et le phosphate régulent la production de strigolactones de manière systémique, confirmant nos résultats. On peut alors imaginer que les strigolactones elles-mêmes représentent le signal systémique recherché qui contrôle en interne la mise en place de la mycorhization ou même d'autres réponses à la carence. Cependant, la validation de cette hypothèse au niveau expérimental est difficile à mettre en œuvre car il est pour le moment impossible de découpler les différents rôles possibles que peuvent endosser les strigolactones (signaux hormonaux, signaux rhizosphériques, et signaux systémiques qui nous intéressent ici).

1 – 1c/ Les strigolactones, rôles hormonaux ?

Une autre possibilité est que la fonction hormonale endogène des strigolactones (et non leur rôle en tant que signal dans la rhizosphère) serait impliquée dans la régulation de la symbiose en contrôlant des éléments importants pour la formation des hyphopodes (hypothèse n°5, Figure 40). La signalisation hormonale liée aux strigolactones pourrait par exemple influencer le développement racinaire (favorisant ou non la formation de racines propices à l'interaction), le relief ou la composition de l'épiderme (voir partie 1 – 2/) ou la capacité des racines à accueillir les champignons MA.

L'importance des strigolactones en tant qu'hormones dans le processus de contrôle de la mycorhization n'a pas été envisagée au début du projet car il n'y avait à l'époque pas d'études faisant le lien entre cette hormone, le développement racinaire et les réponses à la carence. Depuis, l'effet des strigolactones sur le contrôle du développement racinaire a été abordé par plusieurs équipes (Kapulnik *et al.*, 2011 ; Koltai, 2011 ; Rasmussen *et al.*, 2012). Ces deux dernières années plusieurs études ont aussi permis de faire le lien entre les strigolactones et les réponses à la carence phosphatée au niveau du développement aérien (Umehara *et al.*, 2010 ; Kohlen *et al.*, 2011) et racinaire (Ruyter-Spira *et al.*, 2011 ; Mayzlish Gati *et al.*, 2012).

Enfin, une étude tout récemment publiée a essayé de séparer le rôle des strigolactones en tant que signal dans la rhizosphère et celui hormonal qu'elles pourraient avoir dans le contrôle de la mycorhization. Les auteurs ont utilisé pour cela les mutants de riz *d3* (gène impliqué dans la perception des strigolactones) et *d14* (récepteur pressenti des strigolactones) et analysé leurs phénotypes mycorhiziens (Yoshida *et al.*, 2012). De façon surprenante le mutant *d3* est beaucoup moins mycorhizé que le sauvage alors le mutant *d14* est lui mycorhizé normalement. Ces résultats contradictoires ne permettent pas d'établir clairement le rôle hormonal *in planta* des strigolactones dans le contrôle de la mycorhization. Les auteurs proposent que D3 et D14 pourraient être impliquées dans la réponse à des molécules en partie différentes. Dans ce cas, il resterait à déterminer si le phénotype mycorhizien de *d3* est lié à son incapacité à percevoir les strigolactones ou bien à la perte d'autres fonctions.

Par la suite il serait donc intéressant de rechercher si le contrôle de la mycorhization par le phosphate fait intervenir ou non la signalisation hormonale des strigolactones. On pourrait examiner l'effet du phosphate sur l'expression de *MAX2* et de *D14*. De plus, on pourrait regarder si l'effet du phosphate sur l'expression des gènes de réponse aux Myc-LCO est maintenu chez ces mutants. Pour cela on pourrait étudier l'effet du HighP sur l'expression des gènes de réponse aux signaux fongiques chez le mutant *d3* et voir si ces derniers sont aussi inhibés en HighP. Ainsi on pourrait savoir si l'inhibition observée dans notre expérience de Fluidigm® fait intervenir les strigolactones. Les résultats apportés dans l'étude des mutants *d3* et *d14* nous donnent envie de travailler à nouveau avec les mutants de pois affectés dans la voie des strigolactones que nous avons à notre disposition (*rms1*, *rms5* et *rms4* correspondant à *ccd8*, *ccd7* et *max2* respectivement) pour voir par exemple si

les champignons MA forment moins d'hyphopodes sur les racines de ces derniers. Cette possibilité n'a jamais été testée (seul le taux de colonisation des racines à un temps tardif a été mesuré), bien qu'elle puisse indiquer si les strigolactones sont nécessaires pour réguler la formation de ces structures mycorhiziennes.

L'intérêt initial porté à ces molécules, en tant que signaux diffusibles importants pour la mycorhization (Akiyama *et al.*, 2005 ; Besserer *et al.*, 2006, 2008 ; Bouwmeester *et al.*, 2007) a ensuite abouti à la découverte de leur rôle hormonal (Gomez-Roldan *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*, 2008). Leur étude aujourd'hui pour mieux comprendre la régulation de la mycorhization (notamment par le phosphate) apportera peut-être de nouveaux éléments de compréhension quant aux voies de signalisation et au mode d'action de cette hormone chez les plantes.

1 – 2/ Hypothèse n°6 : existence de signaux de surface ?

Un autre processus de régulation possible pourrait être lié à l'existence de signaux de surface au niveau de l'épiderme racinaire qui seraient modifiés par la fertilisation phosphatée (Figure 40). En effet, il est connu que les hyphes de champignon MA sont capables de reconnaître spécifiquement les cellules épidermiques et de former un hyphopode à la surface de fragment de paroi d'épiderme isolé (et non sur des fragments de paroi provenant d'autre tissus racinaires) (Nagahashi & Douds, 1997). De plus, les hyphopodes semblent préférentiellement se former au niveau des sillons présents à la jonction entre cellules épidermiques. De façon intéressante, les parois des cellules au niveau de ces sillons sont plus fines, lâches, et plus riches en pectine non estérifiée (Bonfante *et al.*, 2000). Actuellement, peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes qui déclenchent la formation des hyphopodes. On peut imaginer que des éléments tels que la composition pariétale ou le « relief » (ou topographie) des cellules de l'épiderme sont importants. Ces paramètres concernant l'épiderme des végétaux sont connus comme pouvant influencer la pathogénicité de certains champignons ou oomycètes pathogènes (Hoch *et al.*, 1987 ; Vogel *et al.*, 2004 ; Hernández-Blanco *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2011b). Ils pourraient être également cruciaux pour la reconnaissance de la racine et la formation des hyphopodes par les hyphes des champignons MA. Le phosphate pourrait affecter certains de ces paramètres, limitant ainsi la formation des hyphopodes en condition HighP.

Concernant la composition pariétale, une étude récente indique qu'un gène appelé *RAM2* codant pour une glycerol-3-phosphate acyl transferase (GPAT) impliquée dans la formation de cutine et de subérine est déterminant pour la formation d'hyphopodes chez *M. truncatula* (Wang *et al.*, 2012). Chez le mutant *ram2*, la teneur dans la cutine et la subérine en un acide gras spécifique (le 1,16-hexadecanediol) est réduite et très peu d'hyphopodes sont formés à la surface des racines (phénotype similaire à celui obtenu dans nos conditions HighP). L'ajout de ce monomère pur permet de restaurer la formation d'hyphopodes chez le mutant (Wang *et al.*, 2012). Ces résultats confirment l'importance de la composition des parois pour la formation des hyphopodes. D'après nos résultats de l'expérience Fluidigm®, le gène *RAM2* semble très légèrement moins exprimé en condition HighP. Il faudrait savoir si cette diminution représente une réalité biologique en déterminant spécifiquement la teneur en 1,16-hexadecanediol dans les parois dans les deux conditions LowP et HighP. Enfin, il faudrait examiner si un traitement avec le 1,16-hexadecanediol en condition HighP est suffisant pour restaurer la formation d'hyphopodes.

De façon moins ciblée, on peut imaginer analyser la composition des parois grâce à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau à analyser et permet d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. La FTIR a déjà été utilisée pour caractériser des mutants d'*A. thaliana* connus pour être affectés dans la formation de la paroi (Mouille *et al.*, 2003). Dans cette étude, la FTIR permet de classer ces mutants en différentes catégories selon leur spectre d'absorption. Nous pouvons réaliser une analyse FTIR sur une petite zone des racines développées en LowP ou HighP (avec ou sans champignon) et regarder si les profils d'absorption sont différents selon les apports phosphatés. Cela pourrait nous permettre d'orienter ensuite l'analyse vers des composés particuliers. De même, des coupes transversales de racines peuvent être réalisées pour marquer spécifiquement les composants de la paroi (tels que la pectine, la cellulose, l'hémicellulose, des protéines pariétales via soit des colorants soit des anticorps spécifiques) et comparer la proportion des différents composants pariétaux dans les deux conditions.

Concernant maintenant le relief des racines, on sait par exemple que le phosphate influence le développement racinaire et notamment la mise en place des poils absorbants,

affectant potentiellement le relief de l'épiderme. Le relief des racines peut être analysé en microscopie électronique à balayage (à haute résolution si besoin en utilisant par exemple la technique FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscopy) ou à transmission pour comparer l'épiderme de racines en LowP avec celui de racines HighP.

Une dernière piste à propos de l'épiderme racinaire serait un rôle potentiel du mucilage et des cellules bordantes de la coiffe racinaire dans cette régulation. En effet, la présence de mucilage est connue pour influencer positivement la ramification du champignon et la mycorhization (Arriola *et al.*, 1997 ; Nagahashi & Douds, 2004). La présence d'un mucilage qualitativement ou quantitativement différent selon les conditions phosphatées pourrait être évaluée.

Peu d'informations sont aujourd'hui disponibles sur les mécanismes à l'origine de la formation des hyphopodes par les champignons MA. En essayant de tester l'hypothèse selon laquelle le phosphate affecterait l'épiderme (relief, ou composition), nous pourrions parvenir à une meilleure compréhension du processus de formation des hyphopodes en général. Pour aller dans ce sens, nous pouvons aussi envisager des études du côté du champignon, en comparant par exemple les réponses transcriptomiques entre différentes étapes de développement (germination, développement germinatif, ramification, et formation d'hyphopodes). On pourrait par exemple étudier si la réponse de gènes fongiques connus comme spécifiquement induits lors du développement de l'hyphopode (Brechenmacher *et al.*, 2004 ; Breuninger & Requena, 2004 ; Seddas *et al.*, 2009) peut être induite par des molécules de surface racinaires trouvées en plus grande abondance chez les plantes cultivées en LowP.

2/ Des enjeux fondamentaux et appliqués

2 – 1/ Mieux comprendre l'interaction mycorhizienne et la nutrition phosphatée des plantes en général

Comme indiqué dans l'introduction, l'utilisation du phosphate en tant qu'élément régulateur de la symbiose mycorhizienne représente surtout ici un outil qui nous permet

d'étudier des mécanismes régulateurs de l'interaction au sens plus large (pas seulement lors de la régulation par le phosphate). Notre approche a donc été menée dans le but d'une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs de la symbiose MA en général. En effet, à travers nos approches, nous soulevons par exemple des questions concernant les voies de perception des signaux diffusibles fongiques et de signalisation qui en découlent.

Un exemple où l'étude de la régulation de la mycorhization par le phosphate a permis la mise en évidence l'existence de systèmes de régulation interconnectés est la régulation par la nutrition azotée. En effet, la nutrition azotée peut être rajoutée parmi les éléments régulateurs de l'interaction mycorhizienne. Tout comme le phosphate, l'azote peut être prélevé via la voie symbiotique et transféré à la plante par le champignon. L'azote est bien plus diffusible dans les sols que le phosphate surtout dans des conditions humides et dans ces conditions les plantes utilisent la voie directe pour prélever l'azote du sol. Cependant, dans certains environnements (arides par exemple), la voie privilégiée de prélèvement de l'azote est alors la voie symbiotique (Miransari, 2011). Le champignon peut prélever dans le sol de l'azote sous forme d'ammonium, de nitrate ou d'acides aminés et favoriser la minéralisation de l'azote issu des matières organiques (Govindarajulu *et al.*, 2005 ; Javot *et al.*, 2007b ; Miransari, 2011 ; Fellbaum *et al.*, 2012). Il est ensuite transformé en arginine et transporté à travers les hyphes jusqu'aux arbuscules où il est transmis à la plante sous forme d'ammonium. Ce dernier est prélevé par la plante via des transporteurs d'ammonium exprimés spécifiquement lors de la mycorhization au niveau des arbuscules (Parniske, 2008). Cependant, l'amélioration de la nutrition azotée des plantes par la mycorhization semble limitée et l'effet régulateur de l'azote reste controversé (Atul-Nayyar *et al.*, 2009 ; Javot *et al.*, 2011). Etudier à travers les mêmes expériences la régulation azotée et phosphatée de la mycorhization est délicat à mener car cela démultiplie le nombre de conditions à réaliser. Cependant une étude récente menée chez *M. truncatula* portant sur *MtPT4* (le transporteur de phosphate spécifique des arbuscules) a mis en évidence un lien entre phosphate, azote et mycorhization (Javot *et al.*, 2011). Une mutation du gène *MtPT4* était déjà connue pour entraîner des arbuscules anormaux, signe que si l'échange de phosphate au niveau des arbuscules ne se fait pas correctement alors la symbiose est inhibée (Javot *et al.*, 2007a). Des expériences plaçant cette fois le mutant *pt4* dans des conditions de double carence phosphatée et azotée, permettent de restaurer un phénotype mycorhizien/arbusculaire normal (Javot *et al.*, 2011). Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle l'efficacité du

transfert du phosphate ou même de l'azote symbiotique dans les cellules végétales peut être critique pour le maintien de l'interaction. Ils démontrent aussi que les plantes peuvent contrôler la colonisation de leurs racines selon leurs besoins nutritionnels en phosphate mais aussi en azote.

Plus généralement, les études concernant les réponses végétales à la carence phosphatée sont le plus souvent menées chez *A. thaliana*, écartant ainsi l'étude de la mycorhization comme élément de réponse possible. Or, les éléments régulateurs que nous recherchons pourraient intervenir plus largement dans le contrôle des réponses à la carence, concernant ainsi le fonctionnement des plantes en général et pas seulement la mycorhization. Nos approches et résultats visent à mieux replacer la mycorhization dans le contexte général des réponses à la carence, et à déterminer quelle part la mycorhization a dans ces réponses, quels éléments de régulation sont spécifiques de la mycorhization et lesquels sont communs...

Mieux comprendre comment les plantes régulent leur croissance et répondent à la carence phosphatée est un enjeu majeur pour l'agriculture de demain. En effet, le phosphate est actuellement essentiellement apporté sous forme d'intrant minéral dans les systèmes culturels occidentaux, mais sa disponibilité limitée nous amène à repenser notre mode de production agricole basé sur l'utilisation importante d'intrants phosphatés.

2 – 2/ Mieux faire face à la crise du phosphate...

2 – 2a/ De la malnutrition phosphatée des plantes à la crise invisible du phosphate

Le phosphate est un élément essentiel au développement végétal. La faible concentration en phosphate disponible pour les plantes dans les sols agricoles (souvent proche des 10 μM (Schachtman *et al.*, 1998), rend cet élément limitant pour la croissance des plantes. Les cultures végétales actuelles sont basées sur un apport de fertilisants phosphatés minéraux pour fournir du P_i soluble aux plantes et augmenter les rendements. Les engrais phosphatés proviennent de ressources minérales naturelles issues des roches sédimentaires riches en phosphore. Ces ressources sont donc limitées et non renouvelables. L'apport d'engrais phosphatés reste peu efficace (on estime que seuls 15 à 30 % du P minéral apporté sont réellement absorbés par les plantes, Cordell *et al.*, 2009), notamment à

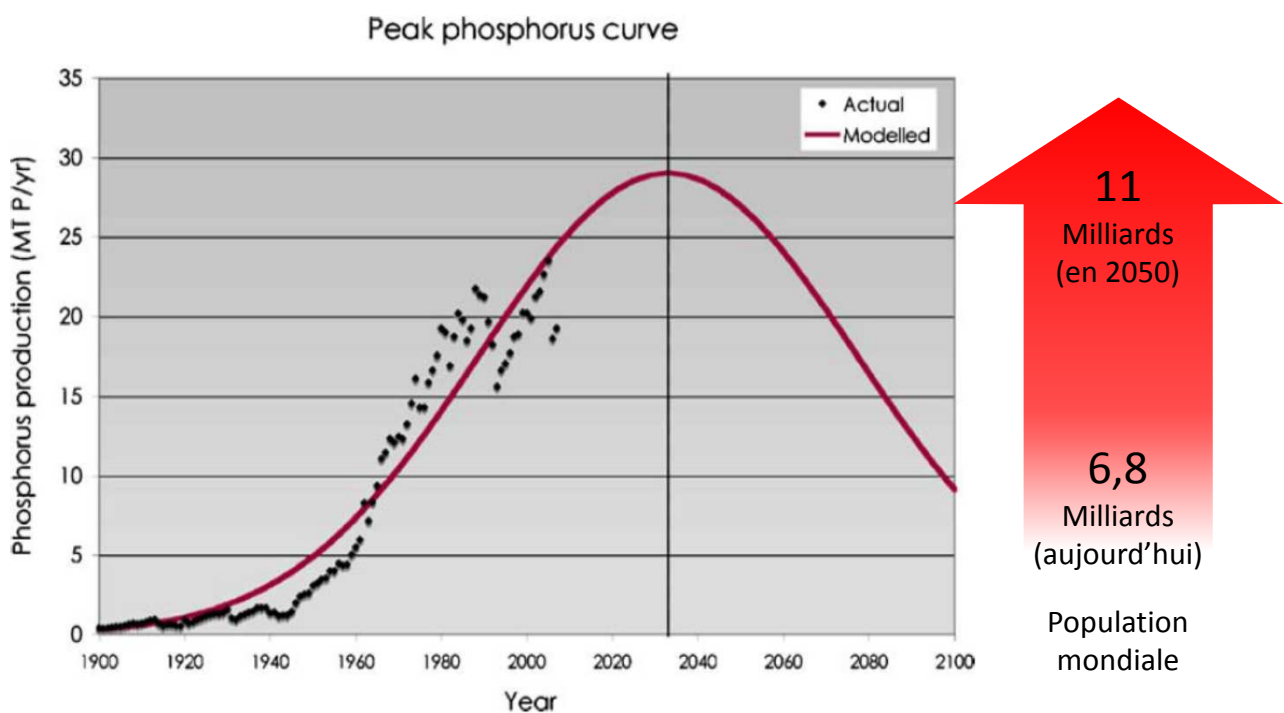


Figure 41 : La crise du phosphate.

De manière similaire au pétrole, les réserves mondiales en phosphate sont limitées, l'extraction de phosphate va atteindre un pic maximal (estimé ici autour des années 2030) à partir duquel la production devrait diminuer (**adapté d'après Cordel *et al.*, 2009**).

cause de de l'immobilisation chimique du Pi dans les sols. De plus, dans beaucoup de pays occidentaux, les engrais phosphatés sont parfois utilisés en excès pour les cultures. Le Pi peut ainsi se retrouver dans les eaux de surface sous l'effet de l'érosion des sols et finir par entraîner l'eutrophisation des systèmes aquatiques et des problèmes de pollution environnementale (Raghothama, 1999).

Les principaux producteurs de phosphate minéral (Etats-Unis, Chine, Maroc-Sahara occidental et Russie) produisent environ 72 % de la production mondiale (FAO, 2004). Les fertilisations phosphatées s'élèvent aujourd'hui à environ 10 kg de P/hectare, avec en moyenne 3 kg/ha en Afrique et 25 kg/ha en Europe (Liu *et al.*, 2008b), soit une consommation mondiale estimée à environ 17 millions de tonnes par an. L'augmentation des demandes mondiales en phosphate est estimée entre 3 à 4 % par an (augmentation liée à une population mondiale croissante qui consomme de plus en plus et notamment des produits d'origine animale, demandes issues des pays émergents modifiant leurs pratiques agricoles...) (Cordell *et al.*, 2009). La quantité et la qualité des réserves diminuent, augmentant les coûts de production et ce d'autant plus vite que la demande mondiale en phosphate augmente. Au rythme actuel, une crise du phosphore est envisagée autour de 2030-2050 pour les scénarios les plus alarmants. Cette crise correspond au moment où la capacité de production mondiale maximale aura été atteinte et au-delà de laquelle la production diminuera (Figure 41). Ce scénario très préoccupant doit nous amener à repenser les modes de production agricole et de fertilisation afin de limiter l'utilisation de phosphate minéral tout en assurant une production alimentaire mondiale en constante augmentation.

2 – 2c/ Des solutions pour faire face à la crise

Pour limiter l'effet de cette crise du phosphate on peut envisager soit d'augmenter l'offre, soit de diminuer la demande. Une augmentation de l'offre passe par une exploration plus importante des réserves naturelles, en limitant les pertes lors de l'extraction et de la transformation en fertilisant. Cette approche sera limitée de toute façon tôt ou tard par la disponibilité des ressources naturelles. Par contre, limiter les demandes en phosphate minéral peut passer par l'exploration de plusieurs pistes existantes ou en cours de développement qui ont toutes pour avantage de limiter les coûts pour l'environnement. Ces pistes se résument en deux axes qui sont à développer en parallèle : développer l'utilisation

d'engrais phosphatés renouvelables (recyclage du phosphate), et diminuer les besoins en phosphate des plantes cultivées.

- **Le recyclage du phosphate.** Longtemps utilisée par le passé comme engrais, les déchets organiques issus des milieux agricoles (compostages et déjections d'élevage) ou urbains sont des sources non négligeables de phosphate. En effet, les déchets agricoles représentent environ 15 Mt de P, ceux liés à l'activité humaine 4,3 Mt de P (Cordell *et al.*, 2009). Toujours concernant le recyclage, la valorisation du phosphore contenu dans les effluents (boues de station d'épuration des eaux) est aujourd'hui à l'étude car les eaux qui arrivent dans les stations d'épuration contiennent une grande quantité de phosphate issu des effluents agricoles, industriels et domestiques (Cordell *et al.*, 2011). Ainsi, le recyclage du phosphate devra redevenir la norme dans le futur. Dans le même ordre d'idée, le phospho-compostage est étudié. Il s'agit d'apporter du phosphate minéral en mélange avec des déchets d'élevage ou de culture et des micro-organismes capables de solubiliser le phosphate. Ces derniers transforment le phosphate piégé dans les minéraux ou les molécules organiques en phosphate assimilable par les plantes (FAO, 2004).

- **La sélection variétale :** il s'agit de sélectionner les plantes pour leur capacité de développement et de rendement dans des conditions de carence phosphatée. En effet, les variétés de grande culture semées aujourd'hui sont le fruit d'une sélection basée sur un développement végétal dans des conditions non limitantes en minéraux (les manques étant compensés par des intrants). Il faut aujourd'hui revoir ce modèle, et changer les critères de sélection des plantes. Le développement de nouvelles variétés doit valoriser des caractères permettant de bons rendements en condition de faibles intrants. De même le retour à des cultivars plus anciens et l'exploration de la diversité génétique existante pour rechercher une meilleure tolérance aux carences sont des pistes envisagées. Cette dernière approche a d'ailleurs été mise en place chez le riz, menant à la découverte chez une variété traditionnelle du gène *PSTOL1* (Phosphorus Starvation Tolerance 1) lui conférant une meilleure tolérance à la carence phosphatée (Gamuyao *et al.*, 2012). La surexpression de *PSTOL1* dans des variétés modernes dépourvues de ce gène leur confère de meilleurs rendements en condition de carence (Gamuyao *et al.*, 2012). Ces résultats prometteurs valident l'importance de ces approches. Concernant les critères de sélection à appliquer,

nous pouvons aujourd'hui proposer la capacité des plantes à tirer profit d'une interaction mycorhizienne dans des conditions de carence, favorisant ainsi la voie symbiotique pour la nutrition phosphatée.

- Changer nos pratiques culturales et favoriser les interactions symbiotiques.

