



Mise en évidence de l'antagonisme hypaphorine / AIA lors du développement de l'ectomycorhize *Pisolithus tinctorius-Eucalyptus globulus*

Franck Anicet Ditengou

► To cite this version:

Franck Anicet Ditengou. Mise en évidence de l'antagonisme hypaphorine / AIA lors du développement de l'ectomycorhize *Pisolithus tinctorius-Eucalyptus globulus*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2000. Français. NNT : 2000NAN10046 . tel-01747501

HAL Id: tel-01747501

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747501>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



FACULTE DES SCIENCES

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
École Doctorale Biologie Santé

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Henri Poincaré

Spécialité : Biologie Végétale et Forestière

par

Franck Anicet DITENGOU

Mise en évidence de l'antagonisme hypaphorine / AIA
lors du développement de l'ectomycorhize
Pisolithus tinctorius-Eucalyptus globulus.

Soutenue publiquement le 30 Juin 2000 devant la commission d'examen

Président : M. Jean Pierre Jacquot
Rapporteurs : M. Christian Jay-Allemand
M. Patrick Saindrenan
Examineurs : M. François Le Tacon
M. Frédéric Lapeyrie

Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1
Directeur de Recherche, I.N.R.A.-Orléans
Chargé de Recherche, C.N.R.S.-Strasbourg
Directeur de Recherche, I.N.R.A.-Nancy
Directeur de Recherche, I.N.R.A.-Nancy

BIBLIOTHEQUE SCIENCES NANCY 1

INRA

D



095 136347 0

-Équipe de Microbiologie Forestière
impenoux

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

Cette thèse est dédiée à l'ensemble de mes proches : mes amis, ma famille et plus particulièrement à ma mère, Mme MBOUMBA Françoise, la plus extraordinaire des femmes.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

Le raisonnement scientifique est nécessaire et produit une certitude rigoureuse car il fournit un lien qui, sur la base du principe de contradiction, apporte à la fois la cause de la conclusion et son universalité.

Aristote, "Les seconds analytiques"

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction de Frédéric **LAPEYRIE**, Directeur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu dans la réalisation de ce travail :

Francis **MARTIN**, Directeur de Recherches à l'INRA de Champenoux, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour l'intérêt croissant qu'il a porté à ce travail et pour les nombreuses discussions fructueuses que nous avons pu avoir au cours de ces trois années et demie.

Frédéric **LAPEYRIE** (intarissable d'idées et de suggestions) pour m'avoir orienté et supporté tout au long de cette thèse.

Jean **GARBAYE**, Denis **TAGU** et Pascale **FREY-KLETT**, chercheurs au Laboratoire qui ont toujours été disponibles et de bons conseils.

Je m'en voudrais si j'oubliais de remercier Madame Marjatta **RAUDASKOSKI**, Professeur à l'Université d'Helsinki (Finlande) qui m'a fait découvrir le monde fabuleux de l'analyse d'images et de la microscopie confocale.

Je remercie également les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse : M. Jean Pierre **JACQUOT**, M. François **LE TACON**, M. Christian **JAY-ALLEMAND** et M. Patrick **SAINDRENAN**.

Mes remerciements vont enfin à tous les membres de l'équipe de Microbiologie forestière, ingénieurs, techniciens et étudiants pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Table des abréviations

ANA : Acide α -naphtaleneacétique

ACC : Acide aminocyclopropane

TIBA : Acide triiodobenzoïque

NPA : Acide naphthylphthalamique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

U.V. : Ultra-violet

I.R. : Infra-rouge

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

RNM : Résonance magnétique nucléaire

AIA : Acide indole-3 acétique

2,4 D : Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
----------------------	----------

TABLE DES ABRÉVIATIONS	5
-------------------------------	----------

INTRODUCTION	9
---------------------	----------

A - LES MYCORHIZES, GÉNÉRALITÉS	10
I. LES ENDOMYCORHIZES À VÉSICULES ET À ARBUSCULES (VA)	10
II. LES ECTOMYCORHIZES	11
III. LES ECTENDOMYCORHIZES	13
IV. LES FONCTIONS DE LA SYMBIOSE	13
IV.1. Importance des mycorhizes pour le champignon	13
IV.2. Importance des mycorhizes pour la plante hôte	14
V. LE DÉVELOPPEMENT D'UNE ECTOMYCORHIZE : LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÉNOME	15
V.1. Le rôle des protéines pariétales fongiques : cas des SRAPs et des hydrophobines	15
V.2. Cas d'un gène régulé lors de la mise en place d'une ectomycorhize	17
B. LA RECONNAISSANCE PLANTE - MICROORGANISMES	18
I. EXEMPLE D'UN DIALOGUE MOLÉCULAIRE ENTRE UNE PLANTE ET UN MICROORGANISME DU SOL : LA SYMBIOSE <i>RHIZOBIUM</i> -LÉGUMINEUSE	18
I.1. Présentation du modèle	18
I.2. Mise en place de la symbiose	18
I.3. Structures des facteurs nod	19
I.4. Activité des facteurs nod	19
II. LA SIGNALISATION DANS LES ECTOMYCORHIZES : LES MÉCANISMES DE RECONNAISSANCE MIS EN ŒUVRES PAR LA PLANTE ET LE CHAMPIGNON.	20
II.1. Les exsudats racinaires	20
II.2. Régulation du développement de la symbiose par des composés phénoliques	21
II.2.1. Rôle des composés phénoliques	22
II.2.2. Composés phénoliques et spécificité hôte – champignon	23
II.3. Rôle des lectines dans les phénomènes de reconnaissance	23
II.4. Rôle des flavonoïdes	24
II.5. Les phytohormones et leur fonction dans la biologie des mycorhizes	25
II.5.1. Phytohormones et interaction plante - champignon : cas de l'acide indole 3-acétique (AIA)	25
II.6. Autres signaux moléculaires indoliques émis par le champignon	29
II.6.1. Généralités sur l'hypaphorine	29
II.6.2. Accumulation d'hypaphorine dans les hyphes de <i>Pisolithus tinctorius</i>	30
II.6.3. Hypaphorine et spécificité	30
II.6.4. Régulation de la teneur en hypaphorine par des molécules d'origine racinaire	30