Actuellement, l'amélioration des pratiques culturales (analyse des sols pour un suivi des besoins en fertilisants, fertilisation raisonnée, connaissances agronomiques...) peut limiter la consommation d'intrants. De plus, comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, la mycorhization est une des réponses naturelles que mettent en place les plantes pour faire face à la carence phosphatée. Malheureusement, les pratiques culturales actuelles ne sont pas souvent en faveur de cette interaction. En effet, l'utilisation de fongicides, le retournement du sol (labour qui détruit les réseaux mycéliens) et l'utilisation d'engrais (notamment phosphatés) sont autant de pratiques qui limitent le développement de la population microbienne du sol et l'interaction symbiotique. Mieux comprendre la biologie de ces champignons et le fonctionnement de l'interaction représente une possibilité d'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes. On pourrait par exemple évaluer les populations microbiennes des sols agricoles pour savoir quel type de culture est le mieux adapté aux micro-organismes naturellement en place, ou apporter des microorganismes spécifiques selon les besoins (cultures, sols)... Enfin, on pourrait envisager de favoriser la mycorhization des plantes même dans des sols qui ne seraient pas très pauvres en phosphate de façon à apporter aux plantes les autres avantages que représente cette interaction (nutrition hydrique, protection contre les pathogènes...). Nous savons que l'effet positif de la mycorhization sur la nutrition phosphatée des plantes est plus efficace si l'interaction a lieu dans un environnement contenant un peu de phosphate (trop de phosphate inhibe l'interaction, mais trop peu ne permet pas au champignon d'améliorer véritablement la nutrition des plantes). Se passer d'une fertilisation phosphatée n'est pas sérieusement envisageable. Les mycorhizes en combinaison avec l'ensemble des autres solutions abordées ici pourraient permettre de limiter les demandes et d'apporter de façon raisonnée du phosphate dans nos champs représentant un espoir d'agriculture plus durable.

MATÉRIELS & MÉTHODES

Matériels biologiques

- Les graines de pois (*Pisum sativum* variété Terese) sont stérilisées à l'eau de Javel (0,87 % de chlore actif) pendant 10 minutes, puis à l'éthanol 95 % pendant 2 minutes et sont rincées à l'eau distillée stérile 4 fois. Les graines sont mises à germer sur de l'eau gélosée (0,8 % d'agar p/v) pendant 4 jours à 25°C (25°C j/n, 16hj/8hn, 50 % d'humidité).

- Les graines de *Medicago* (*Medicago truncatula*, Jemalong A17) sont traitées 7 à 10 minutes dans de l'acide sulfurique pur, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite stérilisées à l'eau de Javel (0,87 % de chlore actif) durant 2 à 3 minutes et rincées 5 fois à l'eau distillée stérile avant d'être déposées sur de l'eau gélosée (0,8 % d'agar p/v) dans des boîtes de Petri. Les graines sont ensuite placées à l'obscurité couvercle en bas 4-5 jours à 4°C, puis 1 jour à 25°C (16hj/8hn, 50 % humidité).

- Des spores stériles de *Rhizophagus irregularis* (DAOM197198) sont achetées à la société Agronutrition (Labège, France). Les spores de *Gigaspora rosea* (DAOM 194757) produites dans notre équipe ou celles de *Gigaspora gigantea* HC/F E30 (Herbarium Cryptogamicum Fungi, Université de Turin, Italie) produites par l'équipe de David Barker sont produites et stérilisées comme décrit dans Besserer *et al.*, 2006.

Conditions de culture

Les plantes sont cultivées en chambre de culture (16hj/8hn, 22°Cj/20°Cn, humidité 70 %j/72 %n). Le substrat utilisé est composé d'argile concassée stérilisée (Oil-Dri, Klasmann, France). Les pois sont semés dans des pots contenant 250 ml de substrat et *M. truncatula* dans des pots de 150 ml. Les plantes sont fertilisées quotidiennement avec une solution d'arrosage Long Ashton Nutrient Solution (LANS) (Hewitt, 1966) diluée au ½ avec des concentrations finales en phosphate de 7,5 µM (LowP), 75 µM (MediumP), 750 µM (HighP) ou 3,75 mM (HighP-Mt) avec du NaH₂PO₄ comme source de phosphate sauf indication contraire.

Inoculation des plantes et détermination du taux de mycorhization

- Pour le pois, chaque pot est inoculé avec 150 ou 600 spores de *R. irregularis* (selon l'expérience, inoculum précisé dans la légende des figures) ou 100 spores de *G. rosea*. Pour *M. truncatula*, chaque pot est inoculé avec 90 spores de *R. irregularis*. Les 2/3 des spores sont apportées en mélange dans le substrat, les 1/3 restants sont placés dans le puits accueillant la graine germée.

- Pour estimer le taux de mycorhization, les racines sont échantillonnées de la façon suivante : elles sont découpées en fragments d'environ 1 cm et placées dans un grand volume d'eau pour les disperser. Des fragments de racine sont alors prélevés à différents endroits de ce mélange. Les racines sont traitées 10 minutes au KOH 10 % à 95°C, puis rincées abondamment à l'eau froide et enfin colorées à l'encre noire Schaeffer (5 % acide

acétique, 5 % encre) et bien rincées (Vierheilig *et al.*, 1998). Le taux de mycorhization est ensuite estimé sous loupe binoculaire en déterminant le pourcentage de longueur de racine colonisée par le champignon (c'est-à-dire montrant des arbuscules et/ou vésicules) grâce à la méthode dite de « gridline intersect » (Giovannetti & Mosse, 1980). Le taux de mycorhization des racines peut aussi être évalué selon la méthode proposée par Trouvelot *et al.*, 1986 qui attribue des classes de pourcentage de mycorhization (de 0 à 5) par fragment analysé, en indiquant les fréquences des structures mycorhiziennes. Cette méthode détaillée permet notamment de caractériser finement des mutants, elle n'a pas été utilisée dans notre étude. En effet, nous avons adopté le système gridline intersect car c'est un système de comptage très rapide et plus simple, qui suffit amplement pour distinguer les réponses très nettes que nous avons entre les conditions LowP et HighP. Pour une quantification plus précise des hyphopodes (Tableau 1) et la coloration de jeunes systèmes racinaires entiers (expériences « double-cone » Figure 27), les plantes sont récoltées avec précaution et la coloration est faite dans des caissettes d'inclusion. Pour la quantification des hyphopodes, 60 fragments de 1cm de long sont examinés par plante, et les hyphopodes sont dénombrés sous microscope (grossissement 40x) (et non plus avec le système gridline intersect). Concernant les plantules des « double-cone », l'ensemble du système racinaire est coloré en caissettes d'inclusion et est minutieusement observé sous loupe binoculaire et les différentes structures sont dénombrées.

Expériences de split-root

Des graines de pois stériles sont mises à germer sur du milieu solide *in vitro* (solution d'arrosage Long Ashton solidifiée avec du Phytigel 0,4 %) à 25°C jour et nuit, 16hj/8hn, 50 % d'humidité jusqu'à ce que la racine mesure environ 2 cm (environ une semaine. L'apex racinaire (environ 3 mm) est sectionné au scalpel et la racine primaire est découpée en deux parties égales dans le sens de la longueur. Les plantules sont remises dans la boîte de culture sur milieu solide le temps que des racines latérales se développent de chaque côté (environ une semaine). Elles sont ensuite transférées dans un système constitué de 2 pots de 150 ml maintenus bord à bord. Chaque compartiment est inoculé avec 90 spores de *R. irregularis* mélangées au substrat. Au moment de la récolte, la masse fraîche des deux parties du système racinaire est déterminée et les plantes dont le système racinaire est trop déséquilibré entre les côtés (avec une partie au moins deux fois plus importante que l'autre) sont exclues de l'analyse.

Mesure des teneurs en phosphate

- Les teneurs en phosphate inorganique (Pi) dans les plantes sont mesurées grâce à une méthode colorimétrique basée sur le bleu de molybdène (protocole décrit dans Nanamori *et al.*, 2004). La seule modification apportée concerne le broyage des tissus dans l'acide perchlorique qui est réalisé à l'aide d'un broyeur à billes (FASTPREP®, MP Biomedicals, matrice de lyse A).

- Les teneurs en phosphore total (P_{tot}) sont mesurées grâce à une méthode modifiée à partir du protocole proposé par Ames en 1966. L'échantillon de masse fraîche connue est broyé dans de l'acide perchlorique à l'aide du broyeur à billes et centrifugé (30 secondes à 10000g, 4°C). 0,1 ml du surnageant est transféré dans un tube en verre avec 30µL de solution de nitrate de magnésium 10 % (p/v). L'échantillon est porté à sec et réduit en cendres par agitation au-dessus d'une flamme (minéralisation de l'échantillon). Le tube est laissé à refroidir et l'échantillon sec est repris dans 0,6 ml de HCl 0,5N. Une aliquote de 0,3 ml est chauffée à 90°C durant 15 minutes pour hydrolyser le pyrophosphate formé dans la cendre en phosphate inorganique dosable. Les échantillons sont ensuite traités comme pour le phosphate inorganique.

Préparation des exsudats racinaires

- En général (pour l'analyse des strigolactones en spectrométrie de masse, pour les bioessais de ramification et de germination fongique et pour la stimulation des spores en « double-cone ») les exsudats sont produits comme suit : des plantes non inoculées arrosées en LowP ou HighP âgées de trois semaines sont retirées du substrat et les racines sont rincées. Les racines des plantes de chaque condition sont placées ensemble dans un récipient et sont recouvertes de solution d'arrosage LowP ou HighP (NB les racines ne sont pas séparées des parties aériennes). Les plantes sont mises à exsuder 24h en salle de culture, avec les racines à l'obscurité. Pour la stimulation des spores en « double-cone », les exsudats sont utilisés directement sans extraction ni congélation. Pour les échantillons analysés en spectrométrie de masse ou testés en bioessais, les exsudats sont filtrés sur nylon, puis extraits avec un volume d'acétate d'éthyle. La phase organique est traitée avec un volume de K₂HPO₄ 0,2 M et conservée pour l'étape suivante. L'eau résiduelle est enlevée avec du MgSO₄ anhydre (ce composé est ensuite retiré par filtration) et la phase d'acétate d'éthyle est séchée à l'évaporateur rotatif. L'extrait est ensuite remis en suspension dans le solvant approprié pour les analyses de masse ou les bioessais et la concentration est ajustée selon le poids sec des racines.

- Des exsudats bruts pour la mycorhization sont aussi produits. Pour l'expérimentation avec des plantes en split-root (Figure 24), les plantes sont inoculées d'un côté (90 spores de *R. irregularis* /compartiment de 150 ml) et non inoculées du côté servant à produire les exsudats. La production d'exsudats consiste à apporter sur le dessus du pot 100 ml de solution d'arrosage. La solution est récupérée sous les pots donneurs dans une coupelle et est appliquée directement aux pots receveurs. Pour l'expérimentation présentée en Figure 25, des pots de 300 ml inoculés avec 180 spores de *R. irregularis* servent à produire des exsudats de la même manière.

Bioessai de germination du champignon *R. irregularis*

Les essais sont réalisés dans des plaques 25 compartiments. 4 compartiments sont utilisés par traitement. Chaque compartiment contient 1 ml de suspension de spores contenant 30 spores de *R. irregularis* et 1mL de la solution à tester. Les solutions à tester

correspondent aux solutions d'arrosage (concentrées deux fois pour atteindre au final leur concentration normale en tenant compte du volume de la suspension de spores). Les solutions d'arrosage seules sont testées (Figure 18-A), mais aussi les solutions d'arrosage additionnées d'exsudats racinaires (les 1 ml de solution test contiennent alors des extraits d'exsudats racinaires produits par l'équivalent de 1 mg de poids sec) (Figure 23-A). Les boîtes sont incubées dans une étuve à 2 % de CO₂, à 30°C et à l'obscurité. Le taux de germination est déterminé sous loupe binoculaire à 2 et 5 jours après traitement.

Bioessai de ramification du champignon *G. rosea* (« branching test »)

- Des spores de *G. rosea* sont mises à germer sur du milieu M solide (Bécard & Fortin, 1988) additionné de quercétine (10 µM) comme décrit par Besserer *et al.*, 2006. Les extraits d'exsudats racinaires sont repris dans un mélange acétonitrile/eau (1:9 v:v) à raison de 1 mL de solution pour 120 mg de poids racinaire. 5 µL d'échantillon sont appliqués dans 2 puits creusés dans la gélose des deux côtés de l'hyphe principal d'une spore germée depuis 6 jours. Les nouveaux apex fongiques sont dénombrés 48h après traitement. Les témoins incluent des spores traitées avec de l'acétonitrile 10 % seulement (témoins négatifs) ou du GR24 à 100 nM repris dans de l'acétonitrile 10 % (témoins positifs) (Figure 23-B).

- Pour les résultats présentés en Figure 18-B, les spores ont germé sur de la solution LANS LowP ou HighP solidifiée avec de l'agar 0,7 % et ont été traitées avec du GR24 à 100 nM repris dans de l'acétonitrile 10 % ou avec le solvant uniquement.

Analyses en spectrométrie de masse.

Les extraits d'exsudats racinaires sont repris dans un mélange acétonitrile/eau (1:1 v:v). La détection des strigolactones est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse 4000 Q-Trap avec une source Turbo V ESI en mode positif couplée à un système HPLC Agilent 1100 comme décrit dans Gomez-Roldan *et al.*, 2008, à l'exception des modifications suivantes. La séparation HPLC est réalisée sur une colonne C18 (5 µm, 2,1 x 250 mm, ACCLAIM 120C18, Dionex). Les solutions d'acide formique:eau (1:103 v:v ; A) et d'acide formique:acétonitrile (1:103 v:v ; B) sont pompées à 0,2 ml/min. Le gradient utilisé à partir de mélanges A:B est le suivant : 50 % de B pendant 5 minutes, de 50 à 70 % de B en 5 minutes, 70 % de B pendant 10 minutes, de 70 à 100 % de B en 10 minutes et 100 % de B durant 5 minutes. Les intensités de pic présentées correspondent à l'injection de 10µL équivalents à 74 mg de poids sec racinaire. Du GR24 est rajouté en standard externe dans l'ensemble des échantillons avant l'injection, à une concentration finale de 100 nM. Les deux strigolactones majeures du pois et le GR24 sont détectés en mode MRM en enregistrant les transitions suivantes : 405>97 et 405>345 *m/z* pour le fabacyl acetate, 389>233 et 411>254 *m/z* pour l'orobanchyl acetate, et 299>202 *m/z* pour le GR24.

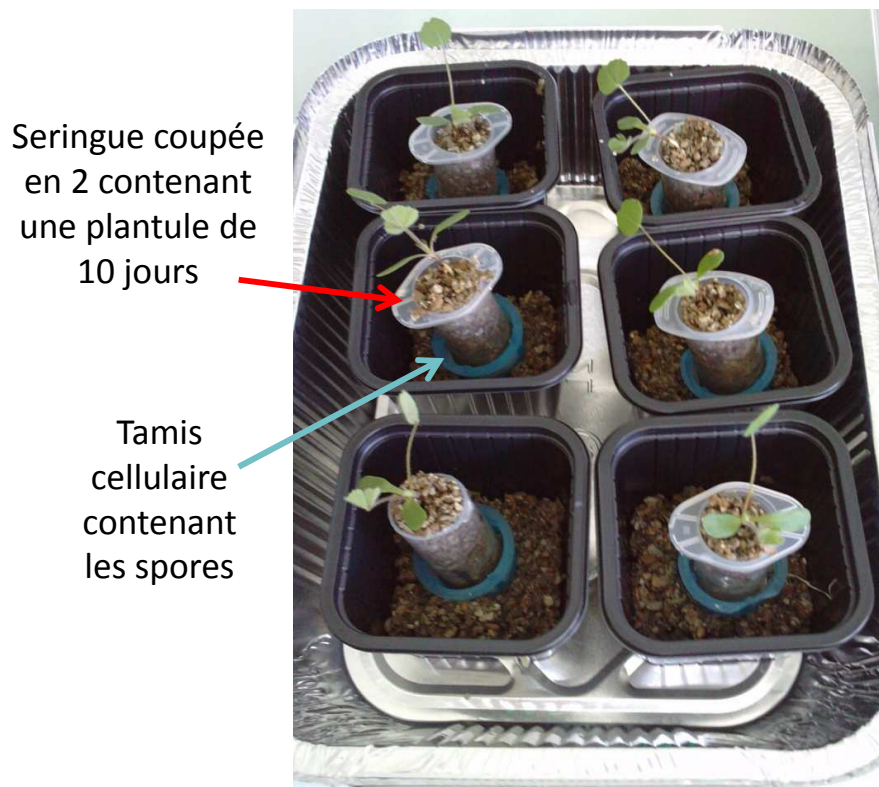


Figure 42 : Photographie du système double-cône lors du contact entre les spores et les racines.
 Des plantules mises à pousser dans des seringues coupées en 2 sont positionnées dans un tamis cellulaire contenant 500 spores de *R. irregularis* (prétraitées pendant 15 jours avec des exsudats racinaires). Le tout est positionné dans un pot contenant un fond de substrat humide afin de maintenir le système vertical à l'humidité.

Expérimentations « double-cone »

Production d'exsudats végétaux pour stimuler les spores : voir partie « préparation des exsudats racinaires ». Informations supplémentaires : 2 plantules de *M. truncatula* sont semées par pot de 150 mL de substrat. Pour produire des exsudats, les racines de 8 plantes (4pots) sont placées dans un récipient contenant 200 mL de solution d'arrosage Long Ashton LowP ou HighP-Mt (de quoi recouvrir les racines). Un nouveau lot d'exsudats est produit à chaque fois que les spores doivent être traitées (pas de congélation des exsudats).

Traitement des spores par les exsudats végétaux : 500 spores stériles de *R. irregularis* sont placées dans un tamis cellulaire 40 µm (BD Falcon™). Le tamis est déposé dans un compartiment d'une plaque 6 compartiments. 8 ml d'exsudats racinaires LowP ou HighP-Mt filtrés (avec une seringue et un filtre 0,22 µm) sont placés dans chaque compartiment contenant un tamis et des spores. La boîte est placée dans une étuve avec 2 % d'éthanol CO₂, à 30°C et à l'obscurité pendant 15 jours. Durant ces 15 jours, les spores sont traitées 3 fois avec des nouveaux exsudats racinaires, à chaque fois le tamis contenant les spores est transféré dans une nouvelle boîte 6 compartiments et les exsudats filtrés sont appliqués sur les spores.

Plantules pour contact avec les spores : 10 jours avant contact avec les spores, des graines germées de *M. truncatula* sont placées dans des seringues de 20 mL coupées en 2 (ces demi-seringues servent de mini-pots). Le fond des seringues est fermé avec une membrane de nylon 0,8 µm maintenue sous seringue avec un élastique. Les plantules sont cultivées pendant 10 jours et sont arrosées avec de la solution nutritive Long Ashton LowP ou HighP-Mt (16hj/8hn, 25°Cj/22°Cn, 80 % d'humidité).

Contact spores-racines (illustration Figure 42): lorsque les plantules pour le contact sont âgées de 10 jours et que les spores sont stimulées par des exsudats depuis 15 jours, les spores sont mises au contact des racines. Pour cela, les tamis cellulaires contenant les spores sont placés dans un pot de 150 mL contenant un fond de substrat humide (1 tamis/pot), le nylon fermant les seringues est enlevé et une seringue est placée dans un tamis (les racines sont alors directement au contact des spores). Du substrat humide est rajouté autour de la seringue et du tamis pour maintenir le tout et conserver le système humide. Les pots contenant les tamis+seringues sont remis en chambre de culture durant 5 jours (16hj/8hn, 25°Cj/22°Cn, 80 % humidité). La totalité du système racinaire de chaque seringue est récolté.

Production de GSE (Germinating Spore Exsudates)

GSE bruts pour le traitement des plantes pour le Fluidigm® : des spores de *R. irregularis* stériles sont utilisées. L'eau de stockage dans laquelle les spores sont conservées à 4°C est préalablement retirée. Pour cela le volume équivalent au nombre de spore souhaité est placé dans un tube 50 ml. Le tube est centrifugé 3 minutes à 3000 g sans frein d'arrêt et le surnageant est enlevé. Les spores sont ensuite rincées 2 fois à l'eau stérile (de l'eau stérile est rajoutée, le tube est agité, centrifugé et le surnageant enlevé). Nous avons utilisé ici 50 000 spores de *R. irregularis* mises à germer dans 100 mL de solution d'arrosage Long Ashton LowP ou HighP-Mt dans des boîtes de Petri de 14,5 cm de diamètre. Les boîtes

sont placées dans une étuve (CO₂ 2 %, 30°C à l'obscurité) pendant 1 semaine. Au moment de la récolte, un système de filtration sous vide de type Nalgène® est utilisé avec des filtres 0,45 µm en nitrocellulose (Millipore). Plusieurs échantillons d'exsudats de spores ont été produits pour une même condition (6 boîtes de 50000 spores chacune en LowP et 6 boîtes en HighP-Mt). Au moment de la récolte les GSE d'une même condition sont mis en commun et mélangés, puis sont aliquotés en tubes de 50 mL et sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

GSE pour l'étude des réponses calciques nucléaires :

- GSE de *Gigaspora rosea* : 100 spores stériles sont mises dans un Eppendorf® dans 1ml d'eau stérile. Les spores sont mises à germer (tube fermé horizontalement) dans une étuve (CO₂ 2 %, 30°C à l'obscurité) pendant 1 semaine. Ensuite le tube est centrifugé et le liquide est transféré dans un nouveau tube Eppendorf®. Cet échantillon est séché sous flux d'azote et remis en suspension dans 100 µL d'eau (concentration 10X des exsudats) puis conservé à -20°C.

- GSE de *Rhizophagus irregularis* : 125000 spores stériles (rincées 2 fois comme indiqué pour la production de GSE brut pour le Fluidigm®) sont mises à germer dans une boîte de Petri carrée (10x10cm), dans 40 ml d'eau stérile contenant du GR24 à 10⁻⁶M final (4 µL à 10⁻²M dans l'acétone apporté à t = 0 jour). La boîte est placée dans une étuve (CO₂ 2 %, 30°C à l'obscurité) pendant 1 semaine. Les spores sont ensuite récoltées grâce à un système de filtration sous vide de type Nalgène® utilisé avec des filtres 0,45 µm en nitrocellulose (Millipore). Les GSE sont ensuite extraits avec 20 ml de butanol. La phase aqueuse est récupérée et elle est concentrée à l'évaporateur rotatif puis séchée sous flux d'azote. L'échantillon sec est repris dans 100 µL d'eau (concentration 400X des exsudats) puis conservé à -20°C.

- Pour les expériences de réponses calciques nucléaire, les GSE de *G. rosea* repris dans 100 µL (10X) sont directement appliqués sur une racine (concentration en spore des GSE appliqués = 100 spores/100 µL). Les GSE de *R. irregularis* repris dans 100µL (400X) sont dilués 10 fois dans de l'eau juste avant le traitement de la racine (concentration finale en spore des GSE appliqués = 12500 spores/100 µL).

Etude des oscillations calciques nucléaires

Le matériel biologique végétal : l'ensemble du matériel végétal transformé contenant la sonde Cameleon 35S-NupYC2.1 a été développé par l'équipe de David Barker (LIPM).

- Les clones de racines en « hairy-root » exprimant la sonde 35S-NupCY2.1 (Chabaud *et al.*, 2011) sont maintenus en culture par repiquages successifs sur milieu M dans des boîtes de 14,5 cm de diamètre (24°C, obscurité, humidité 40 %). La production de racines pour les différents essais passe ensuite par un repiquage en boîte verticale (10x10 cm ou 12x12 cm) sur milieu M contenant différentes concentrations de phosphate.

- Les plantes entières transgéniques (génotype Jemalong 2HA de *M. truncatula*) exprimant la sonde 35S-NupYC2.1 sont obtenues selon le protocole de Chabaud *et al.*, 2003, faisant intervenir *Agrobacterium tumefaciens*. Une lignée exprimant bien la sonde est

sélectionnée, actuellement sont utilisées les graines de la 1^{ère} ou 2^{ème} génération. Les graines sont stérilisées et semées sur milieu M en boîte verticale 12x12 cm (16hj/8hn, 25°Cj/n, 50 % humidité).