II.6.5. Activités de l'hypaphorine	31
II.6.5.1. Activités pharmacologiques de l'hypaphorine	31
II.6.5.2. Activités de l'hypaphorine chez les plantes	31
II.6.5.3. Activité de l'hypaphorine en tant que composés à azote quaternaire	32
II.6.5.4. Rôle de l'hypaphorine en tant que composé de type auxinique	33
C - OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	34

METHODOLOGIE 35

A. LE MODÈLE <i>Eucalyptus globulus</i> - <i>Pisolithus tinctorius</i>	36
I. LE MATÉRIEL FONGIQUE	36
II. LE MATÉRIEL VÉGÉTAL	36
B. ETUDE DE LA CROISSANCE DES POILS ABSORBANTS	37
I. DISPOSITIF DE MESURE DE LA VITESSE D'ALLONGEMENT DES POILS ABSORBANTS	37
II. VISUALISATION DES FILAMENTS D'ACTINE	38
C. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ANTAGONISME ENTRE L'HYPAPHORINE ET L'AIA.	39
I. Traitements et germination des graines	40
II. Évaluation du rôle éventuel du CO ₂	41
III. Évaluation du rôle d'éventuelles substances volatiles	41
IV. Évaluation de l'éventuelle dégradation de l'ACC par <i>Pisolithus tinctorius</i>	41
D. ACTIVITÉ DE L'HYPAPHORINE SUR LE TRANSPORT DE L'AIA. ÉTUDE DU GRAVITROPISME	42

RESULTATS 44

RÉSULTAT N° I: La croissance des poils absorbants est inhibée par l'hypaphorine, l'alkaloïde indolique présent dans les hyphes de *P. tinctorius* et restaurée par un apport d'AIA dans le milieu de culture 45

RÉSULTAT N° II: Le rôle de l'hypaphorine sur la croissance des poils absorbants : l'hypaphorine induit la désorganisation des microfilaments d'actine 60

RÉSULTAT N° III: L'hypaphorine synthétisée par le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* inhibe les activités de l'acide indole 3-acétique et de l'éthylène mais pas celle des auxines de synthèses (ANA et 2,4 D), dans les plantules d'*Eucalyptus globulus* 71

RÉSULTAT N° IV: Activité de l'hypaphorine sur le transport de l'AIA 73

DISCUSSION GENERALE 74

COMMENT L'HYPAPHORINE RÉGULE-T-ELLE LA CROISSANCE DES POILS ABSORBANTS ? 75

EXISTE-T-IL UN ANTAGONISME ENTRE LES MOLÉCULES D'AIA ET D'HYPAPHORINE ? 78

L'HYPAPHORINE FONGIQUE POSSÈDE-T-ELLE UNE ACTIVITÉ AU COURS DE LA COLONISATION RACINAIRE ? 79

<i>QUEL POURRAIT ÊTRE LE MODE D'ACTION DE L'HYPAPHORINE ?</i>	80
<i>POURQUOI L'HYPAPHORINE, UNE MOLÉCULE ANTI-AUXINIQUE, NE POSSÈDE QU'UNE SEULE ACTIVITÉ MORPHOGENÈ ?</i>	80
<i>QUEL POURRAIT ÊTRE LA SIGNIFICATION D'UNE INTERACTION HYPAPHORINE / AIA LORS DU DÉVELOPPEMENT D'UNE ECTOMYCORHIZE ?</i>	81
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	83
A. CONCLUSION GÉNÉRALE	84
B. PERSPECTIVES	85
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	87
<i>ANNEXES</i>	105

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

INTRODUCTION

A - Les mycorhizes, généralités

Les plantes ont su au cours de l'évolution, établir des associations avec divers micro-organismes vivant dans le sol. Ainsi, l'un des plus anciens témoignages de végétation vasculaire montrant des associations symbiotiques date du Dévonien, il y a 400 millions d'années (Boullard et Lemoigne, 1971 ; Taylor *et al.*, 1995). À cette époque déjà, des végétaux primitifs s'associaient à des champignons du sol pour former des mycorhizes (Taylor *et al.*, 1995). Pour ces végétaux qui ne possédaient pas de véritables racines, l'association avec un champignon assurait à la plante l'absorption des nutriments présents dans le sol. Le champignon, pour sa part, recevait de la plante des sucres, fruits de la photosynthèse.