- Les « hairy-roots » ou les plantules sont repiquées sur milieu M contenant plus ou moins de phosphate. Les conditions LowP correspondent à 7,5 μ M ou 35 μ M (le milieu M normal) et les conditions HighP correspondent à 3,5 mM ou 3,75 mM (selon que les expériences sont menées par Mireille ou moi-même).

Conditions d'inoculation ou de traitement (Chabaud *et al.*, 2011) :

- Inoculation : des spores de *Gigaspora gigantea* sont mises à germer sur milieu M LowP ou HighP en boîtes verticales dans une étuve avec 2 % de CO₂. Une fois germées (3 jours), les spores sont sélectionnées à l'emporte-pièce et placées dans les boîtes contenant les racines où un plug de milieu a été préalablement enlevé. De l'eau est appliquée sur les racines et un carré de Biofolie 25TM (Dutscher SAS, Brumath, France) stérile est déposé. Après environ 15 jours de co-culture en position verticale, les zones où le champignon a fortement ramifié aux abords des racines sont délimitées sous la loupe binoculaire pour repérer les endroits susceptibles de contenir des hyphopodes. La boîte est ouverte sous le microscope confocal, une goutte d'eau est placée sur le Biofolie et l'objectif eau 40X est utilisé pour enregistrer les oscillations calciques dans les cellules racinaires situées sous les hyphopodes. Un enregistrement de 10 minutes est réalisé.

- Traitement : une jeune racine latérale est prélevée et placée dans de l'eau sur une lame. 4 gouttes du mélange Valap (vaseline, lanoline et paraffine, 1:1:1) sont déposées sur la lame de manière à former un pont lorsque la lamelle est déposée au-dessus de la racine (ceci permet le maintien de la racine sur la lame). Au moment du traitement, l'eau entourant la racine est enlevée avec un papier absorbant et le traitement est appliqué en apportant 100 μ L de la solution de traitement entre la lame et la lamelle. Les traitements peuvent être constitués de GSE ou de CO₄ à 10⁻⁸M (dilution préparée extemporanément à partir d'une solution mère à 10⁻³M).

Réglages du microscope confocal et obtention des données : les racines sont observées avec un objectif 40x eau ou air. Les paramètres du microscope confocal utilisés sont identiques à ceux publiés par Chabaud *et al.*, 2011. Une acquisition est faite toutes les 5 secondes pendant la durée d'enregistrement. A chaque acquisition 3 images sont enregistrées : une image en fond clair, une image correspondant à la fluorescence en YFP et une à la fluorescence en CFP. Les valeurs de fluorescence en CFP et YFP sont ensuite récupérées grâce au logiciel Image-J (les régions d'intérêt sont délimitées manuellement autour des noyaux). Avec le logiciel Excel, le rapport (fluorescence YFP/fluorescence CFP) est calculé et les graphes correspondant à ce rapport sont ensuite générés.

Dynamic ArrayTM IFCs (Fluidigm)

Obtention du matériel biologique : les plantes de *M. truncatula* (2 plantes par pot, 2 pots par condition) sont cultivées 2 semaines avant traitement et/ou récolte (16hj/8hn, 22°Cj/20°Cn, humidité 70 %j/72 %n).

Les conditions « inoculées » correspondent à des pots inoculés dès la mise en pot avec 90 spores/pot de *R. irregularis* ; les racines sont récoltées après 2 semaines de culture et congelées à l'azote liquide.

Les conditions « traitements » correspondent à des plantes de 2 semaines qui sont traitées à $t = 0$ en apportant 25ml de solution sur le dessus des pots. Les traitements sont :

- « Témoin » = solution d'arrosage LowP ou HighP-Mt seule,
- « CO₄ » = solution d'arrosage LowP ou HighP-Mt contenant des CO₄ à 10⁻⁸M,
- « Myc-LCO » = solution d'arrosage LowP ou HighP-Mt contenant des Myc-LCO à 10⁻⁷M (à partir d'un mélange initial de Myc-LCO sulfaté et non sulfatés, C:16 ou C:18 à 10⁻⁴M dans 50 % acétonitrile),
- « GSE » = exsudats de spores germées en condition LowP ou HighP-Mt.

Les racines sont récoltées au temps $t = 4$ h post-traitement (hpt), $t = 12$ hpt ou $t = 24$ hpt et congelées dans l'azote liquide. 4 plantes ont été regroupées par condition et par temps de traitement, et cette expérience a été répétée trois fois de façon indépendante.

Test préalable des amorces : l'efficacité de la qPCR avec les 96 paires d'amorces a été testée sur un pool d'ADNc avant l'expérience de Fluidigm®. Les réactions de qPCR sont réalisées dans un volume final de 10 μ L contenant 4 μ L d'ADNc (plus ou moins dilué), 1 μ L des amorces (Sens et Anti-sens en mélange à 5 μ M chacune) et 5 μ L de Master Mix SYBR Green (Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Roche). Les réactions sont effectuées avec un appareil LightCycler 480® Real-time qPCR system (Roche Applied Science). Une gamme d'ADNc est réalisée en 4 dilutions, avec 2 ou 3 réplicats techniques par dilution. L'efficacité de la PCR est estimée à partir de la pente de la droite de régression de la courbe CT = f(log10(concentration ADNc)) : Efficacité = $10^{(-1/\text{pente})}$. Si la réaction est efficace à 100 %, à chaque cycle de PCR un doublement de la quantité d'ADNc est attendu, donc une efficacité de réaction de 100 % est égale à 2.

Préparation des amorces : une plaque 96 puits contenant les amorces est préparée pour le Fluidigm®, chaque puits correspond à une paire d'amorces et contient 2 μ L de chaque amorce (Sens et Antisens) à 100 μ M et 6 μ L de TE 1X (Volume final = 10 μ L/puits). Un mélange des différentes amorces est réalisé avec 2 μ L pris dans chacun des puits et 104 μ L de TE 1X, ce mélange servira à une étape de préamplification.

Préparation des échantillons d'ADNc : les systèmes racinaires entiers sont broyés à l'azote liquide dans un mortier. Un aliquote de 100 mg de chaque échantillon est utilisé pour l'extraction d'ARN, le reste de la poudre est conservé à -80°C. L'extraction des ARN est réalisée avec le kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) en suivant le protocole recommandé par le fabricant. L'ARN extrait est dosé au Nano Drop® ND-1000, et la qualité des ARN est estimée à l'aide d'une puce Agilent RNA 6000 NANO série II (selon le protocole du fournisseur). Les ARN sont ensuite traités avec une DNase (kit Ambion® TURBO DNA-free) : 5 μ g d'ARN sont traités dans un volume final de 50 μ L (protocole du fournisseur). La reverse transcription (RT) est réalisée sur 1 μ g d'ARN/échantillon (soit 10 μ L du produit de traitement DNase) dans un volume final de 20 μ L en plaque 96 puits avec le kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™, protocole du fournisseur). Une PCR est réalisée sur le produit de la RT pour

vérifier que la RT a fonctionné. Les échantillons d'ADNc sont transférés dans une nouvelle plaque 96 puits et sont dilués à une concentration d'environ 60 ng/μL. Un tube contenant un mélange de 1 μL de chacun des ADNc est réalisé pour faire une gamme de dilution en 4 points sur la plaque Fluidigm®.

Les 2 plaques (ADNc et amorces) sont ensuite prises en charge pour la réalisation de la puce au niveau de la plateforme Génotoul. Les échantillons d'ADNc (plaque 96 et tube mélange) sont pré-amplifiés en utilisant le mélange des 96 paires d'amorces avec le kit TaqMan® PreAmp Master Mix. De même, une gamme de dilutions des ADNc est préparée à partir du mélange d'ADNc préamplifié pour mesurer l'efficacité des amorces durant le Fluidigm. La puce utilisée est une 96.96 Dynamic Genotyping (Fluidigm, BMK-M-96.96GT).

Analyse des données : les valeurs de Ct sont obtenues avec le logiciel Fluidigm Real-Time PCR Analysis. Les efficacités des réactions qPCR évaluées avec la gamme réalisée avec le Fluidigm n'étant pas bonnes, l'efficacité des réactions pour chaque paire d'amorces est déterminée via le logiciel LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003) (on calcule l'efficacité moyenne pour une paire d'amorces donnée sur l'ensemble des réactions faisant intervenir cette paire d'amorces). Les efficacités déterminées avec LinReg oscillent entre 1,42 à 1,86 avec une moyenne égale à 1,72. Ensuite, la valeur X est calculée en prenant en compte l'efficacité réelle pour chaque paire d'amorce (au lieu de prendre une efficacité de 2 pour tous) : $X = (\text{Efficacité des amorces})^{Ct}$. Puis on calcule l'expression de notre gène d'intérêt par rapport à l'expression de gènes de référence dont l'expression est supposée constitutive : $\text{EXPRESSION} = (\text{moyenne géométrique des valeurs X relatives aux gènes de référence}) / (\text{la valeur X relative au gène d'intérêt})$. Pour comparer l'expression d'un gène selon les conditions, un rapport peut être alors calculé entre l'expression du gène dans une condition donnée par rapport à une condition témoin (une transformation des données en Log(2) est réalisée pour une meilleure visualisation des données). Une moyenne de ces ratios est ensuite calculée pour les 3 répétitions biologiques (après la transformation Log(2)), et l'erreur-type (SEM) est déterminée.

Analyses statistiques des données

Les résultats sont analysés grâce au logiciel Statgraphics Centurion (Sigma Plus). Les tests utilisés sont précisés dans les légendes des figures. Le plus souvent, les données satisfont les critères de normalité et d'homoscédasticité et sont analysées par un test de Student (si deux séries de données à comparer) ou une ANOVA à un facteur suivie du test HSD de Tukey (si plus de deux séries de données à comparer).

Les données présentées en Figures 23-B, 20-C (données teneurs en Pi dans les racines) et 22 ont subi une transformation logarithmique, cosinus et arc sine respectivement avant analyse (de façon à avoir des données suivant une distribution normale pour pouvoir réaliser l'ANOVA).

Les données en Figure 18-B ont été analysées avec le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, car ces données ne présentaient pas une distribution normale).

BIBLIOGRAPHIE

- Abdolzadeh A, Wang X, Veneklaas EJ, Lambers H. 2010.** Effects of phosphorus supply on growth, phosphate concentration and cluster-root formation in three *Lupinus* species. *Annals of botany* 105: 365–74.
- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun E A, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM, et al. 2011.** Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 20242–7.
- Akiyama K, Matsuoka H, Hayashi H. 2002.** Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 15: 334–40.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–7.
- Al-Karaki GN. 2000.** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10: 51–54.
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S. 2012.** The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* 335: 1348–51.
- Ames BN. 1966.** Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in enzymology* 8: 115–118.
- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GED, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Dénarié J, Gough C. 2003.** The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal* 34: 495–506.
- Ané J-M, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa R Varma, Oldroyd GED, Ayax C, Lévy J, Debellé F, Baek J-M, Kalo P, et al. 2004.** *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364–7.
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J. 2007.** DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant Journal* 51: 1019–29.
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyojuka J. 2009.** D14, a Strigolactone-Insensitive Mutant of Rice, Shows an Accelerated Outgrowth of Tillers. *Plant & cell physiology* 50: 1416–24.
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano J M. 2007.** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *The New phytologist* 173: 808–16.
- Arrighi J-F, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E-P, Ghérardi M, Huguet T, et al. 2006.** The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant physiology* 142: 265–79.

- Arriola L, Niemira BA, Safir G R. 1997.** Border cells and arbuscular mycorrhizae in four amaranthaceae species. *Phytopathology* 87: 1240–2.
- Atul-Nayyar A, Hamel C, Hanson K, Germida J. 2009.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza* 19: 239–46.
- Aung K, Lin S, Wu C, Huang Y, Su C, Chiou T. 2006.** *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant physiology* 141: 1000–11.
- Awad AA, Sato D, Kusumoto D, Kamioka H, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2006.** Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants *Striga* and *Orobanch*e, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regulation* 48: 221–227.
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM. 2009.** Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current opinion in biotechnology* 20: 642–50.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Update on Symbiosis Arbuscular Mycorrhizas. *Plant physiology* 124: 949–957.
- Balergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF. 2011.** The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of experimental botany* 62: 1049–60.
- Bari R, Pant BD, Stitt M, Scheible W-R. 2006.** *PHO2*, *MicroRNA399*, and *PHR1* Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants. *Plant Physiology* 141: 988–999.
- Barker D G, Bianchi S, Blondon F, Duc G, Essad S, Flament P, Génier G, Guy P, Muel X, Dénarié J, *et al.* 1990.** *Medicago truncatula*, a Model Plant for Studying the Molecular Genetics of the Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* 8: 40–49.
- Bastmeyer M, Deising HB, Bechinger C. 2002.** Force exertion in fungal infection. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 31: 321–41.
- Bates TR, Lynch JP. 2000.** The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. *American Journal of Botany* 87: 964–970.
- Bécard G, Fortin JA. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211–218.
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Roux C. 2004.** Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany* 82: 1186–1197.
- Bécard G, Piché Y. 1989.** Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Applied and environmental microbiology* 55: 2320–5.
- Bécard G, Piché Y. 1990.** Physiological factors determining vesicular–arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. *Canadian Journal of Botany* 68: 1260–1264.
- Bécard G, Roux C, Séjalon-Delmas N, Puech-Pagès V, Roy S. 2005.** Modulators of the development of mycorrhizal fungi with arbuscules, and uses thereof. : WO Patent 2005/077177 A2.

- Bécard G, Taylor LP, Douds DDJ, Pfeffer PE, Doner LW. 1995.** Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 8: 252–258.
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschig C, Leyser O. 2006.** The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current biology* : CB 16: 553–63.
- Bensmihen S, de Billy F, Gough C. 2011.** Contribution of NFP LysM domains to the recognition of Nod factors during the *Medicago truncatula*/Sinorhizobium meliloti symbiosis. *PloS one* 6: e26114.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*: 1–9.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006.** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS biology* 4: e226.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2008.** GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant physiology* 148: 402–13.
- Beveridge CA. 2006.** Axillary bud outgrowth: sending a message. *Current opinion in plant biology* 9: 35–40.
- Bonanomi A, Oetiker JH, Guggenheim R, Boller T, Wiemken A, Vogeli-Lange R. 2001.** Arbuscular mycorrhiza in mini-mycorrhizotrons: first contact of *Medicago truncatula* roots with *Glomus intraradices* induces chalcone synthase. *New Phytologist* 150: 573–582.
- Bonfante P, Genre A, Faccio A, Martini I, Schauser L, Stougaard J, Webb J, Parniske M. 2000.** The *Lotus japonicus* LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 13: 1109–20.
- Bonfante P, Genre A. 2008.** Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in plant science* 13: 492–8.
- Bonfante P, Genre A. 2010.** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*, 1(4), 48.
- Bonfante P, Requena N. 2011.** Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology* 14: 451–7.
- Bonser AM, Lynch J, Snapp S. 1996.** Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. *The New phytologist* 132: 281–8.
- Booker J, Auldrige M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O. 2004.** MAX3/CCD7 Is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a Novel Plant Signaling Molecule. *Current biology* : CB 14: 1232–1238.
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O. 2005.** MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental cell* 8: 443–9.

- Bouvier F, Isner J-C, Dogbo O, Camara B. 2005.** Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends in plant science* 10: 187–94.
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH. 2003.** Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 358–364.
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G. 2007.** Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in plant science* 12: 224–30.
- Bradbury SM, Peterson RL, Bowley SR. 1991.** Interactions between three alfalfa nodulation genotypes and two *Glomus* species. *new p* 119: 115–120.
- Branscheid A, Sieh D, Pant BD, May P, Devers EA, Elkrog A, Schauser Leif, Scheible W-R, Krajinski F. 2010.** Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 23: 915–26.
- Braunberger PG, Miller MH, Peterson RL. 1991.** Effect of phosphorus nutrition on morphological characteristics of vesicular arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytologist* 119: 107–113.
- Brechenmacher L, Weidmann S, van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Franken P, Gianinazzi-Pearson V. 2004.** Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* 14: 253–62.
- Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druege U, Hause B, Bucher M, Kretschmar T, Bossolini E, *et al.* 2010.** Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal* 64: 1002–17.
- Breuninger M, Requena N. 2004.** Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal genetics and biology* 41: 794–804.
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA. 2009.** Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant physiology* 150: 482–93.
- Broghammer A, Krusell L, Blaise M, Sauer J, Sullivan J, Maolanon N, Vinther M, Lorentzen A, Madsen E, Jensen K, Roepstorff P, Thirup S, Ronson C, Thygesen M, Stougaard, J. 2012.** Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 13859–64.
- Bucher M. 2007.** Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *The New phytologist* 173: 11–26.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 13: 693–8.
- Burleigh SH, Harrison MJ. 1997.** A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. *Plant molecular biology* 34: 199–208.

- Burleigh SH, Harrison MJ. 1999.** The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant physiology* 119: 241–8.
- Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J. 2010.** A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS genetics* 6.
- Campos-Soriano L, García-Martínez J, Segundo BS. 2011.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular Plant Pathology* 13: 579–592.
- Camut S, Camps C, Timmers A, Maillet F, Driguez H, Fort S, Cullimore J, Gough C, Hervé C. 2012.** MtPUB1, an E3 Ubiquitin ligase involved in the negative regulation of nodulation also plays a role in mycorrhization. 1st Molecular Mycorrhizal Meeting, Poster session, September 2012, Munich.
- Catford J-G, Staehelin C, Lerat S, Piché Y, Vierheilig H. 2003.** Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *Journal of experimental botany* 54: 1481–7.
- Catford JG, Staehelin C, Larose G, Piché Y, Vierheilig H. 2006.** Systemically suppressed isoflavonoids and their stimulating effects on nodulation and mycorrhization in alfalfa split-root systems. *Plant Soil* 285: 257–266.
- Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa R V, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J. 2000.** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *The Plant cell* 12: 1647–66.
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG. 2003.** Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant cell reports* 22: 46–51.
- Chabaud M, Genre A, Sieberer BJ, Faccio A, Fournier J, Novero M, Barker DG, Bonfante P. 2011.** Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *The New phytologist* 189: 347–55.
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petras A, Bécard G, Barker DG. 2002.** Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 156: 265–273.
- Chabot S, Bécard G, Piché Y. 1992.** Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315–321.
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, et al. 2010.** Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468: 527–32.
- Cheng Y, Ma W, Li X, Miao W, Zheng L, Cheng B. 2012.** Polyamines stimulate hyphal branching and infection in the early stage of *Glomus etunicatum* colonization. *World journal of microbiology & biotechnology* 28: 1615–21.
- Cook C, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH. 1966.** Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154: 1189–1190.

- Cooper JE. 2007.** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of applied microbiology* 103: 1355–65.
- Cordell D, Rosemarin A, Schröder JJ, Smit AL. 2011.** Towards global phosphorus security: a systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere* 84: 747–58.
- Cordell D, Drangert J-O, White S. 2009.** The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19: 292–305.
- Corradi N, Bonfante P. 2012.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. *PLoS pathogens* 8: e1002600.
- Croll Daniel, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, Sanders IR. 2009.** Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New phytologist* 181: 924–37.
- Czaja LF, Hoge Kamp C, Lamm P, Maillet F, Andres ME, Samain E, Dénarié J, Küster H, Hohnjec N. 2012.** Transcriptional responses towards diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by AM fungal LCOs. *Plant physiology* 49.
- Danova-Alt R, Dijkema C, De Waard P, Köck M. 2008.** Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells-kinetic and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. *Plant, cell & environment* 31: 1510–21.
- David-Schwartz R, Gadkar V, Wininger S, Bendov R, Galili G, Levy AA, Kapulnik Y. 2003.** Isolation of a premycorrhizal infection (pmi2) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 16: 382–8.
- David-Schwartz R, Badani H, Smadar W, Levy AA, Galili G, Kapulnik Y. 2001.** Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization : plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae. *The Plant Journal* 27: 561–569.
- Deguchi Y, Banba M, Shimoda Y, Chechetka SA, Suzuri R, Okusako Y, Ooki Y, Toyokura K, Suzuki A, et al. 2007.** Transcriptome profiling of *Lotus japonicus* roots during arbuscular mycorrhiza development and comparison with that of nodulation. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 14: 117–33.
- Delaux P-M, Xie X, Timme RE, Puech-Pages V, Dunand C, Lecompte E, Delwiche CF, Yoneyama K, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2012.** Origin of strigolactones in the green lineage. *The New phytologist* 450.
- Delhaize E, Randall PJ. 1995.** Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* 107: 207–213.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. 2005.** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441–5.
- Dixon RA, Pasinetti GM. 2010.** Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant physiology* 154: 453–7.
- Doerner P. 2008.** Phosphate starvation signaling: a threesome controls systemic P(i) homeostasis. *Current opinion in plant biology* 11: 536–40.

- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012.** Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in plant science* 17: 413–22.
- Domagalska MA, Leyser O. 2011.** Signal integration in the control of shoot branching. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12: 211–21.
- Douds DDJ, Galvez L, Bécard G, Kapulnik Y. 1998.** Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytologist* 138: 27–35.
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003.** Update on Phylogeny The Rest of the Iceberg . *Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. Plant Physiology*, 131(March), 900–910.
- Drissner D, Kunze G, Callewaert N, Gehrig P, Tamasloukht M, Boller T, Felix G, Amrhein N, Bucher M. 2007.** Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* 318: 265–8.
- Drummond RSM, Martínez-Sánchez NM, Janssen BJ, Templeton KR, Simons JL, Quinn BD, Karunairetnam S, Snowden KC. 2009.** *Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE7 is involved in the production of negative and positive branching signals in petunia. *Plant physiology* 151: 1867–77.
- Duc G, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 1989.** First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc⁻) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Science*: 215–222 (Volume: 60, Issue: 5).
- Dun EA, Hanan J, Beveridge CA. 2009.** Computational modeling and molecular physiology experiments reveal new insights into shoot branching in pea. *The Plant cell* 21: 3459–72.
- Dénarié J, Debellé F. 1996.** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry* 65: 503–35.
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR. 1996.** Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* 85: 673–81.
- El Ghachtouli N, Paynot M, Morandi D, Martin-Tanguy J, Gianinazzi S. 1995.** The effect of polyamines on endomycorrhizal infection of wild-type *Pisum sativum*, cv. Frisson (nod⁺ myc⁻) and two mutants (nod⁻ myc⁺ and nod⁻ myc⁻). *Mycorrhiza* 5: 189–192.
- Elias KS, Safir Gene R. 1987.** Hyphal Elongation of *Glomus fasciculatus* in Response to Root Exudates. *Applied and environmental microbiology* 53: 1928–33.
- Ellis THN, Poyser SJ. 2002.** An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist* 153: 17–25.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB. 2002.** A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962–966.
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R. 2004.** Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytologist* 161: 387–392.
- Ezawa T, Smith SE, Smith FA. 2002.** Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 149: 555–563.

- FAO. 2004.** The Use of Phosphate Rocks for Sustainable Agriculture (F Zapata and RN Roy, Eds.).
- Feddermann N, Muni RRD, Zeier T, Stuurman J, Ercolin F, Schorderet M, Reinhardt D. 2010.** The PAM1 gene of petunia, required for intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi, encodes a homologue of VAPYRIN. *The Plant Journal* 64: 470–81.
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H. 2012.** Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 2666–71.
- Ferguson BJ, Beveridge CA. 2009.** Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant physiology* 149: 1929–44.
- Formey D, Jourda C, Roux C, Delaux P. 2012.** What the Genomics of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Teaches Us about Root Development. In: Crespi M, ed. *Root Genomics and Soil Interactions*. 171–189.
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Park SW, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, *et al.* 2005.** Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 1773–8.
- Franco-Zorrilla JM, González E, Bustos R, Linhares F, Leyva A, Paz-Ares J. 2004.** The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *Journal of experimental botany* 55: 285–93.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J. 2007.** Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics* 39: 1033–7.
- Gamalero E, Trotta A, Massa N, Copetta A, Martinotti MG, Berta G. 2004.** Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14: 185–92.
- Gamuyao R, Chin JH, Pariasca-Tanaka J, Pesaresi P, Catausan S, Dalid C, Slamet-Loedin I, Tecson-Mendoza EM, Wissuwa M, Heuer S. 2012.** The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* 488: 535–539.
- Garriock ML, Peterson RL, Ackerley AC. 1989.** Early stages in colonization of *Allium porrum* (leek) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*. *New Phytologist* 112: 85–92.
- Gaude N, Bortfeld S, Duensing N, Lohse M, Krajinski F. 2012.** Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal* 69: 510–28.
- Geil R, Peterson L, Guinel F. 2001.** Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza* 11: 137–143.