Au cours du temps, l'évolution des deux partenaires, ainsi que la variété des milieux colonisés ont entraîné une diversification du type de mycorhizes. La formation des mycorhizes est un phénomène très vaste, il concerne plus de 6000 espèces de champignons et environ 240000 espèces de végétaux. On distingue d'ailleurs aujourd'hui trois grandes catégories de mycorhizes : les endomycorhizes, les ectomycorhizes, et les ectendomycorhizes. Ces symbioses ont toute en commun l'interdépendance des deux partenaires.

I. Les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules (VA)

Les mycorhizes à vésicules et à arbuscules constituent le type de symbiose le plus répandu à la surface du globe. Ces mycorhizes se forment entre des champignons inférieurs (non septés), symbiotes obligatoires, appartenant à l'ordre des Glomales (Zygomycètes) et les racines d'une grande variété de plantes hôtes. Ces plantes regroupent angiospermes, gymnospermes et ptéridophytes qui possèdent de véritables racines, mais également des mousses, des lycopodes et des Psilotales, qui n'en possèdent pas (Pocock et Duckett, 1984, 1985 ; Peterson *et al.*, 1981).

Les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules se caractérisent par la présence des hyphes à l'intérieur des cellules du cortex racinaire. L'appellation mycorhize à vésicules et à arbuscules vient du fait que le champignon va produire deux structures bien caractéristiques,

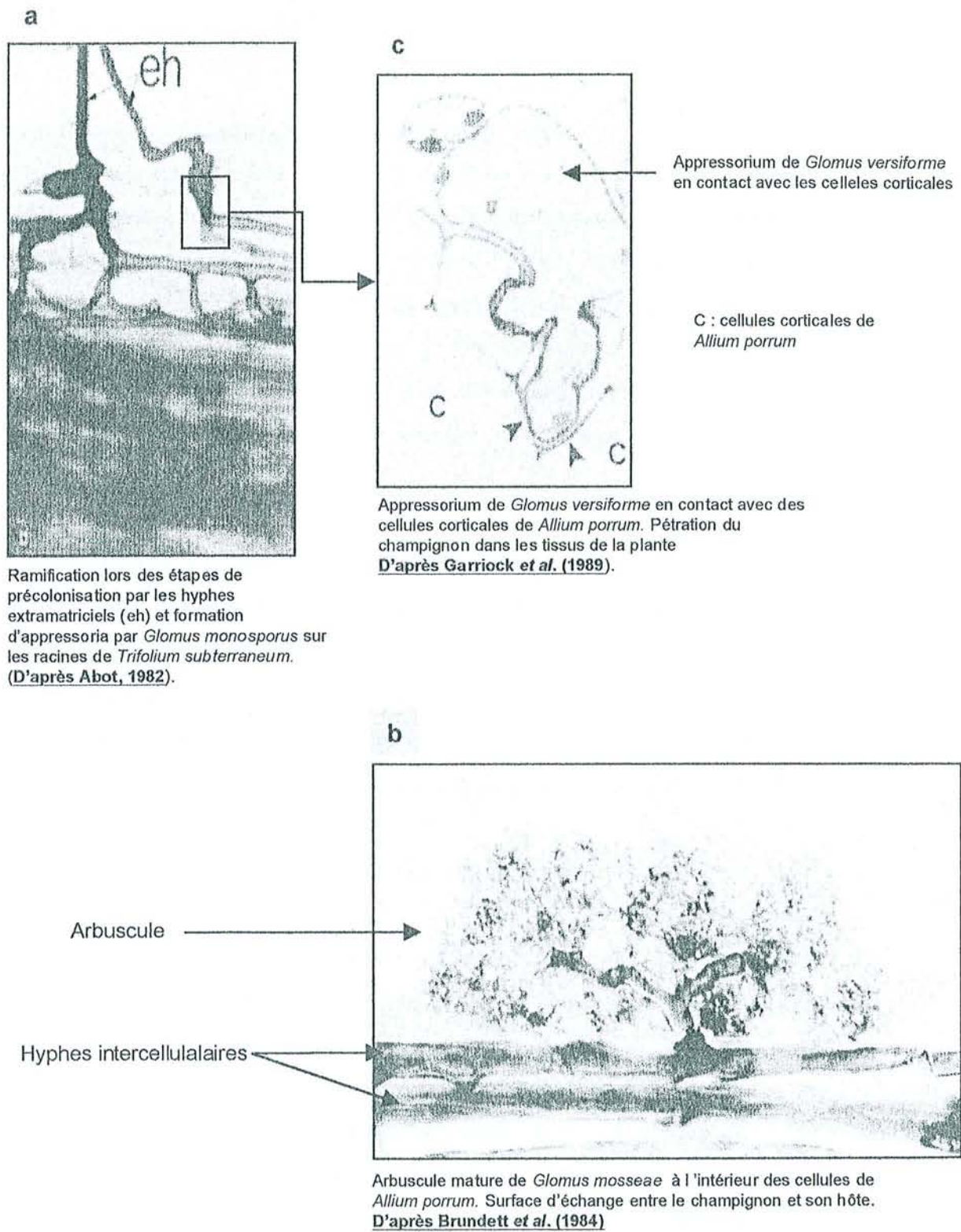


Figure 1 : Les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules.

des arbuscules à l'intérieur des cellules corticales et des vésicules, entre les cellules et (ou) à l'intérieur des cellules (Fig. 1 a, b). Les hyphes franchissent les parois et repoussent la membrane plasmique des cellules hôtes sans pour autant la rompre (Peterson et Bofante, 1994). Les vésicules sont généralement considérées comme des structures de stockage, alors que les arbuscules constituent la surface d'échange entre le champignon et la plante hôte.

Interface champignon - racine

Lors de l'infection, le contact des hyphes avec la racine est suivi d'une adhésion puis, après deux à trois jours, de la formation des appressoria (Fig. 1c) (Bécard et Fortin, 1988 ; Giovanetti *et al.*, 1993 ; Petterson et Bofante, 1994). Les appressoria ne se forment que sur des racines vivantes (Giovanetti *et al.*, 1993). Ces modifications morphologiques des hyphes à la surface de la racine indiquent que le champignon détecte la présence d'une plante hôte potentielle. La reconnaissance de l'hôte implique donc l'établissement d'un dialogue moléculaire préalable à l'infection de la racine par le champignon.

II. Les ectomycorhizes

Une ectomycorhize est caractérisée par la présence de trois types d'hyphes (Fig. 2 a, c) :

- i - les hyphes du manteau entourant la racine (Fig. 2 c).
- ii - les hyphes du réseau de Hartig ; réseau labyrinthe d'hyphes qui s'insinuent entre les cellules épidermiques et corticales (Harley et Smith, 1983 ; Kottke et Oberwinkler, 1986 ; Massicotte *et al.*, 1990) (Fig. 2 b, d). Ce réseau d'hyphes intercellulaires constitue le site des échanges entre la plante et le champignon (Lei et Dexheimer, 1988 ; Dexheimer et Pargney, 1991).
- iii - les hyphes extra matriciels (Fig. 2 a), des cordons mycéliens qui partent de la racine pour aller explorer le sol, et (ou) servir de connexion entre la racine mycorhisée et la fructification du champignon, le carpophore. Ces cordons peuvent même dans certains cas mettre en liaison deux arbres mycorhisés.

Essentiellement formées par des champignons Ascomycètes et Basidiomycètes, les ectomycorhizes s'observent surtout chez des végétaux ligneux. La majorité des arbres dans les régions tempérées, aussi bien feuillus que conifères sont ectomycorhisés. Les ectomycorhizes se rencontrent également sur le système racinaire de nombreux arbres tropicaux ; cas de

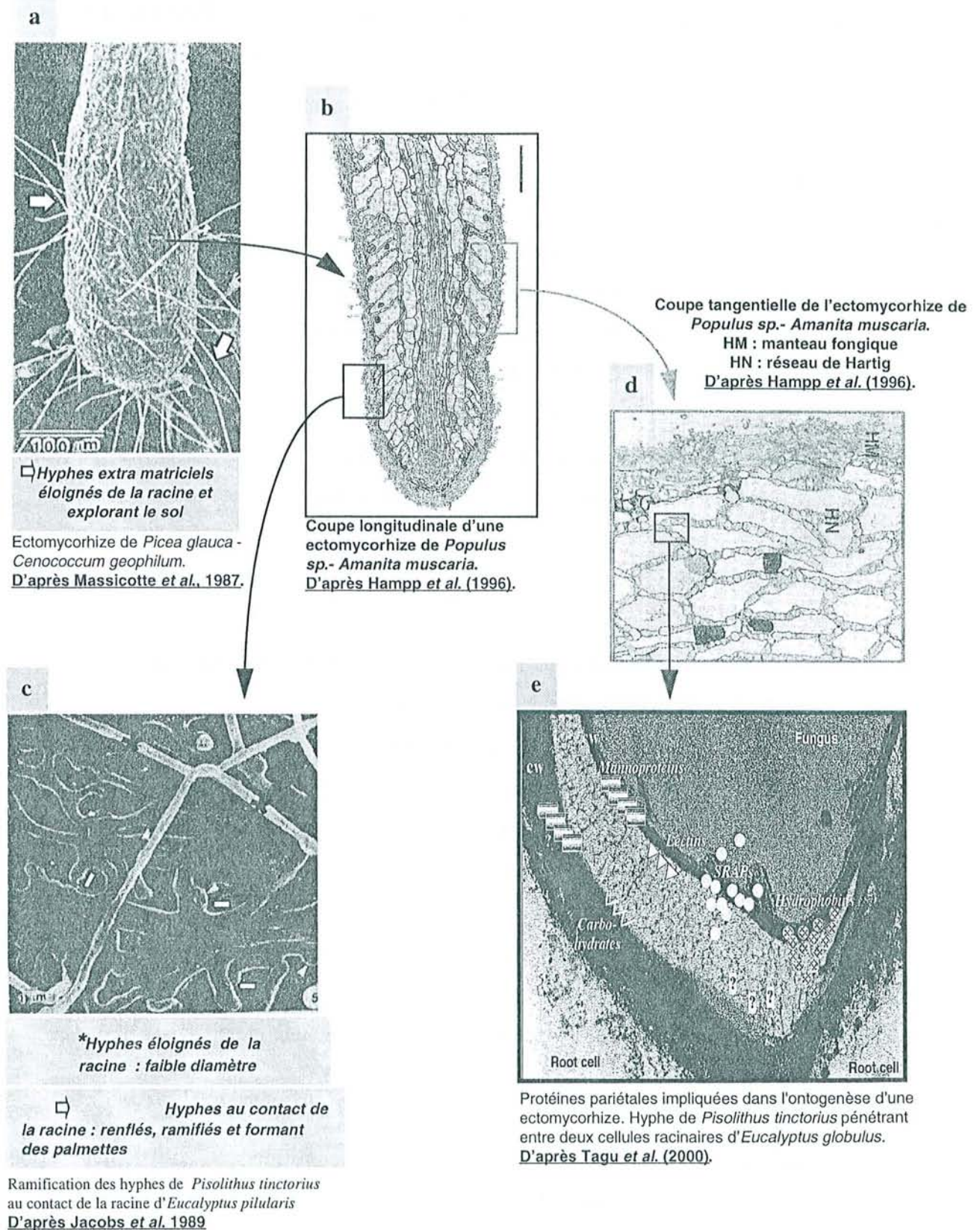


Figure 2 : Ultrastructure d'une ectomycorhize.