- Geil RD, Guinel FC. 2002.** Effects of elevated substrate – ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Canadian Journal of Botany* 80: 114–119.
- Geneva MP, Stancheva IV, Boychinova MM, Mincheva NH, Yonova PA. 2010.** Effects of foliar fertilization and arbuscular mycorrhizal colonization on *Salvia officinalis* L. growth, antioxidant capacity, and essential oil composition. *Journal of the science of food and agriculture* 90: 696–702.
- Genre A, Bonfante P. 2007.** Check-in procedures for plant cell entry by biotrophic microbes. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 20: 1023–30.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P. 2008.** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant cell* 20: 1407–20.
- Genre A, Chabaud M, Timmers ACJ, Bonfante P, Barker DG. 2005.** Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *The Plant Cell* 17: 3489–3499.
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Péret B, Laplaze L, Franche C, Parniske M, Bogusz D. 2008.** SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4928–4932.
- Gianinazzi-Pearson V, Arnould C, Oufattole M, Arango M, Gianinazzi S. 2000.** Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 211: 609–13.
- Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Tahiri-Alaoui A, Gianinazzi S. 1996.** Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133: 45–57.
- Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA. 1991.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytologist* 117: 61–74.
- Gilbert N. 2009.** THE DISAPPEARING NUTRIENT. *Nature* 461: 716–718.
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citernesi AS. 1993a.** Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytologist* 123: 115–122.
- Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS. 1999.** Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology* 65: 5571–5.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980.** An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489–500.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi C. 1993b.** Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre infection stages. *New Phytologist* 125: 587–593.

- Giovannetti M, Sbrana C, Citernesi AS, Avio L. 1996.** Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133: 65–71.
- Giovannetti M, Sbrana C, Logi C. 1994.** Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 127: 703–709.
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ. 2009.** *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC plant biology* 9: 10.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun E a, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, et al. 2008.** Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189–94.
- Gough C, Cullimore J. 2011.** Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 24(8), 867–78.
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Yair. 2005.** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819–23.
- Graham JH. 1982.** Effect of Citrus Root Exudates on Germination of Chlamydo spores of the Vesicular- Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus epigaeum*. *Mycologia* 74: 831–835.
- Groth M, Takeda N, Perry J, Uchida H, Dräxl S, Brachmann A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M, Wang TL, et al. 2010.** NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *The Plant cell* 22: 2509–26.
- Gruber V, Blanchet S, Diet A, Zahaf O, Boualem A, Kakar K, Alunni B, Udvardi M, Frugier F, Crespi M. 2009.** Identification of transcription factors involved in root apex responses to salt stress in *Medicago truncatula*. *Molecular genetics and genomics : MGG* 281: 55–66.
- Grunwald U, Guo W, Fischer K, Isayenkov S, Ludwig-Müller J, Hause B, Yan X, Küster H, Franken P. 2009.** Overlapping expression patterns and differential transcript levels of phosphate transporter genes in arbuscular mycorrhizal, Pi-fertilised and phytohormone-treated *Medicago truncatula* roots. *Planta* 229: 1023–34.
- Gu M, Xu K, Chen A, Zhu Y, Tang G, Xu G. 2010.** Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia plantarum* 138: 226–37.
- Guenoun D, Galili S, Phillips DA, Volpin H, Chet I, Okon Y, Kapulnik Y. 2001.** The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*. *Plant science* 160: 925–932.
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, He J, Udvardi MK, Bonfante P. 2009a.** Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *The New phytologist* 182: 200–12.

- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P. 2009b.** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant physiology* 150: 73–83.
- Gutjahr C, Casieri L, Paszkowski U. 2009.** *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *The New phytologist* 182: 829–37.
- Gutjahr C, Radovanovic D, Geoffroy J, Zhang Q, Siegler H, Chiapello M, Casieri L, An K, An G, Guiderdoni E, et al. 2012.** The half-size ABC transporters STR1 and 2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *The Plant Journal* 69: 906–920.
- Güimil S, Chang H-S, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, Ioannidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P, et al. 2005.** Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8066–70.
- Hamburger D, Rezzonico E, Petétot JM-C, Somerville C, Poirier Y. 2002.** Identification and Characterization of the Arabidopsis PHO1 Gene Involved in Phosphate Loading to the Xylem. *the Plant Cell* 14: 889–902.
- Hamiaux C, Drummond RS, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD, Snowden KC. 2012.** DAD2 Is an α/β Hydrolase likely to Be Involved in the Perception of the Plant Branching Hormone, Strigolactone. *Current Biology* 22: 1–5.
- Hammer EC, Pallon J, Wallander H, Olsson PA. 2011.** Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. *FEMS microbiology ecology* 76: 236–44.
- Hammond JP, White PJ. 2008.** Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of experimental botany* 59: 93–109.
- Harrison MJ, van Buuren ML. 1995.** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626–9.
- Harrison MJ. 1996.** A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* 9: 491–503.
- Harrison MJ. 2005.** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual review of microbiology* 59: 19–42.
- Harrison MJ, Dewbre Gary R, Liu J. 2002.** A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant cell* 14: 2413–2429.
- Harrison MJ, Dixon RA. 1993.** Isoflavonoid Accumulation and Expression of Defense Gene Transcripts During the Establishment of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Associations in Roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 643.
- Hassan S, Mathesius U. 2012.** The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of experimental botany* 63: 3429–44.

- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N. 2011.** A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant cell* 23: 3812–23.
- Hernández-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sánchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, Berrocal-Lobo M, Keller H, Barlet X, Sánchez-Rodríguez C, et al. 2007.** Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *The Plant cell* 19: 890–903.
- Hewitt EJ. 1966.** Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. In: Commonwealth Agricultural Bureau, ed. *Experimental Agriculture*. London, 104.
- Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H. 2002.** Towards Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Independent of a Plant Host Towards Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Independent of a Plant Host. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 68.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. 2007.** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139–46.
- Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GED. 2009.** GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant cell* 21: 545–57.
- Hoch HC, Staples RC, Whitehead B, Comeau J, Wolf ED. 1987.** Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *uroomyces*. *Science* 235: 1659–62.
- Hoher V, Alloisio N, Auguy F, Fournier P, Doumas P, Pujic P, Gherbi H, Queiroux C, Da Silva C, Wincker P, Normand P, Bogusz D. 2011.** Transcriptomics of Actinorhizal Symbioses Reveals Homologs of the Whole Common Symbiotic Signaling Cascade. *Plant Physiology* 156: 700–711
- Hogekamp C, Arndt D, Pereira PA, Becker JD, Hohnjec N, Küster H. 2011.** Laser-microdissection unravels cell-type specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box TF gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiology* 157: 2023–2043.
- Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H. 2005.** Overlaps in the Transcriptional Profiles of *Medicago truncatula* Roots Inoculated with Two Different *Glomus* Fungi Provide Insights into the Genetic Program Activated during Arbuscular Mycorrhiza. *Plant physiology* 137: 1283–1301.
- Hsieh L-C, Lin S-I, Shih AC-C, Chen J-W, Lin W-Y, Tseng C-Y, Li W-H, Chiou T-J. 2009.** Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant physiology* 151: 2120–32.
- Hu Z, Yan H, Yang J, Yamaguchi S, Maekawa M, Takamure I, Tsutsumi N, Kyojuka J, Nakazono M. 2010.** Strigolactones negatively regulate mesocotyl elongation in rice during germination and growth in darkness. *Plant & cell physiology* 51: 1136–42.
- Humphreys CP, Franks PJ, Rees M, Bidartondo MI, Leake JR, Beerling DJ. 2010.** Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature communications* 1: 103.

- Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M, Perry J, Miwa H, Umehara Y, Kouchi H, Murakami Y, Mulder L, Vickers K, et al. 2005.** Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433: 527–31.
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyojuka J. 2005.** Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant & cell physiology* 46: 79–86.
- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD. 1992.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.. 2. Hyphal transport of ³²P over defined distances. *New Phytologist* 120: 509–516.
- Javot H, Penmetsa R Varma, Breuillin F, Bhattarai KK, Noar RD, Gomez SK, Zhang Q, Cook DR, Harrison MJ. 2011.** *Medicago truncatula* mtpt4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* 68: 954–965.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ. 2007a.** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1720–5.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007b.** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, cell & environment* 30: 310–22.
- Johnson AW, Gowada G, Hassanali A, Knox J, Monaco S, Razavi Z, Rosebery G. 1981.** The preparation of synthetic analogues of strigol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 1734–1743.
- Johnson X, Brich T, Dun EA, Goussot M, Haurigné K, Beveridge CA, Rameau C. 2006.** Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant physiology* 142: 1014–26.
- Journet E-P, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, Arnould C, Morandi D, Barker DG, Gianinazzi-Pearson V. 2001.** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 14: 737–48.
- Kakar K, Wandrey M, Czechowski T, Gaertner T, Scheible W-R, Stitt M, Torres-Jerez I, Xiao Y, Redman JC, Wu HC, et al. 2008.** A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*. *Plant methods* 4: 18.
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006.** Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11086–91.
- Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh JF, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long Sharon R, Rogers J, et al. 2005.** Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308: 1786–9.
- Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, et al. 2006.** A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal

symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 359–64.

Kapulnik Y, Delaux P-M, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Wininger S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Combier J-P, Bécard G, Belausov E, *et al.* 2011. Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* 233: 209–16.

Kepinski S, Leyser O. 2005. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446–51.

Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, *et al.* 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880–2.

Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Webb KJ, *et al.* 2005. Seven *Lotus japonicus* Genes Required for Transcriptional Reprogramming of the Root during Fungal and Bacterial Symbiosis. *The Plant cell* 17: 2217–2229.

Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A Secreted Fungal Effector of *Glomus intraradices* Promotes Symbiotic Biotrophy. *Current biology : CB* 21: 1–6.

Ko SK, Chen X, Yoon J, Shin I. 2011. Zebrafish as a good vertebrate model for molecular imaging using fluorescent probes. *Chemical Society reviews*, 40(5), 2120–30.

Kohlen W, Charnikhova T, Lammers M, Pollina T, Toh P, Haider I, Pozo MJ, de Maagd RA, Ruyter-spira C, Bouwmeester HJ, *et al.* 2012. The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling , plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist* 8.

Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, Ruyter-Spira C. 2011. Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant physiology* 155: 974–87.

Koltai H. 2011. Strigolactones are regulators of root development. *New Phytologist* 190: 545–549.

Koltai H, Cohen M, Chesin O, Mayzlish-Gati E, Bécard G, Puech V, Ben Dor B, Resnick N, Wininger S, Kapulnik Y. 2011. Light is a positive regulator of strigolactone levels in tomato roots. *Journal of plant physiology* 168: 1993–6.

Koltai H, Dor E, Hershenhorn J, Joel DM, Weininger S, Lekalla S, Shealtiel H, Bhattacharya C, Eliahu E, Resnick N, *et al.* 2010. Strigolactones' Effect on Root Growth and Root-Hair Elongation May Be Mediated by Auxin-Efflux Carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 129–136.

Kosuta S, Chabaud M, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Bécard G. 2003. A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific MtENOD11 Expression in Roots of *Medicago truncatula* 1. *Plant physiology* 131: 952–962.

Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED. 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 9823–8.

- Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M. 2010.** How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant & cell physiology* 51: 1381–97.
- Krajinski F, Hause B, Gianinazzi-Pearson V, Franken P. 2002.** MthA 1, a Plasma Membrane H⁺-ATPase Gene from *Medicago truncatula*, Shows Arbuscule-Specific Induced Expression in Mycorrhizal Tissue. *Plant Biology* 4: 754–761.
- Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E. 2012.** A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483: 341–4.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüssler A. 2012.** Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *The New phytologist* 193: 970–84.
- Kuhn H, Küster H, Requena N. 2010.** Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 185: 716–33.
- Kumar D, Klessig DF. 2003.** High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 16101–6.
- Labidi S, Ben Jeddi F, Tisserant B, Debiante D, Rezgui S, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2012.** Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO₃ stress. *Mycorrhiza* 22: 337–45.
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ. 2006.** Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Annals of botany*. 98: 693–713.
- Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE. 2008.** Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends Ecol Evol* 23(2):95–103.
- Laparra J, Balergue C, Rochange S, Ludwiczak P, Letisse F, Portais JC, Bécard G, Puech-Pagès V. 2011.** Metabolite profiling of pea roots in response to phosphate availability. *Plant signaling & behavior*: 1–3.
- Lauresergues D, Delaux P-M, Formey D, Lelandais-Brière C, Fort S, Cottaz S, Bécard G, Niebel A, Roux C, Combier J-P. 2012.** The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*.
- Liao J, Singh S, Hossain MS, Andersen SU, Ross L, Bonetta D, Zhou Y, Sato S, Tabata S, Stougaard J, et al. 2012.** Negative regulation of CCaMK is essential for symbiotic infection. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*.
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R. 2003.** LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630–3.
- Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, et al. 2009.** DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant cell* 21: 1512–25.

- Linderman RG. 1988.** Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366–371.
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser HMO. 2002.** Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 29: 751–60.
- Liu C, Muchhal US, Raghothama K G. 1997.** Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant molecular biology* 33: 867–74.
- Liu H, Trieu AT, Blaylock LA, Harrison MJ. 1998.** Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 11: 14–22.
- Liu J, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, Vandenbosch KA, Harrison MJ. 2003.** Transcript Profiling Coupled with Spatial Expression Analyses Reveals Genes Involved in Distinct Developmental Stages of an Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant cell* 15: 2106–2123.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. 2007.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529–44.
- Liu J, Versaw WK, Pumpkin N, Gomez SK, Blaylock LA, Harrison MJ. 2008a.** Closely related members of the *Medicago truncatula* PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *The Journal of biological chemistry* 283: 24673–81.
- Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, *et al.* 2011a.** Strigolactone Biosynthesis in *Medicago truncatula* and Rice Requires the Symbiotic GRAS-Type Transcription Factors NSP1 and NSP2. *the Plant Cell Online* 23: 3853–3865.
- Liu W, Zhou X, Li Guotian, Li L, Kong L, Wang C, Zhang H, Xu J-R. 2011b.** Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. *PLoS pathogens* 7: e1001261.
- Liu Yi, Villalba G, Ayres RU, Schroder H. 2008b.** Global Phosphorus Flows and Environmental Impacts from a Consumption Perspective. 12: 229–247.
- Lloyd JC, Zakhleniuk OV. 2004.** Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant, *pho3*. *Journal of experimental botany* 55: 1221–30.
- Lopez-Meyer M, Harrison MJ. 2005.** An experimental system to synchronize the early events of development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. In *Biology of Molecular Plant-Microbe Interactions* (volume 5).546–551.
- Lundmark M, Kørner CJ, Nielsen TH. 2010.** Global analysis of microRNA in *Arabidopsis* in response to phosphate starvation as studied by locked nucleic acid-based microarrays. *Physiologia plantarum* 140: 57–68.

- Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet E-P, Ané J-M, Lauber E, Bisseling T, et al. 2004.** A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361–4.
- López-Ráez JA, Charnikhova T, Fernández I, Bouwmeester H, Pozo MJ. 2011.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of plant physiology* 168: 294–7.
- López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen Wouter, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulder P, et al. 2008.** Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *The New phytologist* 178: 863–74.
- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch J P. 2001.** Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 24: 459–467.
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, et al. 2003.** A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637–40.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, et al. 2011.** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58–63.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ. 2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 14: 1140–8.
- Manthey K, Krajinski F, Hohnjec N, Firnhaber C, Pühler A, Perlick AM, Küster H. 2004.** Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 17: 1063–77.
- Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long Sharon R, Schultze M, Ratet P, Oldroyd GED. 2007.** *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant physiology* 144: 324–35.
- Marsh JF, Schultze M. 2001.** Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist* 150: 525–532.
- Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, Lammers PJ, Requena N, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Shapiro H, Tuskan GA, Young JPW. 2008.** The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180: 747–750.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH, Bouwmeester HJ. 2005.** The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway. *Plant physiology* 139: 920–934.
- Mayzlish Gati E, De Cuyper C, Goormachtig S, Beeckman T, Vuylsteke M, Brewer P, Beveridge C, Yermiyahu U, Kaplan Y, Enzer Y, et al. 2012.** Strigolactones Are Involved in Root Response to Low Phosphate Conditions in *Arabidopsis*. *Plant physiology*.

- Mayzlish-Gati E, LekKala SP, Resnick N, Wininger S, Bhattacharya C, Lemcoff JH, Kapulnik Y, Koltai H. 2010.** Strigolactones are positive regulators of light-harvesting genes in tomato. *Journal of experimental botany* 61: 3129–36.
- Mbengue M, Camut S, de Carvalho-Niebel F, Deslandes L, Froidure S, Klaus-Heisen D, Moreau S, Rivas S, Timmers ACJ, Hervé C, et al. 2010.** The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase PUB1 interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation. *The Plant cell* 22: 3474–88.
- Menge JA, Steirle D, Bagyaraj DJ, Johnson ELV, Leonard RT. 1978.** Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist* 80: 575–578.
- Messinese E, Mun J-H, Yeun LH, Jayaraman D, Rougé P, Barre A, Loughon G, Schornack S, Bono J-J, Cook DR, et al. 2007.** A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 20: 912–21.
- Mikkelsen BL, Rosendahl S, Jakobsen I. 2008.** Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi. *The New phytologist* 180: 890–8.
- De Miranda JCC, Harris PJ, Wild A. 1989.** Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. *New Phytologist* 112: 405–410.
- Miransari M. 2011.** Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake. *Archives of microbiology* 193: 77–81.
- Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GED, Long SR. 2004.** A Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4701–5.
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama Kashchandra G, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, et al. 2005.** The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 7760–5.
- Miwa H, Sun J, Oldroyd GED, Downie JA. 2006.** Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 19: 914–23.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N. 2007.** CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19613–8.
- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien R Y. 1999.** Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 2135–40.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim Roger, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien Roger Y. 1997.** Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882–7.

- Moreau S, Verdenaud M, Ott T, Letort S, de Billy F, Niebel A, Gouzy J, de Carvalho-Niebel F, Gamas P. 2011.** Transcription reprogramming during root nodule development in *Medicago truncatula*. *PloS one* 6: e16463.
- Morris SE, Turnbull CG, Murfet IC, Beveridge CA. 2001.** Mutational analysis of branching in pea. Evidence that Rms1 and Rms5 regulate the same novel signal. *Plant physiology* 126: 1205–13.
- Mosse B. 1973.** Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 72: 127–136.
- Mouchel CF, Leyser O. 2007.** Novel phytohormones involved in long-range signaling. *Current opinion in plant biology* 10: 473–6.
- Mouille G, Robin S, Lecomte M, Pagant S, Höfte H. 2003.** Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *The Plant Journal* 35: 393–404.
- Mukherjee A, Ané J-M. 2011.** Germinating spore exudates from arbuscular mycorrhizal fungi: molecular and developmental responses in plants and their regulation by ethylene. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 24: 260–70.
- Murray JD, Muni RRD, Torres-Jerez I, Tang Y, Allen S, Andriankaja M, Li G, Laxmi A, Cheng X, Wen J, *et al.* 2011.** Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 65: 244–52.
- Nagahashi G, Douds DD. 2000.** Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological research* 104: 1453–1464.
- Nagahashi G, Douds DD. 2004.** Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora gigantea*. *Mycological Research* 108: 1079–1088.
- Nagahashi G, Douds DDJ. 1997.** Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* 136: 299–304.
- Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu G, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N, Bucher M. 2005.** The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *The Plant Journal* 42: 236–50.
- Nair MG, Safir G R, Siqueira JO. 1991.** Isolation and Identification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza-Stimulatory Compounds from Clover (*Trifolium repens*) Roots. *Applied and environmental microbiology* 57: 434–9.
- Nanamori M, Shinano T, Wasaki J, Yamamura T, Rao IM, Osaki M. 2004.** Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in the tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. *Plant & cell physiology* 45: 460–9.

- Navazio L, Moscatiello R, Genre A, Novero M, Baldan B, Bonfante P, Mariani P. 2007.** A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant physiology* 144: 673–81.
- Oldroyd GED, Downie JA. 2006.** Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current opinion in plant biology* 9: 351–7.
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C. 2005.** Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44: 195–207.
- Ongaro V, Leyser O. 2008.** Hormonal control of shoot branching. *Journal of experimental botany* 59: 67–74.
- Op den Camp R, Streng A, De Mita S, Cao Q, Polone E, Liu W, Ammiraju JSS, Kudrna D, Wing R, Untergasser A, Bisseling T, Geurts R. 2011.** LysM-Type Mycorrhizal Receptor Recruited for *Rhizobium* Symbiosis in Non legume *Parasponia*. *Science* 311: 909–912.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible W-R. 2008.** MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *The Plant Journal* 53: 731–8.
- Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible W-R. 2009.** Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant physiology* 150: 1541–55.
- Parniske M. 2008.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews. Microbiology* 6: 763–75.
- Paszkowski U, Boller T. 2002.** The growth defect of *lrt1*, a maize mutant lacking lateral roots, can be complemented by symbiotic fungi or high phosphate nutrition. *Planta* 214: 584–590.
- Paszkowski U, Jakovleva L, Boller T. 2006.** Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* 47: 165–73.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP. 2002.** Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13324–9.
- Pearson JN, Jakobsen I. 1993.** The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labelling with ³²P and ³³P. *New Phytologist* 124: 489–494.
- Penmetta RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook DR. 2003.** Dual Genetic Pathways Controlling Nodule Number in *Medicago truncatula*. *Plant physiology* 131: 998–1008.
- Penmetta R, Cook Dr. 1997.** A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* 275: 527–30.
- Peters NK, Frost JW, Long SR. 1986.** A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233: 977–80.
- Plaxton WC, Tran HT. 2011.** Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant physiology* 156: 1006–15.

- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011.** A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current biology* : CB 21: 1197–203.
- Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J. 1991.** Mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant physiology* 97: 1087–93.
- Poirier Y, Bucher M. 2002.** Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book* / American Society of Plant Biologists 1: e0024.
- Price NS, Roncadori RW, Hussey RS. 1989.** Cotton root growth as influenced by phosphorus nutrition and vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* 111: 61–66.
- Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, Harrison MJ. 2010.** *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* 61: 482–94.
- Péret B, Clément M, Nussaume L, Desnos T. 2011.** Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in plant science* 16: 442–50.
- Pérez-Tienda J, Valderas A, Camañes G, García-Agustín P, Ferrol N. 2012.** Kinetics of NH_4^+ uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza*.
- Radutoiu S, Madsen Lene Heegaard, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, et al. 2003.** Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585–92.
- Raghothama K. G. 1999.** Phosphate Acquisition. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 50: 665–693.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AF. 2003.** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339: 62–66.
- Rasmussen A, Mason MG, De Cuyper C, Brewer PB, Herold S, Agusti J, Geelen D, Greb T, Goormachtig S, Beeckman T, et al. 2012.** Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant physiology* 158: 1976–87.
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M. 2001.** A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414: 462–70.
- Raven JA, Edwards D. 2001.** Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of experimental botany* 52: 381–401.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000.** Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920–1921.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994.** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841–11843.
- Requena N, Breuninger M, Franken P, Oco A. 2003.** Symbiotic Status , Phosphate , and Sucrose Regulate the Expression of Two Plasma Membrane H^+ -ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant physiology* 132: 1540–1549.