certaines Ceasalpinioideae (genres *Afzelia*, *Aldina*, *Anthonota*) et des Dipterocarpaceae (genres *Anisoptera*, *Balanocarpus* etc...).

Morphogenèse d'une ectomycorhize

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

Une fois le champignon au contact de la racine, les hyphes se ramifient abondamment (Fig. 2 c) (Massicotte *et al.*, 1987 b ; Jacobs *et al.*, 1989) puis adhèrent à la surface racinaire par l'intermédiaire de microfibrilles fongiques riches en glycoprotéines et en polysaccharides (Fig. 2 e) (Lei *et al.*, 1990). À ce stade de la colonisation, sous l'influence du champignon, l'activité du méristème apical de la racine est réduite (Clowes, 1951). La présence du champignon sur la racine induit également l'apparition de nouveaux méristèmes et de racines latérales, le long de la racine non encore mycorhizée (Massicotte *et al.*, 1987 c). Chez le pin, ces racines latérales ont une ramification dichotome (Piché *et al.*, 1983).

Les hyphes accolés les uns aux autres entourent complètement la racine et forment le manteau. Ce dernier qui peut présenter des caractéristiques propres à chaque ectomycorhize, a longtemps été utilisé pour leur identification (Chilvers, 1968 ; Zak, 1973 ; Godbout et Fortin, 1983). Jacobs *et al.* (1989) ont rapporté des altérations morphologiques des hyphes du manteau qui sont directement au contact des racines (Fig. 2 c). Ces hyphes sont extrêmement ramifiés, renflés et apparemment fusionnés les uns aux autres à certains endroits (Jacobs *et al.*, 1989). Les hyphes non en contact avec la racine ne présentent aucune modification tant de leur diamètre que de leur mode de ramification. Les poils absorbants, lorsqu'ils sont présents, vont dégénérer (Brunner et Scheidegger, 1992 ; Peterson et Farquhar, 1996). Le mécanisme d'élimination des poils absorbants reste pour l'heure inconnu.

À partir du manteau, certains hyphes vont s'immiscer entre les cellules du rhizoderme et parfois du cortex (mais sans jamais franchir l'endoderme) et vont former le réseau de Hartig. Chez les angiospermes, la formation du réseau de Hartig a pour conséquence un allongement radial des cellules corticales externes (Massicotte *et al.*, 1987 c). Cette élongation radiale des cellules pourrait, selon Timonen *et al.* (1994) et Carnero-Diaz (1996), faire intervenir un réarrangement du cytosquelette.

Les hyphes du réseau de Hartig sont coenocitiques (Kottke et Oberwinkler, 1987) et riches en organelles, suggérant une forte activité métabolique (Massicotte *et al.*, 1987 c). Le

réseau de Hartig, interface entre les cellules de la plante et les hyphes du champignon, constitue le siège des échanges entre les deux partenaires.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

III. Les ectendomycorhizes

Ce sont des mycorhizes qui présentent à la fois les caractéristiques des ectomycorhizes et un fort taux de pénétration intracellulaire par les hyphes mycéliens. Les structures ectendomycorhiziennes sont bien distinctes des ectomycorhizes. En effet dans ce dernier cas, seul un petit nombre de cellules hôtes présentent une pénétration intracellulaire, en général lorsque l'ectomycorhize est âgée.

Plusieurs associations ectendomycorhiziennes sont à présent bien décrites. C'est le cas des ectendomycorhizes de *Pinus banksiana*, formées par *Wilcoxina mikolae* var. *mikolae* (Scales et Peterson, 1991) ou des ectendomycorhizes de type arbutoïde rencontrées chez *Arbutus* et *Arctostaphylos* qui possèdent des hyphes intercellulaires formant des pelotons. Les ectendomycorhizes monotropoïdes de *Monotropa* et *Sarcodes*, par exemple, ont des hyphes intracellulaires très courts.

IV. Les fonctions de la symbiose

IV.1. Importance des mycorhizes pour le champignon

D'une manière générale, le champignon reçoit de la plante hôte un flux de photoassimilats. Les sucres transférés (saccharose et glucose), sont transformés en sucres spécifiques du champignon (tréhalose ou mannitol), et consommés pour la croissance et la respiration (Hampp et Wingler, 1997). Ce flux de carbone s'effectue également sous forme d'acides aminés et de vitamines (biotine et thiamine) (Read, 1991 ; Iassac, 1992).