- Rosewarne GM, Smith FA, Schachtman DP, Smith SE. 2007.** Localization of proton-ATPase genes expressed in arbuscular mycorrhizal tomato plants. *Mycorrhiza* 17: 249–58.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. 2001.** A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & development* 15: 2122–2133.
- Ruiz-Lozano JM, Roussel H, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1999.** Defense Genes Are Differentially Induced by a Mycorrhizal Fungus and *Rhizobium* sp. in Wild-Type and Symbiosis-Defective Pea Genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 976–984.
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, *et al.* 2011.** Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant physiology* 155: 721–34.
- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, *et al.* 2007.** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *The Plant cell* 19: 610–24.
- Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher RA, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook DR, Boller T. 2000.** Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 13: 763–77.
- Sanders IR, Croll D. 2010.** Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annual review of genetics* 44: 271–92.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Bompadre J, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. 2007.** The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomus*. *Canadian journal of microbiology* 53: 702–9.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998.** Phosphorus Uptake by Plants : From Soil to Cell. *Plant physiology* 116: 447–453.
- Schreiner RP, Koide RT. 1993.** Stimulation of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Mycotrophic and Stimulation of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Mycotrophic and Nonmycotrophic Plant Root Systems. *Applied and environmental microbiology* 59: 2750–2752.
- Schwartz SH, Qin X, Loewen MC. 2004.** The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *The Journal of biological chemistry* 279: 46940–5.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research* 105: 1413–1421.
- Schüßler A, Walker C. 2010.** The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester. Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University.
- Seddas PMA, Arias CM, Arnould C, van Tuinen D, Godfroy O, Benhassou HA, Gouzy J, Morandi D, Dessaint F, Gianinazzi-Pearson V. 2009.** Symbiosis-related plant genes

modulate molecular responses in an arbuscular mycorrhizal fungus during early root interactions. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 22: 341–51.

Sharda JN, Koide RT. 2008. Can hypodermal passage cell distribution limit root penetration by mycorrhizal fungi? *The New phytologist* 180: 696–701.

Shin H, Shin H-S, Chen R, Harrison MJ. 2006. Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *The Plant Journal* 45: 712–26.

Shinya T, Motoyama N, Ikeda A, Wada M, Kamiya K, Hayafune M, Kaku H, Shibuya N. 2012. Functional Characterization of CEBiP and CERK1 Homologs in Arabidopsis and Rice Reveals the Presence of Different Chitin Receptor Systems in Plants. *Plant & cell physiology* 53: 1696–706.

Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, DeWit PJGM, Bonfante P. 2007. Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant physiology* 144: 1455–66.

Sieberer BJ, Chabaud M, Fournier J, Timmers ACJ, Barker DG. 2012. A switch in Ca(2+) spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 69: 822–830.

Sieberer BJ, Chabaud M, Timmers ACJ, Monin A, Fournier J, Barker DG. 2009. A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant physiology* 151: 1197–206.

Singh S, Parniske M. 2012. Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current opinion in plant biology*: 1–10.

Smit P, Limpens E, Geurts R, Fedorova E, Dolgikh E, Gough C, Bisseling T. 2007. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant physiology* 145: 183–91.

Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T, Geurts R. 2005. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308: 1789–91.

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* (AP London, Ed.). New York.

Smith SE, Smith AF. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology* 62: 227–50.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2003. Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. *Plant physiology* 133: 16–20.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2004. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162: 511–524.

Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ. 2005. The Decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 Gene Affects Branch Production and Plays a Role in Leaf Senescence , Root Growth , and Flower Development. *The Plant Cell* 17: 746–759.

- Sorefan K, Booker J, Haurogné K, Gousset M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge CA, et al. 2003.** MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes & development* 17: 1469–74.
- Sprent JI. 2007.** Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *The New phytologist* 174: 11–25.
- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint J-P, Vierheilig H. 2007.** Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules (Basel, Switzerland)* 12: 1290–306.
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HMO. 2002.** MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)* 129: 1131–41.
- Stirnberg P, Ward S, Leyser O. 2010.** Auxin and strigolactones in shoot branching: intimately connected? *Biochemical Society transactions* 38: 717–22.
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A. 2009.** “Glomus intraradices DAOM197198”, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not Glomus intraradices. *The New phytologist* 183: 1176–87.
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard Jens, Szczyglowski K, et al. 2002.** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959–62.
- Subramanian S, Stacey G, Yu O. 2007.** Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science* 12: 282–5.
- Sun S, Wang J, Zhu L, Liao D, Gu M, Ren L, Kapulnik Y, Xu G. 2012.** An active factor from tomato root exudates plays an important role in efficient establishment of mycorrhizal symbiosis. *PLoS one* 7: e43385.
- Swistonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T. 2007.** Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature genetics* 39: 792–6.
- Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Bécard G, Franken P. 2003.** Root Factors Induce Mitochondrial-Related Gene Expression and Fungal Respiration during the Developmental Switch from Asymbiosis to Presymbiosis in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora rosea*. *Plant physiology* 131: 1468–1478.
- Tawaraya K, Watanabe S, Yoshida E, Wagatsuma T. 1996.** Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 6: 57–59.
- Theodorou ME, Plaxton WC. 1993.** Metabolic Adaptations of Plant Respiration to Nutritional Phosphate Deprivation. *Plant physiology* 101: 339–344.
- Thibaud M-C, Arrighi J-F, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz-Ares J, Poirier Y, Nussaume L. 2010.** Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *The Plant Journal* 64: 775–89.
- Thomson BD, Robson AD, Abbott LK. 1986.** Effects of phosphorus on the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* in relation to root carbohydrates. *New Phytologist* 103: 751–765.

- Thomson BD, Robson AD, Abbott LK. 1991.** Soil mediated effects of phosphorus supply on the formation of mycorrhizas by *Scutellispora calospora* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders on subterranean clover. *New Phytologist* 118: 463–469.
- Ticconi CA, Delatorre CA, Lahner B, Salt DE, Abel S. 2004.** *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *The Plant Journal* 37: 801–14.
- Ticconi CA, Lucero RD, Sakhonwasee S, Adamson AW, Creff A, Nussaume L, Desnos T, Abel S. 2009.** ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 14174–9.
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen Lene H, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, et al. 2006.** Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441: 1153–6.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez S K, Koul R, et al. 2012.** The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *The New phytologist* 193: 755–69.
- Toh S, Kamiya Y, Kawakami N, Nambara E, McCourt P, Tsuchiya Y. 2012a.** Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in *Arabidopsis* seed germination. *Plant & cell physiology* 53: 107–17.
- Toh S, McCourt P, Tsuchiya Y. 2012b.** HY5 is involved in strigolactone-dependent seed germination in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior* 7.
- Topalović A, Slatnar A, Stampar F, Knezević M, Veberic R. 2011.** Influence of foliar fertilization with P and K on chemical constituents of grape cv. “Cardinal”. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 10303–10.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986.** Mesure du taux de mycorhization VA d’un système racinaire. Recherche des méthodes d’estimation ayant une signification fonctionnelle. *The Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. Pages 217–221 V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi, eds. INRA Presse, Paris
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T, Hsing YC, Kitano H, Yamaguchi I, et al. 2005.** GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693–8.
- Umehara M. 2011.** Strigolactone, a key regulator of nutrient allocation in plants. *Plant Biotechnology* 28: 429–437.
- Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N, Yamaguchi S. 2010.** Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant & cell physiology* 51: 1118–26.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al. 2008.** Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195–200.
- Valdés-López O, Arenas-Huertero C, Ramírez M, Girard L, Sánchez F, Vance CP, Luis Reyes J, Hernández G. 2008.** Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA:

- PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, cell & environment* 31: 1834–43.
- Valdés-López O, Yang SS, Aparicio-Fabre R, Graham PH, Reyes JL, Vance CP, Hernández G. 2010.** MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *The New phytologist* 187: 805–18.
- Vierheilig H. 2004a.** Short Communication Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants is suppressed after a critical level of root colonization. *Journal of plant physiology* 161: 339–341.
- Vierheilig H. 2004b.** Regulatory mechanisms during the plant – arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany* 82: 1166–1176.
- Vierheilig H, Coughlan A, Wyss U, Piche Y. 1998.** Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology* 64: 5004–7.
- Vierheilig H, Garcia-Garrido JM, Wyss U, Piche Y. 2000a.** Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil biology & biochemistry* 32: 589–595.
- Vierheilig H, Lerat S, Piché Y. 2003.** Systemic inhibition of arbuscular mycorrhiza development by root exudates of cucumber plants colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 13: 167–170.
- Vierheilig H, Maier W, Wyss Urs, Samson J, Strack D, Piché Y. 2000b.** Cyclohexenone derivative- and phosphate-levels in split-root systems and their role in the systemic suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. *Journal of Plant Physiology* 157: 593–599.
- Vogel JP, Raab TK, Somerville CR, Somerville SC. 2004.** Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *The Plant Journal* 40: 968–78.
- Vogel JT, Walter MH, Gialvalisco P, Lytovchenko A, Kohlen W, Charnikhova T, Simkin AJ, Goulet C, Strack D, Bouwmeester HJ, *et al.* 2010.** SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal* 61: 300–11.
- Walker SA, Viprey V, Downie JA. 2000.** Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 13413–8.
- Wang E, Schornack S, Marsh J, Gobbatto E, Schwessinger B, Eastmond P, Schultze M, Kamoun S and Oldroyd GED. 2012.** A novel signaling process to promote mycorrhizal infection usurped by an oomycete pathogen. 1st Molecular Mycorrhizal Meeting, Poster session, September 2012, Munich.
- Watahiki M, Trewavas A, Parton R. 2004.** Fluctuations in the pollen tube tip-focused calcium gradient are not reflected in nuclear calcium level: a comparative analysis using recombinant yellow cameleon calcium reporter. *Sexual Plant Reproduction* 17: 125–130.
- Waters MT, Brewer PB, Bussell JD, Smith SM, Beveridge CA. 2012.** The arabidopsis ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by strigolactones. *Plant physiology* 159: 1073–85.

- Waters MT, Smith SM, Nelson DC. 2011.** Smoke signals and seed dormancy: where next for MAX2? *Plant signaling & behavior* 6: 1418–22.
- 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*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 17: 1385–93.
- Whipps JM. 2004.** Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82: 1198–1227.
- Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Leyser HMO. 2001.** Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 126: 875–82.
- Wulf A, Manthey K, Doll J, Perlick AM, Linke B, Bekel T, Meyer F, Franken P, Küster H, Krajinski F. 2003.** Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 16: 306–14.
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2009.** Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 70: 211–5.
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K. 2010.** The Strigolactone Story. *Annual review of phytopathology* 48: 93–117.
- Yano K, Yamauchi A, Kono Y. 1996.** Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* 6: 409–415.
- Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, et al. 2008.** CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20540–5.
- Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K. 2012.** How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* 235: 1197–1207.
- Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2007a.** Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol , the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227: 125–132.
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K. 2008.** Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *The New phytologist* 179: 484–94.
- Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H. 2007b.** Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol , the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* 225: 1031–1038.
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y. 2009.** Strigolactones: structures and biological activities. *Pest management science* 65: 467–70.
- Yoshida S, Kameoka H, Tempo M, Akiyama K, Umehara M, Yamaguchi S, Hayashi H, Kyojuka J, Shirasu K. 2012.** The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The New phytologist*.

- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J, Schoof H, *et al.* 2011.** The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520–4.
- Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ. 2010.** Two Medicago truncatula half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant cell* 22: 1483–97.
- Zhu YY, Zeng HQ, Dong CX, Yin XM, Shen QR, Yang ZM. 2010.** microRNA expression profiles associated with phosphorus deficiency in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Science* 178: 23–29.
- Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L. 2006.** The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant Journal* 48: 687–98.

RESEARCH PAPER

The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events

Coline Balzergue^{1,2}, Virginie Puech-Pagès^{1,2}, Guillaume Bécard^{1,2} and Soizic F. Rochange^{1,2,*}

¹ Université de Toulouse; UPS; UMR 5546, Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux, BP 42617, F-31326 Castanet-Tolosan, France

² CNRS; UMR 5546; BP 42617, F-31326 Castanet-Tolosan, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: rochange@scsv.ups-tlse.fr

Received 18 August 2010; Revised 24 September 2010; Accepted 4 October 2010

Abstract

Most plants form root symbioses with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, which provide them with phosphate and other nutrients. High soil phosphate levels are known to affect AM symbiosis negatively, but the underlying mechanisms are not understood. This report describes experimental conditions which triggered a novel mycorrhizal phenotype under high phosphate supply: the interaction between pea and two different AM fungi was almost completely abolished at a very early stage, prior to the formation of hyphopodia. As demonstrated by split-root experiments, down-regulation of AM symbiosis occurred at least partly in response to plant-derived signals. Early signalling events were examined with a focus on strigolactones, compounds which stimulate pre-symbiotic fungal growth and metabolism. Strigolactones were also recently identified as novel plant hormones contributing to the control of shoot branching. Root exudates of plants grown under high phosphate lost their ability to stimulate AM fungi and lacked strigolactones. In addition, a systemic down-regulation of strigolactone release by high phosphate supply was demonstrated using split-root systems. Nevertheless, supplementation with exogenous strigolactones failed to restore root colonization under high phosphate. This observation does not exclude a contribution of strigolactones to the regulation of AM symbiosis by phosphate, but indicates that they are not the only factor involved. Together, the results suggest the existence of additional early signals that may control the differentiation of hyphopodia.

Key words: Phosphorus, arbuscular mycorrhiza, strigolactone, symbiosis, hyphopodium.

Introduction

Roots of the vast majority of plant species develop symbiotic associations with arbuscular mycorrhizal (AM) soil fungi. Fungal hyphae develop in the root cortex where they form intracellular highly branched structures called arbuscules, and simultaneously in the soil where they form a dense mycelial network. Within the root the plant supplies the fungus with hexoses, at a cost of up to 20% of the carbon fixed by photosynthesis (Smith and Read, 2008). In return, it obtains water and minerals taken up from soil by the mycelial network. The main benefit of the symbiosis for the plant is an enhanced acquisition of phosphorus (P),

a frequent limiting factor in plant growth due to its poor solubility and mobility in soils.

Despite the importance of AM symbiosis, cellular and molecular events underlying this interaction are only beginning to be unravelled (Parniske, 2008). Direct genetic screens to identify mycorrhizal (*myc*[−]) mutants are extremely cumbersome. As a result, most *myc*[−] mutants in fact belong to a subset of mutants initially isolated as deficient in nitrogen-fixing symbiosis, this latter interaction being easier to examine. A consequence of this bias is the relative scarcity of mutants affected in events unique to the

AM symbiosis, including pre-colonization signalling and arbuscule development and function (Marsh and Schultze, 2001). Nonetheless, several specific *myc*⁻ mutants have been identified in the past few years. They can be affected in different stages of the interaction as summarized in Pumplin *et al.* (2009): pre-symbiotic fungal growth, formation of hyphopodia (root attachment and penetration structures, formerly referred to as appressoria), epidermal penetration, and arbuscule development (see also Zhang *et al.*, 2010).

Various physiological situations are known to affect the development of AM symbiosis. For instance, plants control the extent to which AM fungi can colonize their roots according to their own nutritional requirements. The best known example of such regulations is the control of AM symbiosis according to P availability. Roots can acquire P as inorganic orthophosphate (Pi) through different pathways (Bucher, 2007). In certain conditions the mycorrhizal uptake pathway, which involves specific Pi transporters (Rausch *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2002; Paszkowski *et al.*, 2002), can be the major route for P uptake (Smith *et al.*, 2003). When P is abundant, a direct, probably less costly uptake pathway is preferred (Nagy *et al.*, 2008), and a reduced root colonization by AM fungi is observed. This down-regulation of the symbiosis by P has been known for a long time (Graham *et al.*, 1981; Thomson *et al.*, 1986; Elias and Safir, 1987; Rausch *et al.*, 2001; and many others). It seems to be a general phenomenon, although its magnitude can vary (Javot *et al.* 2007; Smith and Read, 2008). It has far-reaching consequences in natural ecosystems where it modulates the effect of AM fungi on plant species diversity (Collins and Foster, 2009), as well as in agriculture where strong P fertilization may in the long term decrease the presence and richness of soil AM communities (Johnson, 1993).

Little is known about mechanisms underlying the regulation of AM symbiosis by P. A recent study (Branscheid *et al.*, 2010) has documented this down-regulation in *Medicago truncatula*, and investigated the identity of the internal signal that triggers suppression of the interaction under high P. Nonetheless, the downstream mechanisms that prevent or limit root colonization by AM fungi remain largely unknown. Early studies led to conflicting results and interpretations, partly due to the variety of species combinations and experimental systems. Some of these early studies interpreted the impact of high P on the fungus in terms of trophic effects: high P would decrease the root secretion of metabolites used by the fungus, such as amino acids or carbohydrates (e.g. Graham *et al.*, 1981; Thomson *et al.*, 1986). An alternative proposition was that qualitative rather than quantitative differences between root exudates of P-replete and P-deficient plants could account for their differential effects on the fungus (Elias and Safir, 1987). This led to the suggestion that P-deprived roots exuded important flavonoid signals that triggered pre-symbiotic fungal growth and activity (Nair *et al.*, 1991). Advances made in the last 10 years have indeed emphasized the importance of signalling events in mycorrhizal interactions,

and the recent identification of some signals may shed new light on the regulation of AM symbiosis by P.

Plants and AM fungi are known to exchange molecular signals prior to physical contact, at the so-called pre-symbiotic stage. Various lines of evidence indicate that AM fungi produce diffusible compounds able to modulate root gene expression (Kosuta *et al.*, 2003; Weidmann *et al.*, 2004), intracellular signalling (Navazio *et al.*, 2007; Kosuta *et al.*, 2008), development (Olah *et al.*, 2005), and metabolism (Gutjahr *et al.*, 2009). Reciprocally, plant roots secrete compounds that stimulate the fungus (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Siqueira *et al.*, 1991; Tsai and Phillips, 1991; Giovannetti *et al.*, 1996; Buée *et al.*, 2000). A group of secondary metabolites called strigolactones were identified as major contributors to this effect (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006). Strigolactones trigger morphological and developmental responses in the fungus such as hyphal branching and spore germination, and enhance fungal mitochondrial activity and respiration (Besserer *et al.*, 2006, 2008). Strigolactone-mediated signalling is necessary for a normal level of root colonization, as demonstrated using strigolactone-deficient mutants (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). Most interestingly, these root-exuded compounds also play an important role *in planta*, acting as hormones that contribute to the regulation of shoot branching (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

Prior to the discovery of their roles in AM symbiosis and plant development, strigolactones were known as germination stimulants for the seeds of the parasitic plants *Striga* and *Orobanch*e (Bouwmeester *et al.*, 2007). Damage caused to crops by these weeds is lower under strong nutrient fertilization, which led to the investigation of whether P availability influenced strigolactone release into the soil. Indeed, several studies demonstrated a strong negative effect of high P supply on strigolactone production and exudation in various species (Yoneyama *et al.*, 2007a, b; Lopez-Raez *et al.*, 2008). A reasonable hypothesis is that high P availability would decrease the extent of AM symbiosis by reducing strigolactone production in roots (Bouwmeester *et al.*, 2007; Yoneyama *et al.*, 2007b).

In this report, P fertilization conditions which lead to an almost complete arrest of the first stages of the interaction between pea (*Pisum sativum* L.) and two species of AM fungi are described. This strong effect is at least partly linked to regulatory events occurring in the plant partner, as shown by split-root experiments. Furthermore, it is demonstrated that like root colonization, strigolactone production is controlled in a systemic manner by P supply. Hence, strigolactones may contribute to the regulation of AM symbiosis by P, but supplementation experiments indicate that they are not the only factor involved.

Materials and methods

Plant and fungal materials

Seeds of garden pea (*Pisum sativum* L., cv Terese) were surface sterilized with 3.2% sodium hypochlorite for 10 min and 95%

ethanol for 2 min, and washed four times with sterile distilled water. Seeds were germinated on agar–water [0.8% (w/v)] solid medium for 4 d at 25 °C.

Gigaspora rosea spores (DAOM 194757) were produced and surface sterilized as described in Besserer *et al.* (2006). Sterile *Glomus intraradices* spores (DAOM 197198) were purchased from Premier Tech Ltée (Rivière du Loup, Québec, Canada) or produced according to St-Arnaud *et al.* (1996).

Growth and inoculation of plants

Plants were grown in a growth chamber under a 16 h photoperiod (22 °C day, 20 °C night), in pots containing sterilized charred clay (Oil-Dri, Klasmann, France) as substrate. They were fertilized daily with half-strength Long Ashton Nutrient Solution (LANS; Hewitt, 1966) containing a final concentration of 7.5 µM (low P; LP), 75 µM (medium P; MP), or 750 µM (high P; HP) sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4). Phosphate was supplied as KH_2PO_4 instead of NaH_2PO_4 in two experiments.

For the determination of mycorrhizal ability, germinated seedlings were transferred to 250 ml pots. They were inoculated with 150 or 600 spores of *Gl. intraradices*, or 100 spores of *Gi. rosea*. Two-thirds of the spores were mixed with the substrate and one-third was added close to the seedling. The percentage of root length colonized by the fungus (i.e. showing arbuscules, vesicles, or both) was determined by the gridline intersection method (Giovannetti and Mosse, 1980) using a dissecting microscope after staining with Schaeffer black ink (Vierheilig *et al.*, 1998). For the quantification of early symbiotic structures, roots were handled very carefully during rinses and staining to avoid tearing off hyphae from the roots. For each plant, 60 randomly picked 1 cm long root fragments mounted on glass slides were examined under a microscope at $\times 40$ magnification, and hyphopodia were counted.

For split-root experiments, sterile seedlings were grown on solid medium (nutrient solution solidified with 0.4% phytagel) until radicles were ~2 cm long. The root apex was cut off and the primary root was divided lengthwise into two equal parts. Seedlings were kept on solid medium for another week during which lateral roots developed on both sides of the split root. They were then transferred to two-compartment pot systems with 150 ml of substrate per compartment. Each compartment was inoculated with 90 spores of *Gl. intraradices* mixed with the substrate. Following plant harvest, root fresh weight was determined and plants for which one side of the root system was >2-fold heavier than the other side were excluded from the analysis.

Preparation of root exudate extracts

Three-week-old non-inoculated plants fertilized with LP or HP nutrient solution were removed from the substrate. Their roots were rinsed and immersed in the same nutrient solution for 24 h. Exudates were extracted with 1 vol. of ethyl acetate, then the organic phase was treated with 1 vol. of 0.2 M K_2HPO_4 . Residual water was removed with anhydrous MgSO_4 , and ethyl acetate extracts were filtered and dried under vacuum. Exudate extracts were resuspended in the appropriate solvents for branching bioassays or mass spectrometry analysis, and their concentration was adjusted on a root dry weight basis.

Determination of P contents

Inorganic phosphate (Pi) content was measured using the colorimetric method based on molybdenum blue described in Nanamori *et al.* (2004). The only modification was that plant tissues were ground in perchloric acid using a FASTPREP® system (MP Biomedicals) with lysing matrix A.

Gigaspora rosea hyphal branching bioassay

Spores of *Gi. rosea* were germinated on solid M medium (Bécard and Fortin, 1988) as described in Besserer *et al.* (2006). Root exudate extracts produced by the equivalent of 120 mg of root dry weight were resuspended in 1 ml of 10% (v:v) acetonitrile. Samples of 5 µl were applied on both sides of the main hypha of a 6-day-old germinated spore. Newly formed apices were counted 48 h after treatment. The experiment included spores treated with 10% acetonitrile (negative control) and with 100 nM GR24 in 10% acetonitrile (positive control).

For the experiment described in Supplementary Fig. S1 available at JXB online, spores were germinated on LP or HP half-strength LANS solidified with 0.7% high gel strength agar, and treated either with 100 nM GR24 or with the solvent only.

Glomus intraradices germination assays

The assays were carried out in 25-compartment plates. Four compartments were used for each treatment. In each compartment, 1 ml of a sterile suspension of *Gl. intraradices* spores at 30 spores ml^{-1} was added to 1 ml of sterile test solution. The test solutions corresponded to full-strength LP or HP LANS, so the final concentrations of nutrients were equivalent to those of the watering solutions. The nutrient solutions alone were tested, as well as the same solutions containing root exudate extracts (1 ml of test solution then contained root exudates produced by the equivalent of 1 mg of root dry weight). Plates were incubated at 30 °C under 2% CO_2 in the dark. Spore germination rates were determined 5 d after treatment.

Chromatography and mass spectrometry analyses

Root exudate extracts were dissolved in acetonitrile:water [1:1 (v/v)]. Strigolactone detection was performed using a 4000 Q Trap mass spectrometer with a Turbo V ESI source in the positive mode, coupled to an Agilent 1100 series HPLC system as described in Gomez-Roldan *et al.* (2008), except for the following modifications. HPLC separation was performed using a C18 column (5 µm, 2.1 \times 250 mm, ACCLAIM 120C18, Dionex). Solutions of formic acid:water [1:10³ (v/v); A] and formic acid:acetonitrile [1:10³ (v/v); B] were pumped at 0.2 ml min^{-1} . The gradient was: 50% B for 5 min, 50–70% B in 5 min, 70% B for 10 min, 70–100% B in 10 min, and 100% B for 5 min. The reported peak intensities correspond to extracts obtained with the equivalent of 75 mg of root dry weight. GR24 was added as an external standard to all samples at a final concentration of 100 nM. The two major pea strigolactones and GR24 were detected in the MRM mode by monitoring the transitions 405>97 m/z and 405>345 m/z for fabacyl acetate, 389>233 m/z and 411>254 m/z for orobanchyl acetate, and 299>202 m/z for GR24.

Statistical analyses

Results were analysed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD test or Student's *t*-test using Statgraphics Centurion software (Sigma Plus). Data in Figs 2, 3D, and 5 were subjected to logarithmic, cosine, and arc sine transformation, respectively, prior to analysis. Data in Supplementary Fig. S1 at JXB online were analysed by a Kruskal–Wallis test.

Results

Experimental system

Pea plants in interaction with *Gl. intraradices* have been used previously to determine the importance of strigolactones in AM symbiosis (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). For the present study the main advantage of pea was that the

strigolactones produced by this species are characterized (Yoneyama *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009) and readily detectable. To evaluate the effect of P supply on AM interactions, plants were fertilized with half-strength LANS (Hewitt, 1966) containing different concentrations of P. The HP solution contained the normal concentration of phosphate of half-strength LANS—that is, 750 μM P. MP and LP corresponded to 10- and 100-fold lower phosphate concentrations, respectively. Plant growth evaluated by fresh weight was the lowest under LP, intermediate under MP, and maximal under HP (Supplementary Table S1 at *JXB* online). Therefore, HP fertilization provides sufficient but not excess P, while LP corresponds to P starvation conditions. Pea plants exhibited a remarkably strong mycorrhizal response to P fertilization (Fig. 1): when inoculated with *Gl. intraradices*, plants grown under LP exhibited colonization levels of $\sim 60\%$, while hardly any fungal structures could be observed in roots under HP ($<1\%$ root length colonized). The effect of HP was also tested in the interaction between *P. sativum* and *Gi. rosea*, a fungus phylogenetically distant from *Gl. intraradices*. Root colonization levels were lower with *Gi. rosea* than with *Gl. intraradices* (Fig. 1). Similar observations have been reported in another legume, *Medicago sativa* (Douds *et al.* 1998) and may reflect host preferences in AM interactions. Nonetheless, high P exerted a similarly strong negative effect on root colonization with both fungal species, suggesting that the regulation mechanisms involved are not fungus specific.

Mycorrhizal phenotype of plants grown under HP

Plants seem to possess multiple checkpoints for mycorrhizal invasion, and the interaction can be stopped at distinct

stages in various mutant backgrounds (Pumplin *et al.*, 2009). To determine at what stage the interaction was arrested under HP, inoculated roots were subjected to closer microscopic examination. This allows the observation of all fungal structures including hyphopodia, which are visible as flattened, lenticular hyphal tips attached to the root epidermal surface (Garriock *et al.*, 1989). Like the frequency of arbuscules and vesicles reported in Fig. 1, the number of hyphopodia per unit of root length was markedly reduced under HP as compared with LP, in plants inoculated either with *Gl. intraradices* or with *Gi. rosea* (Table 1). Similar observations were made when P was supplied as NaH_2PO_4 or KH_2PO_4 , indicating that the observed effect was not due to the phosphate counterion. It has to be noted that when present, hyphopodia, arbuscules, and vesicles in HP-grown roots could not be distinguished morphologically from those observed in LP-grown roots (results not shown). In an experiment with *Gl. intraradices*, roots were also observed at an earlier time point, 4 weeks post-inoculation (wpi). Again, the frequency of hyphopodia was much lower under HP than under LP. Under the present conditions, this time point corresponds to the very first stages of root colonization. (At 3 wpi no fungal structures can be observed on roots, and at 4 wpi the root colonization level is $<5\%$; data not shown. This slow progression of AM symbiosis establishment is most probably related to the inoculation with spores rather than with more infectious sources of inoculum.) Together, these results indicate that under HP the interaction was arrested prior to the formation of hyphopodia on the root epidermis.

Effect of P supply on pre-symbiotic signalling

The possible involvement of diffusible signals acting at the pre-symbiotic stage was considered. Such signals could

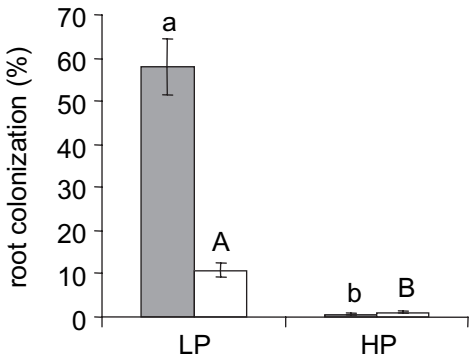


Fig. 1. Effect of phosphate fertilization on mycorrhizal root colonization. Plants inoculated with 600 spores of *Gl. intraradices* (grey bars) or 100 spores of *Gi. rosea* (white bars) were grown under low (LP) or high (HP) phosphate fertilization. The extent of root colonization was determined after observation of stained root samples as the fraction of root length showing arbuscules, vesicles, or both in the case of *Gl. intraradices*, and arbuscules in the case of *Gi. rosea*. Error bars show the SEM; $n=5-6$ plants when inoculated with *Gl. intraradices* and $n=7-8$ plants when inoculated with *Gi. rosea*. Different letters indicate statistically significant differences according to Student's *t*-test ($P < 0.05$).

Table 1. Frequency of hyphopodia on inoculated roots

Plants inoculated with 150 spores of *Gl. intraradices* or 100 spores of *Gi. rosea* were grown under LP or HP with KH_2PO_4 or NaH_2PO_4 as phosphorus source. Data correspond to three independent experiments: one with *Gl. intraradices* and KH_2PO_4 , one with *Gl. intraradices* and NaH_2PO_4 , and one with *Gi. rosea* and KH_2PO_4 . Root samples were examined microscopically 4, 6, or 7 weeks post-inoculation for the presence of hyphopodia. Values indicate the average number of hyphopodia per metre of root length, \pm SEM. $n=3-4$ plants when inoculated with *Gl. intraradices* and $n=7-8$ plants when inoculated with *Gi. rosea* (60 cm of roots analysed per plant). Data were analysed separately for each experiment and time point. Different letters indicate statistically significant differences according to Student's *t*-test ($P < 0.05$).

	Weeks post-inoculation		No. of hyphopodia m^{-1} root
<i>Gl. intraradices</i> KH_2PO_4	6	LP	112 \pm 42.4 a
		HP	6.67 \pm 1.67 b
<i>Gl. intraradices</i> NaH_2PO_4	4	LP	38.8 \pm 5.42 a
		HP	1.33 \pm 0.83 b
	6	LP	42.9 \pm 2.67 a
		HP	0.42 \pm 0.42 b
<i>Gi. rosea</i> KH_2PO_4	7	LP	61.7 \pm 10.63 a
		HP	10.2 \pm 3.94 b

include activators or inhibitors of early fungal development. Germination rates of *Gl. intraradices* spores exceeded 96% within 5 d in LP and HP nutrient solutions alone, and in these solutions supplemented with extracts of root exudates prepared from LP- or HP-grown plants (data not shown). This suggests the absence of a negative impact of HP conditions on this process.

Hyphal branching activities of root exudates from HP- and LP-grown plants were then evaluated. This experiment was carried out on germinated spores of *Gi. rosea*, for which hyphal branching can more easily be observed. Root exudate extracts of LP-grown plants, as well as GR24, stimulated hyphal branching (Fig. 2). The combination of both treatments showed an additive effect. Root exudate extracts of HP-grown plants did not enhance hyphal branching relative to the control, which could be due either to the lack of stimulants or to the presence of inhibitors. The addition of GR24 to exudate extracts of HP-grown plants resulted in an activity similar to that of GR24 alone, suggesting that these extracts do not contain inhibitors of the strigolactone effect. Rather, they may lack important stimulants of hyphal branching.

Systemic control of AM symbiosis by P

The effect of HP fertilization on AM symbiosis reported above is unusually strong. This raises the possibility that, although HP conditions do not correspond to a very high phosphate concentration, they somehow disturb early fungal development (the reduced root colonization would then be a secondary effect of these perturbations). Indeed, AM fungi can sense and react to P availability (Requena *et al.*, 2003). As shown above, HP does not prevent germination of *Gl. intraradices* spores. Moreover, whether HP could prevent fungal responsiveness to GR24 was tested with the branching bioassay. *Gigaspora rosea* spores grown in LP or HP conditions responded equally well to

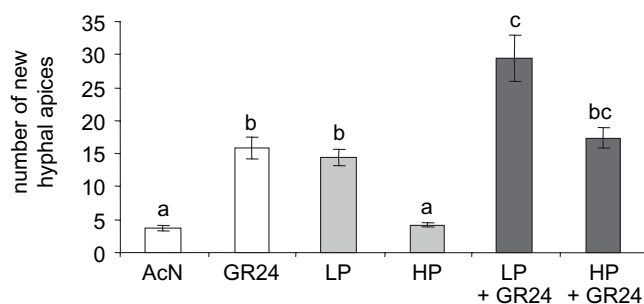


Fig. 2. *Gigaspora rosea* hyphal branching in response to GR24, LP or HP root exudates. Germinated spores of *Gi. rosea* were treated with GR24 and/or root exudates of low (LP) or high (HP) phosphate-grown plants, or with the solvent alone as negative control (10% acetonitrile; AcN). Newly formed hyphal apices were counted 48 h after treatment. White bars, controls; grey bars, root exudates alone; black bars, root exudates+GR24. Error bars show the SEM; $n=24$ –26 treated spores for each condition. Different letters indicate statistically significant differences according to one-way ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$).

GR24 (Supplementary Fig. S1 at *JXB* online), suggesting that P fertilization should not affect fungal ability to respond to strigolactones. To investigate further whether the early arrest of AM symbiosis could be due to a post-germination direct effect of HP on the fungus, split-root experiments were carried out in which two halves of a root system were fertilized independently. In the experimental set-up described in Fig. 3A, all compartments were inoculated with spores of *Gl. intraradices*. Test plants (denoted LP/HP) were watered with LP on one side and HP on the other. Both sides of control plants (denoted LP/LP and HP/HP) were watered with the same solution. In these control plants, colonization rates were comparable with those observed in intact plants—that is, high in LP and very low in HP ($<0.1\%$ root length colonized; Fig 3B). The HP-watered roots of test LP/HP plants behaved like those of HP/HP plants, showing hardly any colonization. The most striking observation was that LP-watered roots of LP/HP plants were markedly less colonized than LP/LP plants (2% of root length versus 60%). In other words, root colonization on the LP side of LP/HP plants did not respond to local fertilization conditions but to the fertilization of a distant part of the plant. This systemic regulation indicates that the effects of HP are mediated by the plant in split LP/HP plants. This does not exclude the possibility that additional direct effects on the fungus contribute to the reduced root colonization in HP/HP or intact HP plants.

Pi contents were determined in roots and leaves of the same inoculated split-root plants (Fig. 3C, D). The results are expressed in micromol Pi g^{-1} fresh weight to reflect the actual availability of Pi in the different tissues [NB: a high P supply resulted in increased root and leaf biomass in both LP/HP and HP/HP plants (results not shown), so the total amount of P taken up by these plants was higher than in LP/LP plants]. The results in Fig. 3C and D show that LP/HP plants accumulated Pi in leaves rather than in roots, indicating that in these conditions leaves acted as a stronger sink than roots. Roots on the LP side displayed Pi contents similar to those of LP/LP plants, yet their colonization rates were much lower (Fig. 3B). Therefore, down-regulation of AM symbiosis is not triggered by root Pi content. In contrast, leaves of LP/HP plants accumulated Pi at levels comparable with HP/HP plants. It can thus be hypothesized that the low root colonization levels observed in both types of plants may be related to high leaf Pi contents.

Effect of P supply on strigolactone production in split-root systems

Given that previous results point towards an effect of HP on early events in the AM interaction, that strigolactones are important pre-symbiotic signals (Gomez-Roldan *et al.*, 2008), and that their production is regulated by P supply (Yoneyama *et al.*, 2007a, b; Lopez-Raez *et al.*, 2008), it is reasonable to envisage that these compounds mediate the effect of HP. If such is the case, one would expect

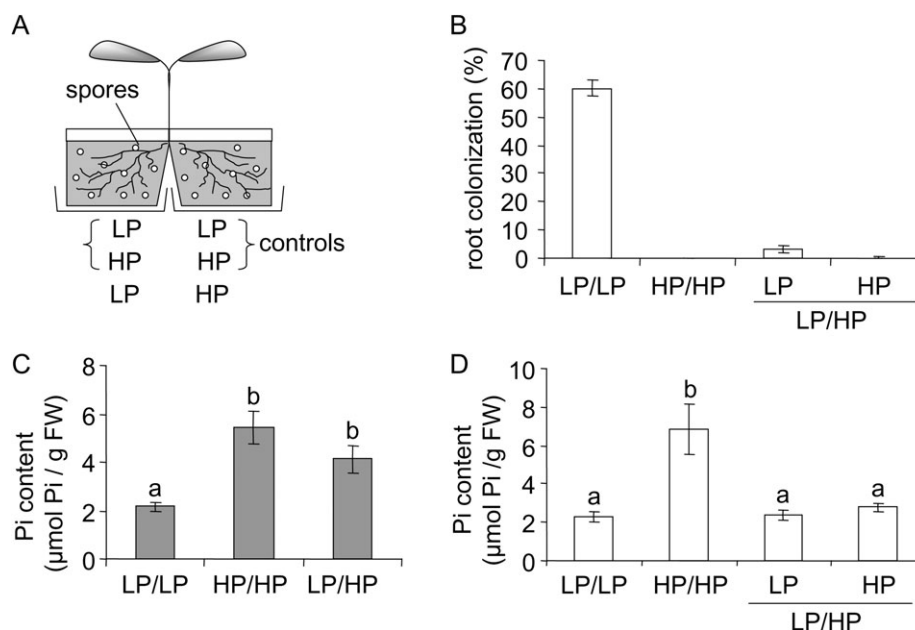


Fig. 3. Mycorrhizal root colonization in split-root systems. (A) Experimental design. Each root system was divided into two parts placed in different pots to allow differential phosphate fertilization. Both sides were inoculated with 90 spores of *Gl. intraradices* and plants were grown for 6 weeks. Control plants were fertilized with the same solution on both sides. Results in B, C, and D correspond to the same plants. (B) Root colonization levels determined by observation of stained root samples. For control plants, colonization levels measured on both sides were averaged. (C, D) Inorganic orthophosphate (Pi) content in leaves (C) and roots (D). Error bars show the SEM; $n=5-7$ plants for each condition. Different letters indicate statistically significant differences according to one-way ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$).

strigolactone synthesis to be systemically regulated by P, like AM symbiosis.

Root exudates obtained with split-root plants were analysed to address this question. The experimental set-up was similar to that described in Fig. 3, except that the plants were not inoculated. Figure 4 shows LC-MS/MS chromatograms obtained with extracts of root exudates. In the MRM detection mode used, each line corresponds to an MS/MS mass transition characteristic of one of the two major strigolactones produced by pea: fabacyl acetate (Xie *et al.*, 2009) and orobanchyl acetate (Yoneyama *et al.*, 2008). Two mass transitions were monitored for each strigolactone and gave a signal at the same retention time; for clarity only one transition is shown. Synthetic standards of these two strigolactones also eluted at the same retention times (data not shown), demonstrating that the monitored signals truly corresponded to strigolactones. GR24 was added in equal quantities to all samples as an external standard to visualize any possible artefacts due to sample loading or matrix effects. The signal obtained with GR24 was similar between samples, indicating that the amounts of other strigolactones in the samples could be appropriately compared. Chromatograms obtained with control LP/LP and HP/HP plants (Fig. 4) were similar to those obtained with intact plants grown under LP or HP (data not shown), and confirm the previously reported inhibitory effect of P supply on strigolactone production (Yoneyama *et al.*, 2007a, b; Lopez-Raez *et al.*, 2008). The analysis of root extracts rather than exudates led to similar observations (data not

shown), indicating that the regulation occurs at the level of strigolactone biosynthesis rather than exudation. Furthermore, the HP side of LP/HP split-root plants barely produced detectable strigolactones, and therefore behaved as an intact HP root system. In contrast, the LP side of LP/HP plants produced much less strigolactone than control LP/LP plants (Fig. 4). This indicates that the HP side of these split-root plants negatively regulated strigolactone production on the LP side through systemic signalling.

Supplementation of HP-grown plants with exogenous strigolactones

The strong down-regulation of strigolactone synthesis by HP (Fig. 4) could account for the reduced root colonization (Fig. 1) and the absence of hyphal branching activity of root exudates (Fig. 2) observed under these conditions. To address this hypothesis, HP-grown plants were supplemented with exogenous strigolactones. The experimental conditions used (treatment with the synthetic strigolactone GR24, concentration and frequency of application) were previously demonstrated to be effective since they could rescue the mycorrhizal phenotype of strigolactone-deficient mutants (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). This strigolactone treatment was also sufficient to enhance mycorrhizal symbiosis establishment in LP-grown plants inoculated with *Gl. intraradices* (Fig. 5). Surprisingly, root colonization of HP-grown plants was not improved by strigolactone supplementation. Similar observations were made for HP-grown plants inoculated

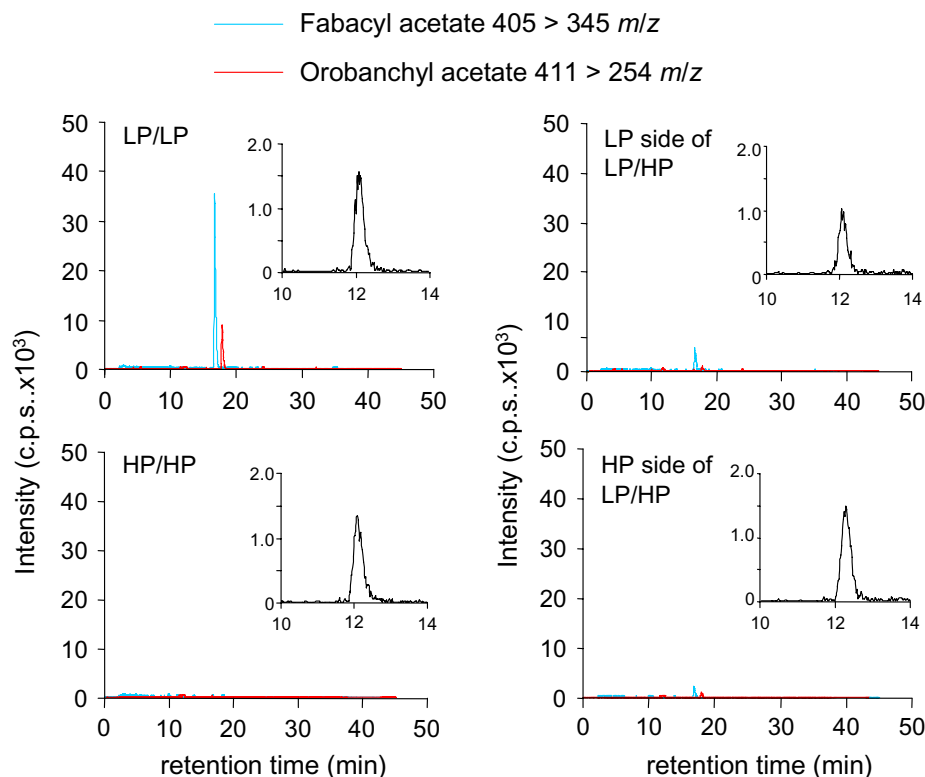


Fig. 4. Systemic control of strigolactone production. Split-root plants were fertilized with low phosphorus (LP) on one side and high phosphorus (HP) on the other (LP/HP plants), or with the same solution on both sides (LP/LP and HP/HP plants). Root exudate extracts were analysed by LC-MS/MS in the MRM mode. The synthetic strigolactone analogue GR24 was added in equal quantity to all samples as an external standard. Chromatograms show the most abundant mass transition for each of the two major pea strigolactones, fabacyl acetate and orobanchyl acetate. Insets show the mass transition corresponding to the external standard GR24 (299>202 m/z).

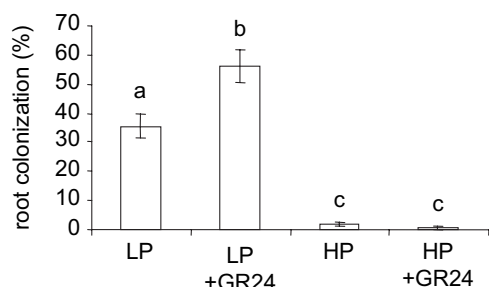


Fig. 5. Effect of strigolactone supplementation on root colonization. Plants inoculated with 150 spores of *Gl. intraradices* were fertilized daily with LP or HP nutrient solution, supplemented or not with 10 nM GR24. The extent of root colonization was determined by observation of stained root samples. Error bars show the SEM; $n=7-8$ plants for each condition. Different letters indicate statistically significant differences according to one-way ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$).

with *Gi. rosea* (data not shown). Strigolactone treatment did not stimulate the formation of hyphopodia on HP-grown roots either: 5.0 ± 1.7 hyphopodia m^{-1} of root were observed in treated roots versus 6.7 ± 1.7 in untreated roots in plants inoculated with *Gl. intraradices*, and 6.04 ± 1.31 in treated roots versus 10.2 ± 3.94 in untreated roots in plants inoculated with *Gi. rosea*.

Discussion

HP supply can strongly inhibit AM symbiosis

The regulation of AM symbiosis by P supply has been observed repeatedly and is considered a general phenomenon. In contrast to most previous studies, however, the experimental conditions described in the present report lead to a clear-cut mycorrhizal phenotype under HP supply, since hardly any symbiotic structures are observed (Fig. 1). Similar effects of HP were observed with 150 and 600 *Glomus* spores per plant (Fig. 5 and Fig. 1, respectively), indicating that a higher inoculum density was not able to circumvent the regulatory mechanisms. The discrepancy between the strong mycorrhizal phenotype reported here and the more moderate effects of P reported previously may relate to the plant species used, and/or to the experimental conditions: in this study, P was supplied daily in the nutrient solution, and plants were inoculated with spores rather than fragments of infected roots containing different kinds of propagules. Inoculation with spores, often regarded as less virulent, probably helps to reveal moderate phenotypes that could be masked with stronger sources of inoculum. For example, the *pmil* mutant of tomato exhibits a severe phenotype when inoculated with spores, but is colonized normally when inoculated with mycorrhizal nurse plants (David-Schwartz *et al.*, 2001).

The effect of HP supply on AM symbiosis is partly mediated by the plant

Among the conditions tested, plant growth was maximal under HP conditions (Supplementary Table S1 at *JXB* online), which correspond to a moderate P supply (750 μM): in studies on P starvation responses, the P-replete condition usually falls in the 1–3 mM range [e.g. Bonser *et al.* (1996) on pea; Valdes-Lopez *et al.* (2008) on bean; Pant *et al.* (2008) on *Arabidopsis*]. The HP nutrient solution does not exhibit toxicity towards the fungal partner, as evaluated by spore germination tests. It also does not seem to modify the ability of the fungus to respond to strigolactones (Supplementary Fig. S1). In addition, in split-root experiments the inhibition of root colonization can be observed in a compartment where the fungus is only exposed to LP (Fig. 3). This regulation of AM symbiosis through systemic signalling is consistent with previous reports (e.g. Thomson *et al.*, 1991; Rausch *et al.*, 2001). It shows that the very strong inhibition of root colonization triggered by HP in the present report involves plant-driven processes and is not only due to a direct effect of local P concentration on the fungus. Yet, the existence of such direct effects cannot be excluded.