Quel que soit le type de mycorhize, les hyphes extramatriciels sont essentiels au bon fonctionnement de la symbiose puisqu'ils sont capables de mobiliser, d'absorber, d'assimiler et de transporter la majorité des nutriments (principalement azote et phosphore) vers les autres parties des tissus symbiotiques (Smith et Read, 1997). Dans le cas des ectomycorhizes, le mycélium est capable de différencier des carpophores ; siège de la reproduction sexuée. Cette fructification ne se produit que lorsque le champignon est associé à une plante hôte. La

dissémination du partenaire fongique sous forme de spores méiotiques nécessite donc la mise en place d'une symbiose fonctionnelle.

Contrairement aux champignons ectomycorhiziens qui sont capables de survivre seuls dans le sol parce que possédant une activité saprophytique, pour les champignons formant des endomycorhizes, l'établissement d'une symbiose est d'importance capitale. Ce sont des symbiotes obligatoires, après la germination de la spore, le mycélium meurt rapidement s'il ne rencontre pas une racine.

IV.2. Importance des mycorhizes pour la plante hôte

La plante n'est capable d'absorber par ses racines que des éléments minéraux solubles. Mais ceux-ci sont présents en très faibles concentrations dans la solution du sol en forêt. Il se crée rapidement une zone de déplétion autour de la racine et, en absence de fertilisant, la plante non-associée est incapable de s'alimenter convenablement. Les associations mycorhiziennes sont indispensables à la croissance et à la survie des arbres, car elles assurent l'absorption des nutriments contenus dans le sol (Read, 1992, Rousseau *et al.*, 1994 ; Smith et Read, 1997). Ainsi, lorsque la racine est mycorhizée, les hyphes extramatriciels peuvent s'étendre dans le sol assez loin du système racinaire (plus de 20 cm), permettant à la plante d'accéder aux éléments minéraux présents dans un plus grand volume de sol (Rousseau *et al.*, 1994). De plus, les champignons possèdent la capacité de dégrader et de mobiliser certains éléments du sol inaccessibles ou peu accessibles à la plante (Mousain, 1989 ; Paris, 1994).

Les mycorhizes jouent un rôle important dans l'alimentation en eau de la plante. Des études ont montré que les rhizomorphes du champignon sont capables de prélever de l'eau à plusieurs centimètres de la racine et de la transférer à la plante (Duddridge *et al.*, 1980). Par ailleurs, il existe des différences dans l'efficacité de l'utilisation de l'eau (assimilation nette de CO₂ / flux d'eau transpirée) suivant qu'une plante est associée à un champignon plutôt qu'à un autre. Ainsi Guehl et Garbaye (1990) ont rapporté que des plants de sapin Douglas mycorhizés par *Laccaria bicolor* S238N ont une assimilation du CO₂ supérieure à ceux qui sont associés à *Thelephora terrestris*.

Les champignons améliorent la nutrition des plantes en phosphore (Mousain, 1989 ; Jakobsen, 1994), en azote (Martin *et al.*, 1987 ; Dell *et al.*, 1989), en cuivre, fer et potassium

(Le Tacon *et al.*, 1984 ; Marschner et Dell, 1994). Ils sont capables de piéger et d'accumuler dans les cordons mycéliens et le manteau certains métaux lourds (aluminium, cadmium, zinc), parfois présents en excès dans certains sols acides. C'est pourquoi, les champignons mycorhiziens sont considérés comme des bons détoxifiants des sols (Cuming, 1990 ; Martin *et al.*, 1994).

Grâce à la production de composés ayant des propriétés antibiotiques (Marx, 1973 ; Tsantrizos *et al.*, 1991 ; Kope et Fortin, 1990 ; Kope *et al.*, 1991 ; Rasanayagam et Jefries, 1992), les champignons peuvent également assurer la protection phytosanitaire des plantes (Farquhar et Peterson, 1990 ; Sylvia, 1983 ; Sylvia et Sinclair 1983). Kope et Fortin (1989) puis Farquhar et Peterson (1990) ont montré que ces antibiotiques étaient capables d'inhiber le développement de certains champignons pathogènes *in vitro*.

V. Le développement d'une ectomycorhize : la régulation de l'expression du génome

La formation d'une mycorhize se déroule en plusieurs étapes et chacune d'elle s'accompagne d'une modification de l'expression des gènes des deux partenaires.

V.1. Le rôle des protéines pariétales fongiques : cas des SRAPs et des hydrophobines

Ces dernières années, plusieurs auteurs rapportent des observations qui indiquent que des modifications majeures se produisent à la surface des parois fongiques durant l'établissement de la symbiose. Les parois cellulaires des deux partenaires jouent un grand rôle dans les phénomènes de reconnaissance. De nombreuses études ont permis de caractériser les protéines et l'expression des gènes codant ces protéines pariétales fongiques lorsque le champignon est associé (Tagu et Martin, 1996). Dans les ectomycorhizes de *Pisolithus tinctorius* - *Eucalyptus globulus*, dès le début de la symbiose, il y a disparition des deux glycoprotéines majeures des parois cellulaires du champignon, ce sont les protéines gp95 et gp72 (Tagu et Martin, 1996). De même, il y a augmentation de la synthèse d'un groupe de polypeptides acides pariétaux liés à la symbiose, les polypeptides SRAPs (pour Symbiosis-Related Acidic Polypeptides) (Burgess *et al.*, 1995 ; Laurent *et al.*, 1999). En outre, trois gènes codant des hydrophobines (des polypeptides hydrophobes des parois fongiques) sont induits (Tagu *et al.*, 1996 ; Tagu et Martin, 1996).

L'existence des SRAPs dans les hyphes du manteau et dans ceux du réseau de Hartig a été mise en évidence par cytoimmunolocalisation. L'apparition de ces protéines régulées par la symbiose coïncide avec les phases initiales de la colonisation des tissus racinaires et la synthèse par *Pisolithus tinctorius* de glycoprotéines formant des microfibrilles (Lei *et al.*, 1990). Ce qui suggère une possible implication de toutes ces protéines dans les phénomènes d'adhésion. De plus, les SRAPs arborent un motif RGD (pour arginine, glycine et acide aspartique) que l'on retrouve sur les protéines adhésives de nombreux organismes. Ces adhésines sont impliquées dans la communication cellule – cellule par l'intermédiaire de récepteurs appelés intégrines (D'Souza *et al.*, 1991 ; Hynes, 1992). Cependant, une étude biochimique approfondie permettant de confirmer que les SRAPs se conduisent comme des adhésines et qu'ils se fixent sur des récepteurs similaires aux intégrines, chez les champignons, est nécessaire.

Le fait que les hydrophobines soient sur-exprimées lors de la formation de l'ectomycorhize (Tagu *et al.*, 1996), suggère que ces protéines sont importantes pour le champignon colonisant les racines de la plante hôte. L'immunolocalisation des hydrophobines a révélé que ces protéines sont présentes à l'intérieur des parois du champignon et sont encore plus abondantes dans les hyphes formant le manteau au contact de la racine (Tagu *et al.*, résultats non publiés). Il est probable que ces protéines sont impliquées dans l'agrégation des hyphes formant le manteau (Tagu *et al.*, 2000) comme elles le sont, lors de la formation du carpophore (Wessels 1997). Par ailleurs, il a été démontré que des lectines fongiques pourraient jouer un rôle important lors des phénomènes de reconnaissance et (ou) d'attachement des deux partenaires (Giollant *et al.*, 1993).

En conclusion, les résultats obtenus à l'aide du couple *Pisolithus tinctorius* – *Eucalyptus globulus* mettent en évidence l'implication des protéines pariétales au cours du processus symbiotique (Fig. 2 e). Cependant, leur rôle exact dans la mycorhize n'est toujours pas défini avec certitude et il apparaît essentiel de pouvoir désactiver les gènes codant pour ces protéines afin d'obtenir des mutants de *Pisolithus tinctorius* et d'analyser le comportement de ces mutants au cours du développement de l'ectomycorhize.

V.2. Cas d'un gène régulé lors de la mise en place d'une ectomycorhize

Plusieurs études ont montré que l'expression génique des deux partenaires est modifiée au cours de l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. Le travail de C. Voiblet au cours de sa thèse a révélé près d'une centaine de gènes dont l'expression est régulée par la symbiose. Nehls *et al.* (1999) ont mis en évidence par exemple, un ADNc pleine longueur codant un transcrit régulé par la symbiose dans les mycorhizes d'*Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* - *Pisolithus tinctorius*. La séquence de ce clone correspond à une protéine de 25,5 kDa qui possède un fort taux d'homologie (66%) avec les glutathion-S-transferase des plantes. L'expression de ce gène nommé *EgHypar* (*Eucalyptus globulus* Hypaphorine and auxin regulated), est principalement confinée dans les racines, et fortement stimulée lors du développement de l'ectomycorhize (Nehls *et al.*, 1999). De plus, la concentration des transcrits *EgHypar* augmente fortement lorsque les racines d'*Eucalyptus* sont traitées avec des extraits fongiques de *Pisolithus tinctorius*, des régulateurs de croissance (l'acide indole acétique, l'acide dichlorophénoxyacétique) ou de l'hypaphorine (tryptophane bêtaïne), le composé indolique majeur produit par *Pisolithus tinctorius*. Ces auteurs ont suggéré que l'induction du gène *EgHypar* par des auxines et par des métabolites provenant du champignon pourrait être impliquée dans certaines modifications du développement racinaire observées lors de l'établissement de la symbiose.