HP supply arrests AM symbiosis in its first stages

Microscopic examination of root samples revealed that HP fertilization reduced the number of hyphopodia formed on the root epidermis. This represents a novel HP-related mycorrhizal phenotype. A straightforward interpretation is that HP prevents hyphopodium formation *per se*. Alternatively, one could imagine that defects in later symbiotic stages could also lead to a reduced number of hyphopodia; for example, an impaired progression of the fungus within roots could delay or reduce the number of secondary infection events, which would in turn result in a smaller number of attached external hyphae. Several arguments lead us to conclude that the block in AM symbiosis triggered by HP occurs prior to primary hyphopodium formation, rather than later in the symbiotic process. First, the steps of clearing and staining the roots prior to microscopic observation were performed with particular care to prevent possible stripping and loss of hyphopodia (particularly those that did not lead to root colonization). Second, similar observations were made at 4 and 6 wpi (Table 1). The first time point (4 wpi) corresponds to the very beginning of the infection process, when the first arbuscules become visible (<5% root length colonized). Hyphopodia observed at this time point therefore most probably derived from primary hyphae of germinated spores, rather than from secondary infections. At this time point, a very strong effect of HP fertilization was already noted. Third, mutants affected in later stages of the interaction typically exhibit a normal (sometimes even higher) number of hyphopodia (Bradbury *et al.*, 1991; Bonfante *et al.*, 2000). Therefore, the present observations strongly suggest that HP

conditions prevent either pre-symbiotic fungal development or attachment to roots.

In contrast to the formation of appressoria by pathogenic fungi, the differentiation of these attachment and penetration structures by AM fungi is still poorly understood. Plants grown under HP are reminiscent of tomato *pmi1* and *pmi2* (David-Schwartz *et al.*, 2001, 2003), and maize *nopel* and *tacil* mutants (Paszkowski *et al.*, 2006), in which a reduced frequency of hyphopodia was observed. Unfortunately the genes affected by these mutations have not been identified yet. Nonetheless these mutants, together with the HP conditions described in the present report, should be useful to decipher the mechanisms involved in hyphopodium differentiation.

Different kinds of mechanisms could regulate the formation of hyphopodia under HP. One of them is the production by plant roots of stimulatory or inhibitory diffusible compounds. Candidate compounds include flavonoids, some of which have been reported to stimulate AM root colonization by enhancing the number of fungal entry points (Scervino *et al.*, 2007). Polyamines have also been proposed to favour the formation of hyphopodia (El Ghachtouli *et al.*, 1995). P availability also affects the production of compounds known to affect fungal development more generally (reviewed in Vierheilig, 2004), but in most instances their contribution to the regulation of AM symbiosis by P has not been tested functionally. An exception is the report by Akiyama *et al.* (2002) that a C-glycosylflavonoid accumulated in melon roots upon P starvation, and that supplementation with this compound restored normal mycorrhizal rates under HP. The reduced accumulation of this compound may therefore account for the decreased root colonization under HP. In contrast to the present report, however, the effects of HP were not observed in the first visible stages of the interaction. Two time points were examined by Akiyama *et al.* (2002): 25 d and 45 d post-inoculation (dpi). At 25 dpi, the root colonization levels were similar under LP and HP. HP triggered down-regulation of AM symbiosis only at 45 dpi. In agreement with this, an AM-stimulating effect of the C-glycosylflavonoid on HP-grown plants was only observed at 45 dpi. In contrast, in the present conditions the negative impact of HP on root colonization could be observed as soon as the control roots became colonized (28 dpi, Table 1). Therefore, the mechanisms underlying suppression of AM symbiosis by HP may be different in the two systems. In addition, different plant species produce distinct arrays of flavonoids, making it difficult to extrapolate results from one species to another. Still, flavonoids remain interesting candidates as mediators of the P effect.

In the present experimental system, branching bioassays supported the hypothesis of an effect of P on pre-symbiotic fungal development, since root exudate extracts of HP-grown plants failed to stimulate hyphal branching (Fig. 2). These extracts did not inhibit the effect of GR24 on the fungus, and therefore appeared to lack branching stimulants that are present in exudates of LP-grown plants. It must be noted, however, that in these experiments ethyl

acetate extracts of root exudates were used in order to allow an adequate concentration of the samples. Therefore, it cannot be excluded that in addition to the lack of stimulants in the organic fraction, fungal inhibitors could be found in the aqueous fraction of HP root exudates.

Another possible type of regulatory process is the display of signals on the root epidermal surface. For example, AM fungal hyphae can recognize specific patterns displayed by epidermal cells and differentiate hyphopodia on cell wall fragments of the epidermis, but not of other root tissues (Nagahashi and Douds, 1997). In addition, hyphopodia are formed on grooves between adjacent epidermal cells rather than on the outer cell wall. Interestingly, cell walls in these grooves appear thinner, looser, and richer in non-esterified pectin as compared with the tangential walls of epidermal cells (Bonfante *et al.*, 2000). Whether such changes in cell wall composition contribute to the effect of HP on the formation of hyphopodia deserves further investigation.

P supply affects strigolactone production in a systemic manner

Strigolactones, identified as important contributors to the effect of host roots on pre-symbiotic fungal growth and metabolism (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006, 2008), were obvious candidates to mediate the effect of P supply because their synthesis is known to correlate inversely with P supply (Yoneyama *et al.*, 2007a, b; Lopez-Raez *et al.*, 2008). In agreement with this, strigolactones were undetectable in root exudates of plants grown under HP. Furthermore, HP supply was able to down-regulate strigolactone production in a systemic manner, as evidenced by the analysis of split-root plants (Fig. 4). This novel finding is particularly interesting in the context of the hormonal function of strigolactones. Indeed, a recent study has proposed that strigolactones mediate the tillering response to P starvation in rice (Umehara *et al.*, 2010). In addition to the effect of strigolactones on lateral bud outgrowth, a role in the control of root architecture has recently been suggested (Koltai *et al.*, 2009). This raises the possibility that P supply on one side of a plant affects development of a distant part of the root system through a modulation of strigolactone synthesis. It is already known that modifications of root architecture in response to P availability are integrated at the whole-plant level (Williamson *et al.*, 2001), and it would be worth investigating the contribution of strigolactones to this phenomenon.

The analysis of Pi contents in root and shoot tissues of split-root plants (Fig. 3C, D) revealed that root colonization levels and strigolactone production were linked to shoot Pi rather than to external P availability or local Pi concentrations in roots. This is consistent with the fact that HP exerts a dominant effect over LP in LP/HP split-root plant with regards to mycorrhizal and strigolactone exudation responses, and also with regards to Pi content (in LP/HP plants shoot Pi contents are similar to those of HP/HP plants). However, the signal underlying this systemic signalling remains unknown. Branscheid *et al.* (2010) pro-

posed that the microRNA miR399 could act as a P starvation-induced signal to stimulate AM symbiosis under low P. MiR399 is known to accumulate in shoots under P deprivation, and to be transported to roots where it targets *PHO2*, a negative regulator of several P starvation responses (Lin *et al.*, 2008; Pant *et al.*, 2008). Interestingly, miR399 expression responded to AM root colonization, but over-expression of miR399 was not sufficient to improve AM root colonization under HP (Branscheid *et al.*, 2010), suggesting that additional internal signals are required. Other micro-RNAs expressed in response to AM colonization and/or P supply (Gu *et al.* 2010) may be alternative candidates as systemic signals.

Strigolactones are not solely responsible for P-triggered down-regulation of AM symbiosis

The putative role of strigolactones as mediators of the P effect on AM symbiosis was supported by the good correlation between mycorrhizal colonization and strigolactone exudation in split-root plants (Figs 3, 4). Supplementation with exogenous GR24, however, failed to restore AM symbiosis in HP-grown plants (Fig. 5). These novel results rule out the proposed hypothesis that HP-grown plants are poorly colonized by AM fungi simply because they do not produce strigolactones (Yoneyama *et al.*, 2007b; Lopez-Raez *et al.*, 2008). Although a role for strigolactones in the process is still possible and indeed likely, additional mechanisms remain to be discovered. This is consistent with the proposition that hyphal branching is a complex response involving several classes of compounds (Nagahashi and Douds, 2007). The present observations do not imply, however, that the absence of additional stimulatory compounds in HP root exudates is the only explanation for the lack of root colonization under HP.

An additional possibility is that the hormonal function of strigolactones (rather than their role as rhizospheric signals) is involved in the regulation of AM symbiosis, for example by influencing root development or the ability of root cells to accommodate AM fungi. This question was not addressed in the present study, and the concentration of GR24 necessary to restore the putative hormonal function(s) of strigolactones in roots is not known. Nevertheless, the hypothesis of a strigolactone requirement at the plant hormonal level is not supported by previous observations that strigolactone-deficient mutants could still be slightly colonized by AM fungi (Gomez-Roldan *et al.*, 2008).

As determined by hyphal branching bioassays, HP conditions do not seem to prevent the stimulation of the fungus by strigolactones. The combination of HP root exudates with GR24 results in an activity similar to that of LP root exudates (Fig. 2). This suggests that hyphal branching and associated metabolic processes are restored in the supplementation experiment (HP+GR24) described in Fig. 5. The observation that this is not sufficient to allow root colonization by the fungus or the formation of hyphopodia points towards an effect of HP on steps other

than hyphal branching, possibly including the differentiation of hyphopodia.

Conclusion

Collectively, the various reports on the down-regulation of AM symbiosis by P suggest that several successive layers of control operate in roots grown under HP. The experimental conditions used by different authors shed light on one or the other of these control mechanisms. Those described in this report allow the manipulation of mycorrhizal symbiosis by targeting some of the first events in the interaction, and the testing of a number of hypotheses related to these events. It is demonstrated for the first time that the regulation of AM symbiosis by P is accompanied by a systemic regulation of strigolactone production, an important observation with regards to the hormonal function of these compounds. The decreased strigolactone content under HP, however, does not solely account for the strong mycorrhizal phenotype. The results therefore suggest the existence of additional early signalling events, some of which probably affect the differentiation of hyphopodia. A better understanding of this regulation should reveal important mechanisms required for the symbiosis under favourable conditions, and help circumvent the limitations for this symbiosis associated with the extensive use of P fertilizers in agriculture.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Figure S1. Effect of phosphate concentration on *Gi. rosea* hyphal branching responsiveness to GR24.

Table S1. Effect of phosphate fertilization on shoot and root fresh weight.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Koichi Yoneyama (Utsunomiya University, Japan) for the gift of synthetic standards of orobanchyl acetate and fabacyl acetate, and Dr Christian Brière (CNRS, Toulouse, France) for advice on statistical analyses. This study was partly funded by ASEDIS-SO, Toulouse, France. The Q Trap mass spectrometer was made available to us by the Metabolomics and Fluxomics platform of Toulouse (MetaToul).

References

- Akiyama K, Matsuoka H, Hayashi H.** 2002. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 334–340.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H.** 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827.
- Bécard G, Fortin JA.** 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**, 211–218.
- Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N.** 2008. GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* **148**, 402–413.
- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N.** 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* **4**, e226.
- Bonfante P, Genre A, Faccio A, Martini I, Schauser L, Stougaard J, Webb J, Parniske M.** 2000. The *Lotus japonicus* LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 1109–1120.
- Bonser AM, Lynch J, Snapp S.** 1996. Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* **132**, 281–288.
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G.** 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* **12**, 224–230.
- Bradbury SM, Peterson RL, Bowley SR.** 1991. Interactions between three alfalfa nodulation genotypes and two *Glomus* species. *New Phytologist* **119**, 115–120.
- Branscheid A, Sieh D, Pant BD, May P, Devers EA, Elkrog A, Schauser L, Scheible WR, Krajinski F.** 2010. Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 915–926.
- Bucher M.** 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* **173**, 11–26.
- Buée M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G.** 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 693–698.
- Collins CD, Foster BL.** 2009. Community-level consequences of mycorrhizae depend on phosphorus availability. *Ecology* **90**, 2567–2576.
- David-Schwartz R, Badani H, Smadar W, Levy AA, Galili G, Kapulnik Y.** 2001. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae. *The Plant Journal* **27**, 561–569.
- David-Schwartz R, Gadkar V, Wininger S, Bendov R, Galili G, Levy AA, Kapulnik Y.** 2003. Isolation of a premycorrhizal infection (*pmi2*) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 382–388.
- Douds DD, Galvez L, Bécard G, Kapulnik Y.** 1998. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytologist* **138**, 27–35.
- El Ghachtouli N, Paynot M, Morandi D, Martin-Tanguy J, Gianinazzi S.** 1995. The effect of polyamines on endomycorrhizal infection of wild-type *Pisum sativum*, cv. Frisson (*nod⁺myc⁺*) and two mutants (*nod⁻myc⁺* and *nod⁻myc⁻*). *Mycorrhiza* **5**, 189–192.

- Elias KS, Safir GR.** 1987. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 1928–1933.
- Garriock ML, Peterson RL, Ackerley CA.** 1989. Early stages in colonization of *Allium porum* (leek) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*. *New Phytologist* **112**, 85–92.
- Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S.** 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* **7**, 243–255.
- Giovannetti M, Mosse B.** 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist* **84**, 489–500.
- Giovannetti M, Sbrana C, Citernesi AS, Avio L.** 1996. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **133**, 65–71.
- Gomez-Roldan V, Femas S, Brewer PB, et al.** 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194.
- Graham JH, Leonard RT, Menge JA.** 1981. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiology* **68**, 548–552.
- Gu M, Xu K, Chen A, Zhu Y, Tang G, Xu G.** 2010. Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia Plantarum* **138**, 226–237.
- Gutjahr C, Novero M, Guether M, Montanari O, Udvardi M, Bonfante P.** 2009. Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* induce starch accumulation in *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist* **183**, 53–61.
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J.** 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell* **14**, 2413–2429.
- Hewitt EJ.** 1966. *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*, 2nd edn. London: Commonwealth Agricultural Bureau.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ.** 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* **30**, 310–322.
- Johnson NC.** 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* **3**, 749–757.
- Koltai H, Dor E, Hershenhorn J, et al.** 2009. Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 129–136.
- Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Bécard G.** 2003. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131**, 952–962.
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GE.** 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 9823–9828.
- Lin S-I, Chiang SF, Lin W-Y, Chen J-W, Tseng CY, Wu PC, Chiou T-J.** 2008. Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology* **147**, 732–746.
- López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, et al.** 2008. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist* **178**, 863–874.
- Marsh JF, Schultze M.** 2001. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist* **150**, 525–532.
- Nagahashi G, Douds DD.** 1997. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* **136**, 299–304.
- Nagahashi G, Douds D Jr.** 2007. Separated components of root exudate and cytosol stimulate different morphologically identifiable types of branching responses by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **111**, 487–492.
- Nagy R, Drissner D, Amrhein N, Jakobsen I, Bucher M.** 2008. Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated. *New Phytologist* **181**, 950–959.
- Nair MG, Safir GR, Siqueira JO.** 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 434–439.
- Nanamori M, Shinano T, Wasaki J, Yamamura T, Rao IM, Osaki M.** 2004. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in the tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. *Plant and Cell Physiology* **45**, 460–469.
- Navazio L, Moscattiello R, Genre A, Novero M, Baldan B, Bonfante P, Mariani P.** 2007. A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiology* **144**, 673–681.
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C.** 2005. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* **44**, 195–207.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR.** 2008. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *The Plant Journal* **53**, 731–738.
- Parniske M.** 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 763–775.
- Paszkowski U, Jakovleva L, Boller T.** 2006. Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* **47**, 165–173.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP.** 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 13324–13329.
- Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, Harrison MJ.** 2009. *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* **61**, 482–494.

- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M.** 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**, 462–470.
- Requena N, Breuninger M, Franken P, Ocón A.** 2003. Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* **132**, 1540–1549.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Bompadre J, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A.** 2007. The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomus*. *Canadian Journal of Microbiology* **53**, 702–709.
- Siqueira JO, Safir GR, Nair MG.** 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist* **118**, 87–93.
- Smith SE, Read D.** 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. London: Academic Press.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I.** 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* **133**, 16–20.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA.** 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**, 328–332.
- Thomson BD, Robson AD, Abbott LK.** 1986. Effects of phosphorus on the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* in relation to root carbohydrates. *New Phytologist* **103**, 751–765.
- Thomson BD, Robson AD, Abbott LK.** 1991. Soil mediated effects of phosphorus supply on the formation of mycorrhizas by *Scutellispora calospora* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders on subterranean clover. *New Phytologist* **118**, 463–469.
- Tsai SM, Phillips DA.** 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1485–1488.
- Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N, Yamaguchi S.** 2010. Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1118–1126.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, et al.** 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200.
- Valdés-López O, Arenas-Huertero C, Ramírez M, Girard L, Sánchez F, Vance CP, Luis Reyes J, Hernández G.** 2008. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, Cell and Environment* **31**, 1834–1843.
- Vierheilig H.** 2004. Regulatory mechanisms during the plant–arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany* **82**, 1166–1176.
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y.** 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 5004–5007.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 1385–1393.
- Williamson LC, Ribrioux SP, Fitter AH, Leyser HM.** 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 875–882.
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2009. Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **70**, 211–215.
- Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K.** 2007a. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**, 125–132.
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K.** 2008. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytologist* **179**, 484–494.
- Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H.** 2007b. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**, 1031–1038.
- Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ.** 2010. Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell* **22**, 1483–1497.

The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events

Coline Balzergue, Virginie Puech-Pagès, Guillaume Bécard & Soizic F. Rochange

Table S1. Effect of phosphate fertilization on shoot and root fresh weight.

Plants inoculated with spores of *Gl. intraradices* were grown under Low P (7.5 μ M), Medium P (75 μ M), or High P (750 μ M) conditions. Following plant harvest, root and shoot fresh weights were determined. n=5-6 plants for each condition. Different letters indicate statistically significant differences according to one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

	Shoots		Roots	
Low P	9.82 +/- 0.97	a	11.58 +/- 1.28	a
Medium P	14.27 +/- 2.16	ab	20.80 +/- 2.94	ab
High P	39.72 +/- 14.21	b	25.18 +/- 8.43	b

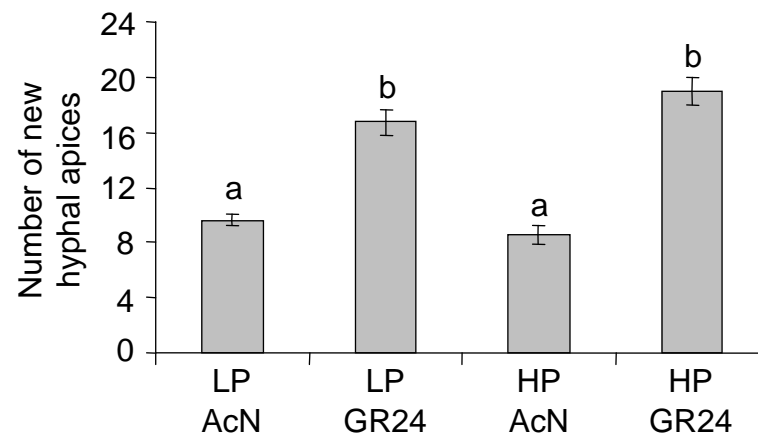


Figure S1. Effect of phosphate concentration on *Gi. rosea* hyphal branching responsiveness to GR24.

Spores of *Gi. rosea* germinated on Low P or High P medium were treated with 100 nM GR24 or with the solvent alone as negative control (10% acetonitrile, AcN). Newly formed hyphal apices were counted 48h after treatment. Error bars show s.e.m., n=38-56 treated spores for each condition. Different letters indicate statistically significant differences according to Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

Metabolite profiling of pea roots in response to phosphate availability

Jérôme Laparre,^{1,5} Coline Balzergue,^{1,2} Soizic Rochange,^{1,2} Pascal Ludwiczak,^{3,5} Fabien Letisse,^{3,5} Jean Charles Portais,^{3,5} Guillaume Bécard^{1,2} and Virginie Puech-Pages^{1,2,*}

¹Université de Toulouse; UPS; UMR 5546; Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV); ²CNRS; UMR 5546; BP 42617; ³Université de Toulouse; INSA; UPS; INP; LISBP; Toulouse, France; ⁴INRA; UMR792; Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés; Toulouse, France; CNRS; INRA; Toulouse, France; ⁵CNRS; UMR5504; Toulouse, France

Key words: arbuscular mycorrhiza, phosphorus, metabolic profiling

Abbreviations: AM, arbuscular mycorrhizal; UHPLC, ultra high performance liquid chromatography; HR, high resolution; Q-TOF, quadrupole time-of-flight; MS, mass spectrometry; S/N, signal-to-noise; PCA, principal component analysis; OPLSDA, orthogonal partial least squares discriminant analysis

Submitted: 02/15/11

Accepted: 02/15/11

DOI: 10.4161/psb.6.6.15168

*Correspondence to: Virginie Puech-Pages;
Email: puech@lrsv.ups-tlse.fr

Addendum to: Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J Exp Bot* 2011; 62:1049–60. PMID: 21045005; DOI: 10.1093/jxb/erq335.

The arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is a mutualistic association between soil fungi (Glomeromycota) and roots of most plant species. A recent study showed that high phosphate fertilization could inhibit mycorrhizal colonization at a very early stage, before hyphopodium formation. The authors proposed that inhibiting and/or stimulatory compounds might be present in roots grown under high phosphate or low phosphate, respectively. To further address this question, we performed metabolite profiling analyses of extracts of pea roots grown under low and high phosphate concentrations. Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) was coupled with high resolution (HR) mass spectrometry (Q-TOF) and multivariate statistical analysis. This allowed the detection of 34 ions discriminating the two conditions. A majority (28 ions) were more abundant in roots grown under low phosphate concentration, and among them four were specific of this condition. The results suggest that the regulation of AM symbiosis by phosphate may involve the synthesis or accumulation of stimulatory compounds in roots grown under low phosphate.

In natural conditions most plants form root symbioses with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. During symbiosis AM fungi provide plants with minerals (particularly phosphate) and water, and obtain in return photoassimilates. High phosphate levels in soil are known to inhibit AM symbiosis.¹ The mechanisms underlying this downregulation have

been investigated through transcriptomic approaches.^{2,3} In addition, biochemical studies pointed towards the involvement of compounds selectively produced by roots according to phosphate availability and affecting fungal development.⁴

Recently, Balzergue et al. reported that the interaction between pea and two different AM fungi was almost completely abolished by high phosphate levels at a very early stage, prior to the formation of hyphopodia. In this experimental system, downregulation of AM symbiosis seemed to occur in response to systemic plant-derived signals rather than to local fertilization conditions, and a clear decrease of strigolactone root exudation was demonstrated. Nevertheless, supplementation experiments with exogenous strigolactones failed to restore root colonization under high phosphate. Taken together, these results suggest that the differentiation of hyphopodia is controlled by additional early molecules that could include inhibitors produced under high phosphate, and/or stimulators accumulated under low phosphate. In an attempt to investigate the identity of such molecules, we used a high resolution metabolomic profiling approach. Because roots contain a large number of metabolites with different physicochemical properties and concentrations, a global, powerful analytical approach has to be applied to maximize the number of detected compounds.

Our strategy was based on the coupling of ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) with high resolution (HR) mass spectrometry (Q-TOF), followed by multivariate statistical analysis.

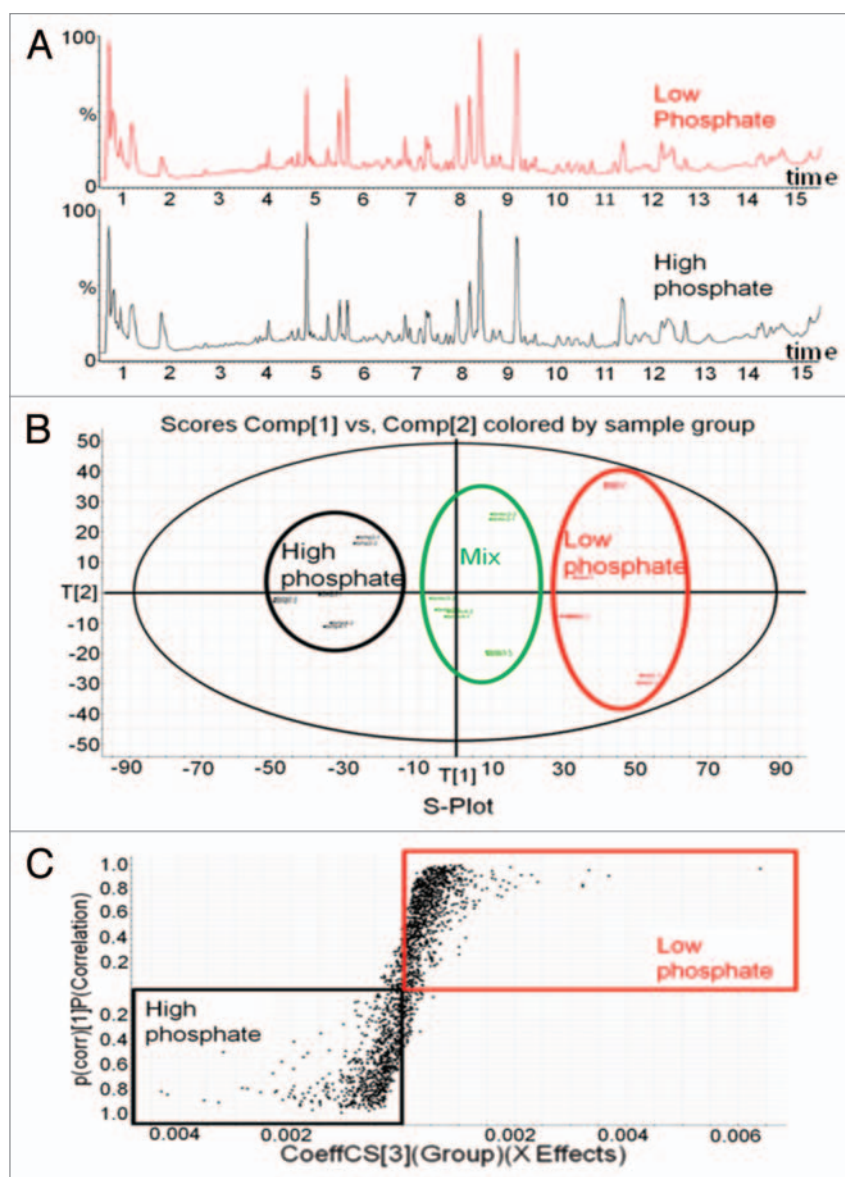


Figure 1. Metabolite profiles of methanol extracts of pea roots grown under high and low phosphate. (A) Total ion current (TIC) chromatograms in UHPLC-HR-MS (Q-TOF) of high- and low-phosphate root extracts. UHPLC separation was performed on a BEH C18 column (2.1 x 150 mm, 1.7 μ m, Waters, Manchester). A two-step gradient (acetonitrile in water containing 0.1% formic acid) was applied at a flow rate of 0.4 ml/min from 10% to 50% in 11 min and 50% to 100% in 4 min. (B) Principal component analysis of duplicates of four extracts of each condition and of an equal mix of high- and low-phosphate extracts. (C) S-plot graphical view of Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis of extracts of high- and low-phosphate conditions.

The reduced particle size (1.4–1.7 μ m) of the packing material of UHPLC allows an excellent separation. Compared to high-performance liquid chromatography (HPLC), UHPLC provides narrower peaks and better peak resolution.⁶ Coupled with UHPLC, the mass accuracy and resolution offered by high-resolution mass spectrometers provide valuable and reliable data for the discrimination of

the thousands of MS signals associated with the metabolites. Ion suppression is minimized, sensitivity and signal-to-noise (S/N) ratios are improved, relative quantification of any measurable m/z signal can be performed without compound annotation,⁷ and powerful statistical analyses can be applied.

Methanol extracts were prepared from ground roots of four batches of three

one-month-old pea plants (*Pisum sativum* L., cv Terese), grown under high or low phosphate fertilization.⁵ The selection of methanol as an extraction solvent was based on previous studies and literature data which indicate its good extraction ability for a broad spectrum of compounds, including most secondary metabolites.⁸ Root extracts were analyzed in duplicate with a UHPLC-HR-MS (Q-TOF) device (Waters, Manchester, UK), using a C18 column and an acetonitrile/water elution gradient. The metabolic profiles—i.e., the overall chromatographic trace—of roots obtained under high and low phosphate did not show major changes, indicating that the most prominent metabolites remained the same in the two conditions (Fig. 1A).

The UHPLC-HR-MS data were further processed with Marker Lynx software (Waters, Manchester, UK). Principal component analysis (PCA) showed a clear separation of two groups of ions corresponding to the metabolites produced under low and high phosphate (Fig. 1B). Such clear-cut separation could be due to analytical or data processing artifacts. To address this possibility, a 1:1 mix of the low and high phosphate samples was prepared and subjected to chromatographic analysis. The PCA identified this mix as a third group halfway between the low and high phosphate groups (Fig. 1B), establishing the reliability of the method. These results clearly confirm the occurrence of discriminating signals between the two phosphate fertilization conditions.

An Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLSDA) was carried out to highlight the discriminating ions. The results are shown as an S-plot (Fig. 1C) where the discriminating ions appear in the upper right and lower left corners of the graph. Because a particular molecular species can be detected over multiple signals (m/z) corresponding to adduct ions or in-source fragmentation, only one parent ion per retention time was kept to estimate the number of differentially accumulated compounds.

A total of 34 discriminating ions (ratio >2 between the two conditions) were detected. Most of them (28 ions) were more abundant under low phosphate and among them four were specific. No ion

was exclusively found under high phosphate. Strigolactone-related ions could not be found, most likely because their detection requires extremely sensitive methods such as the Multiple Reaction Monitoring acquisition mode.^{9,10} The discriminating compounds appear to be different from those identified by Nagahashi et al. on the basis of the corresponding ion masses (data not shown). This is not surprising since the two studies were based on very different experimental systems (pea root extracts obtained from whole plants grown under low or high phosphate vs. carrot root exudates produced by hairy roots grown with or without phosphate). In addition the present study targets more specifically early signaling events in AM symbiosis.

The present data provide preliminary evidence that the availability of phosphate in soil has a clear incidence on pea root metabolism. They highlight the potential of UHPLC-HR-MS based metabolomics as an unbiased approach to identify compounds regulating the differentiation of hyphopodia. Among the 34 discriminating ions, there are more ions (metabolites) produced under low phosphate, both

quantitatively (28 compared to four over-produced ions) and qualitatively (four compared to zero newly produced ions). These results suggest that the negative regulation of AM symbiosis under high phosphate might result from a negative regulation of stimulatory compounds, rather than from the production of inhibitors. Prior to their chemical identification, the four ions exclusively present in low phosphate will now be accumulated, collected and tested for potential activity as positive regulators of the AM symbiosis.

Acknowledgements

Laparré J. was supported by a University of Toulouse Ph.D. fellowship. The mass spectrometry devices were made available to us by the Institut des Technologies Avancées du Vivant and the MetaToul Platform (Toulouse, France). We thank Saida Danoun and Sylvie Fournier for providing technical expertise and assistance for LC MS analysis.

References

1. Smith SE, Read D. Mycorrhizal Symbiosis. London: Academic Press 2008; 3.
2. Harrison MJ. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 2005; 59:19-42.
3. Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druege U, et al. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant J* 2010; 64:1002-17.
4. Nagahashi G, Douds DD, Ferhatoglu Y. Functional categories of root exudate compounds and their relevance to AM fungal growth. In: Koltai H, Kapulnik Y, Eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, 2nd Ed. New York: Springer 2010; 33-56.
5. Balzergue C, Puech-Pages V, Bécard G, Rochange SF. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J Exp Bot* 2011; 62:1049-60.
6. Buescher JM, Moco S, Sauer U, Zamboni N. Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Anal Chem* 2010; 82:4403-12.
7. Toh DF, New LS, Koh HL, Chan EC. Ultra-high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (uhplc/tofms) for time-dependent profiling of raw and steamed panax notoginseng. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52:43-50.
8. Lu W, Kimball E, Rabinowitz JD. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17:37-50.
9. Gomez-Roldan V, Fremas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 2008; 455:189-94.
10. Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, et al. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol* 2008; 179:484-94.

Annexe 3 : Gènes utilisés pour le Fluidigm®.

Catégories

- Gènes référence
- Intron
- Gènes fongiques
- Marqueurs phosphate
- Marqueurs défense
- Marqueurs symbiose
- Hormones

- Les gènes sont rangés par catégories (code couleur).
- Les triangles noirs indiquent les gènes qui n'étaient pas exprimés ou pour lesquels l'efficacité était trop mauvaise pour être analysés (16 gènes).
- Les triangles rouges indiquent les gènes dont l'expression n'a été affectée par aucun des traitements réalisés (25 gènes).

	Nom / gène	ID séquence	Sources de la séquence du gène ou des amorces
Références	Ubiquitine	MtC00117.1_GC	Mbengue_2010
	EF1a	TC201428 Medtr4g097170	Maillet_2011
	Helicase	MtD35391_GC	Mbengue_2010
	PDF2	TC107161	Kakar_2008
	PPRrep	TC96273	Kakar_2008
	Intron4 HAP2a	EF488826.1	Jean-Philippe Combier + Andreas Niebel
	Glomus alpha_tubulin	CACE 118.b2	Mathilde Malbreil, <i>Rirregularis</i> expression gènes
	Glomus Chitin synthase	CACE 12689_b1	Mathilde Malbreil, <i>Rirregularis</i> expression gènes
Nutrition phosphate	MtPT1	gi 2465526 gb AF000354.1 MTAF000354	Liu_1998 + Liu_2008
	MtPT2 ▲	gi 2465528 gb AF000355.1 MTAF000355	Liu_1998 + Liu_2008
	MtPT3	gi 22939026 gb EF016358.1	Grunwald_2009 + Liu_2008
	MtPT4	MTGI7-TC85743 Mtr.43062.1S1_at	Harrison_2002
	MtPT5	gi 22939028 gb EF016359.1	Grunwald_2009 + Liu_2008
	MtPT6	gi 183579808 emb AM982728.1	Grunwald_2009
	MtPHR1		Branscheid_2010
	MtPHO2	TC115486 Medtr2g013650	Branscheid_2010
	Mt4	gi 2231317 gb U76742.1 MTU76742	Branscheid_2010
	MtSpx ▲	TC128417 TC95701	Branscheid_2010
	MtUn ▲	TC185665	Branscheid_2010
	miR399b ▲		Branscheid_2010
	miR399h ▲		Branscheid_2010
	miR399j ▲		Branscheid_2010
Défense	CAD	Mtr.27096.1S1_at = MTGI9-AW559294	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	IsoFR = Isoflavone reductase	mtr.24231.1s1_at = MTGI9-TC113385	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	AnioP = anionic peroxidase	Mtr.35324.1s1_at = MTGI9-CX549670	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	Prot I = protease inhibitor	Mtr.14224.1s1_at = MTGI9-TC130660	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	ATGSTU8	Mtr.38111.1s1_at = MTGI9-TC123357	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	PAL = Phe ammonia lyase 1 ▲	Mtr.38612.1s1_at = MTGI9-TC122898	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	Thaumatine	Mtr.9569.1S1_at = MTGI9-TC126941	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	VesRe = Vestitone reductase ▲	MT015405 = MTGI9-TC116846	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	CSS = Chalcone Stilbene Synthase	MTGI9-TC120398 Mtr.17621.1S1_x_at	Thomas Rey, Amaury Nars (LRSV)
	ERF19	MTGI9-TC118268 Mtr.43313.1S1_at	Silke Klopffholz_2011
	PR10	MTGI9-TC118268 Mtr.43313.1S1_at	Silke Klopffholz_2011
	MtChitinase I	AF167322	Salzer_2000 + Elfstrand_2005
	MtChitinase II ▲	AF167323	Salzer_2000 + Elfstrand_2005
	MtChitinase III-1 ▲	AF167324 TC173366	Salzer_2000 + Elfstrand_2005
	MtChitinase III-2 ▲	AF167325	Salzer_2000 + Elfstrand_2005
	MtChitinase III-3	AF167326	Salzer_2000 + Elfstrand_2005
	MtChitinase III-4	AF167327	Salzer_2000 + Elfstrand_2005
	MtChitinase IV ▲	AF167328	Salzer_2000 + Elfstrand_2005
Strigo	PDR 32084	Mtr.32084.1S1_at AW287942	Jean-Philippe Combier (LRSV) + Kretschmar_2012
	PDR 2427	Mtr.2427	Jean-Philippe Combier (LRSV) + Kretschmar_2012
	CCD7	Mtr.32038.1S1_at MTR_7g045370	Liu_2011 + rapport stage Emilie Jamans
	CCD8	Mtr.1606.1S1_at	Liu_2011 + rapport stage Emilie Jamans
	DWARF 27 ▲	Mtr.4797.1S1_s_at	Liu_2011
	MAX 1 ▲	Mtr.12616.1S1_at MTGI9-TC113506	Liu_2011
Autres	CYCB1 ▲	MTR_5g088980	
	Mt RR1 ▲	TC95950	Gonzalez-Rizzo_2006
	Mt RR4 ▲	TC103991	Gonzalez-Rizzo_2006
	Mt HK3	TC105228	Gonzalez-Rizzo_2006
	Mt EFD	TC81407 TC131878	Vernié_2008

Annexe 3 (suite) : Gènes utilisés pour le Fluidigm®.

Catégories

- Gènes référence
- Intron
- Gènes fongiques
- Marqueurs phosphate
- Marqueurs défense
- Marqueurs symbiose
- Hormones

- Les gènes sont rangés par catégories (code couleur).
- Les triangles noirs indiquent les gènes qui n'étaient pas exprimés ou pour lesquels l'efficacité était trop mauvaise pour être analysés (16 gènes).
- Les triangles rouges indiquent les gènes dont l'expression n'a été affectée par aucun des traitements réalisés (25 gènes).

	Nom / gène	ID séquence	Sources de la séquence du gène ou des amorces
	MSBP1 ▲	MTR_6g054890 TC106972	Kuhn_2010 + Liu_2007
	TC106351 ▲	Mtr.16454.1S1_at	Kuhn_2010 + Liu_2007
	TC107197	Mtr.10562.1S1_at MTGI9-TC136093	Kuhn_2010 + Liu_2007
	TC112474 ▲	?	Kuhn_2010 + Liu_2007
Réponse Myc-LCO	37912	Mtr.37912.1S1_at MTGI9-TC122080	Maillet_2011 + Liu_2011
	35524	Mtr.35524.1S1_at MTGI9-TC139078	Maillet_2011
	ENOD11 ▲	Mtr.13473.1S1_at	Christine Hervé (LIPM)
	135762	Mtr.35511.1S1_at MTGI9-TC135762	Céline Camps (LIPM)
	16843	Mtr.7546.1S1_at	Céline Camps (LIPM)
	160016 ▲	Mtr.39333.1S1_at	Céline Camps (LIPM)
	Vapryrin	Mtr.42828.1S1_at GQ423209.1	Pumplin_2009 + Céline Camps (LIPM)
	NIN	Mtr.28094.1S1_at MTR_5g099060	Hirsch_2009 + Céline Camps (LIPM)
	142502 ▲	Mtr.16214.1S1_at TC142502	Céline Camps (LIPM)
	15591	Mtr.46524.1S1_at TC15591	Céline Camps (LIPM)
	156,1	Mtr.156.1S1_at TC14681 MT004625	Maillet_2011 + Hohnjec_2005 + Gomez_2009
	38167	Mtr.38167.1S1_at MTGI9-TC125698	Maillet_2011
	52092	Mtr.52092.1S1_s_at TC140439	Damien Fomey (LRSV) + Céline Camps (LIPM)
	12833	Mtr.12833.1S1_at MTGI10-TC146803	Damien Fomey (LRSV) + Liu_2011
	38949	Mtr.38949.1S1_at MTGI9-TC128211	Maillet_2011
	40156	Mtr.40156.1S1_at MTGI9-TC127442	Maillet_2011
	40700 ▲	Mtr.40700.1S1_at MTGI9-TC120449	Maillet_2011
Voie SYM	MtNFP ▲	DQ496250	sequence NCBI DQ496250
	MtNSP1 ▲	Medtr8g020840	
	MtNSP2 ▲	AJ832138	Jean-Philippe Combier (LRSV) + Hirsch_2009
	MtIPD3 ▲	TC113607 gij125503219	Messinese_2007 + Ovchinnikova_2011 + Horváth_2011
	MtDMI3 ▲	TC158594 Medtr8g043970	Messinese_2007 + Ovchinnikova_2011 + Horváth_2011
	MtPUB1	Mtr.26500.1S1_at BK007068.1	Mbengue_2010 + Céline Camps (LIPM)
	miR171h ▲	mtr-MIR171h MI0018372	Jean-Philippe Combier (LRSV) + Jagadeeswaran_2009
	miR171b	mtr-MIR171b MI0005580	Jean-Philippe Combier (LRSV)
	MtHAM1 ▲	TC120849	Jean-Philippe Combier (LRSV)
	MtHAM2 ▲	TC120850	Jean-Philippe Combier (LRSV)
Symbioses	MtGst1	TC85868	Branscheid_2010 + Hohnjec_2005 + Wulf_2003
	MtBcp1 ▲	TC107070 Mtr.15627.1S1_s_at	Javot_2011
	MtBcp1bis ▲	Mtr.15627.1S1_at TC88539 TC96500	Hohnjec_2005
	MtCBF1 ▲	Mtr.51511.1S1_at	Hogekamp_2011
	MtCBF2 ▲	Mtr.16863.1S1_at	Hogekamp_2011
	MtMyb1 ▲	Mtr.8863.1S1_at TC101627 TC146022	Hogekamp_2011 + Gomez_2009 + Liu_2003
	MtERN1	EU038802	Fernanda Carvalho (LIPM) + Andrianakaja_2007
	Exp-like	TC110080 EC366239	Genre_2009 + Siciliano_2007
	ACRE264 ▲	BG587245 EC366179	Genre_2009 + Siciliano_2007
	MtROP9 ▲	TC173331	Kiirika_2012
	ENOD40	Mtr.12359.1S1_at TC94515	Tom Laloum (LIPM) + Staehelin_2001
	MtCel1 ▲	AW585598 TC63534 AY308955	Liu_2003
	NPC ▲		séquence gène = Uta Paszkowski
	RAM2		séquence gène = Giles Oldroyd

Annexe 4 : Effet des différents traitements sur l'expression de gènes de défense.

A

Rapports en Log(2) (expression plantes traitées /
expression plantes témoins non traitées)

B

Rapports en Log(2)
(traitement HP/
traitement LP)

	rapport (CO4 LP /T- LP)			rapport (CO4 HP /T- HP)			CO4 HP/ CO4 LP		
	4h	12h	24h	4h	12h	24h	4h	12h	24h
CAD	-0,04	0,18	-0,32	-0,17	-0,04	0,86	-0,13	-0,22	1,18
ProtI	0,69	0,25	-0,28	0,00	-0,03	0,38	-0,69	-0,28	0,65
AnioP	0,72	0,32	-0,71	-0,09	0,30	0,78	-0,82	-0,02	1,49
GSTU8	0,02	0,28	-0,67	0,13	0,07	1,00	0,11	-0,21	1,67
PAL	0,02	0,25	-0,31	0,28	-0,30	0,61	0,27	-0,55	0,92
Thaum	0,03	0,84	-0,97	-0,14	-0,34	1,35	-0,17	-1,18	2,08
CSS	0,32	0,57	0,10	-0,01	0,13	0,70	-0,33	-0,44	0,85
PR10	0,06	0,62	-0,61	-0,06	-0,02	1,10	-0,12	-0,64	1,71
Chit-I	0,25	0,34	-0,38	-0,16	-0,10	0,13	-0,41	-0,44	0,51
Chit-II	-0,28	0,15	-0,15	-0,69	-0,18	0,43	-0,42	-0,33	0,57
Chit-III-1	0,37	0,02	-0,01	-0,08	-0,04	0,22	-0,45	-0,06	0,23
Chit-IV	0,72	1,08	-0,57	0,86	0,18	1,56	0,14	-0,89	2,13
	rapport (MycLCO LP /T- LP)			rapport (MycLCO HP /T- HP)			Myc LCO HP/ Myc LCO LP		
	4h	12h	24h	4h	12h	24h	4h	12h	24h
CAD	-0,11	0,32	0,51	-0,26	0,38	0,97	-0,14	0,06	0,73
ProtI	0,57	0,43	1,03	-0,20	0,28	0,64	-0,77	-0,15	-0,27
AnioP	0,56	-0,46	0,88	0,61	0,66	1,14	0,06	1,12	0,44
GSTU8	0,06	0,87	1,11	-0,17	0,82	1,16	-0,23	-0,05	0,41
PAL	0,33	0,18	0,42	-0,08	0,62	0,37	-0,41	0,44	0,00
Thaum	0,48	0,95	-0,29	0,13	1,55	1,51	-0,36	0,60	1,96
CSS	0,32	0,68	1,10	0,24	0,89	1,23	-0,36	0,20	0,54
PR10	-0,02	0,56	0,65	0,04	0,59	1,37	0,06	0,02	1,03
Chit-I	0,25	0,42	0,25	-0,04	0,16	0,06	-0,29	-0,26	-0,27
Chit-II	-0,52	0,94	0,51	-1,03	0,30	0,64	-0,51	-0,65	0,34
Chit-III-1	0,04	0,32	0,59	-0,09	0,36	0,47	-0,13	0,04	0,05
Chit-IV	0,92	1,11	1,19	0,53	0,65	1,72	-0,39	-0,47	1,08
	rapport (GSE LP /T- LP)			rapport (GSE HP /T- HP)			GSE HP/ GSE LP		
	4h	12h	24h	4h	12h	24h	4h	12h	24h
CAD	0,05	1,12	0,92	0,13	1,64	1,78	0,09	0,52	0,87
ProtI	-0,03	0,35	1,71	-0,17	1,25	2,02	-0,14	0,90	0,32
AnioP	1,39	0,35	1,33	0,28	1,54	1,54	-1,16	1,39	0,22
GSTU8	0,25	1,35	1,49	0,84	1,78	1,84	0,59	0,43	0,35
PAL	0,41	0,84	0,77	0,52	1,10	1,09	0,11	0,26	0,32
Thaum	0,12	1,63	1,30	0,80	2,64	3,45	0,68	1,02	0,80
CSS	0,95	1,17	1,15	0,30	2,23	1,18	-0,65	0,92	0,25
PR10	-0,01	1,25	1,33	0,25	1,65	2,05	0,25	0,39	0,72
Chit-I	0,27	0,56	0,76	0,11	0,53	0,34	-0,16	-0,03	-0,42
Chit-II	-0,53	0,82	1,13	-0,07	0,58	1,39	0,45	-0,24	0,26
Chit-III-1	-0,05	0,59	0,72	-0,16	0,93	1,18	-0,12	0,33	0,46
Chit-IV	0,41	1,91	2,07	1,61	2,17	3,87	1,20	0,26	1,81

A : Rapport d'expression entre la condition traitée et la condition témoin non traitée correspondante : les traitements CO₄, Myc-LCO et GSE induisent l'expression de gènes marqueurs de défense*.

B : Rapport de l'effet du traitement en HighP par rapport à l'effet du traitement en LowP *.

* moyenne des rapports issus des 3 répétitions biologiques. Les données sont exprimées en Log(2), plus la case est verte et plus le gène est sous exprimé en HighP par rapport au LowP, plus elle est rouge et plus c'est exprimé en HighP par rapport au LowP.