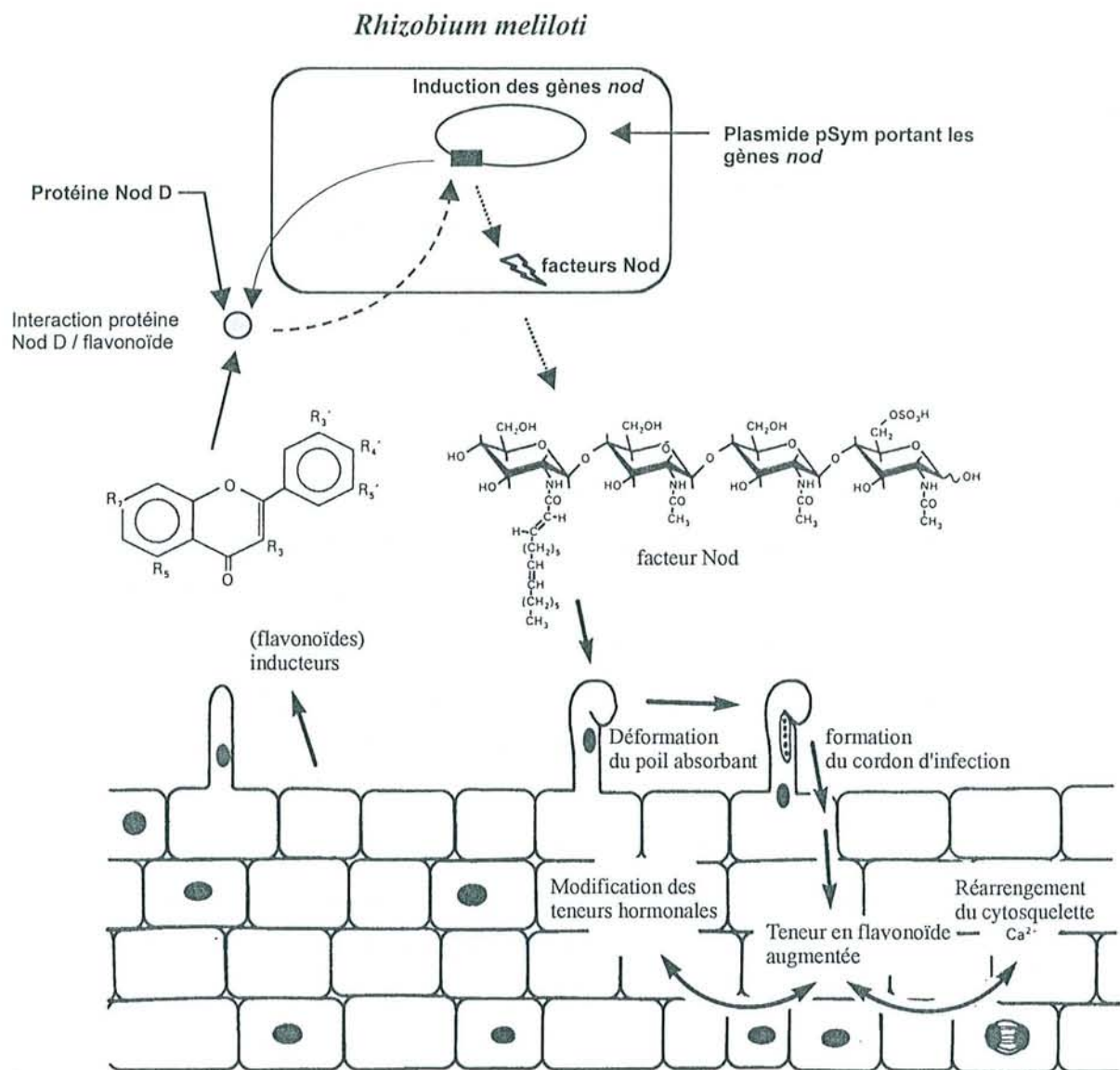


Figure 3: La signalisation lors de la mise en place d'un nodule fixateur d'azote. Les racines des légumineuses sécrètent des flavonoïdes qui vont induire les gènes *nod* bactériens. Les facteurs Nod synthétisés par la bactérie vont éliciter la courbure du poil absorbant. Une augmentation de la teneur en flavonoïdes ou d'un flavonoïde particulier sera à l'origine d'une modification de la balance hormonale ou de l'altération des composants du cytosquelette ou de la teneur en calcium intracellulaire. Toutes ces modifications pourraient être à l'origine de la division cellulaire qui va produire le primordium nodulaire. D'après Hirsch (1992) avec quelques modifications.

B. La reconnaissance plante - microorganismes

Les plantes de par leur incapacité à se déplacer, doivent faire face à de nombreuses agressions, biotiques ou abiotiques. Elles ont développé au cours de l'évolution des réponses adaptées à chaque situation. Ainsi, pour répondre à une modification des conditions d'éclairement, au vent ou à la sécheresse, les plantes vont adapter leur morphologie au milieu dans lequel elles vivent. De même, les végétaux synthétisent des molécules qui vont contribuer soit à s'associer à des microorganismes "utiles", soit à détruire les indésirables.

Pour fournir une réponse adéquate, encore faut-il que l'assaillant ou le futur partenaire soit identifié. Ainsi, à l'instar des modes d'identification utilisés par les organismes animaux pour reconnaître le non-soi, les plantes et les champignons disposent aussi d'un arsenal moléculaire leur permettant de se reconnaître. Ces mécanismes de reconnaissance ont permis au cours de l'évolution, le développement d'associations de type exclusives entre des plantes et certains microorganismes du sol.

I. Exemple d'un dialogue moléculaire entre une plante et un microorganisme du sol : la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse

I.1. Présentation du modèle

Les bactéries du genre *Rhizobium* établissent des symbioses exclusives avec des racines de légumineuses. Dans tous les cas, la symbiose se caractérise par la formation d'un nodule racinaire au sein duquel se produit la fixation de l'azote atmosphérique. Le développement de ce nodule est régulé initialement par des interactions précoces entre les bactéries symbiotiques et les poils absorbants (Fig. 3).

I.2. Mise en place de la symbiose

Ce sont des interactions entre des bactéries du sol et les racines qui vont conduire à la formation du nodule (Caetano-Anollés *et al.*, 1988 a, b). Avant le contact physique avec les

poils absorbants, les bactéries de la rhizosphère du genre *Rhizobium* sont chimiotactiquement dirigées contre la racine par les flavonoïdes de la plante. Ces flavonoïdes vont réagir de façon spécifique avec une protéine désignée par NodD, cette dernière activée, va induire à son tour la transcription des gènes *nod* de *Rhizobium*. Les gènes *nod* bactérien sont localisés sur un grand plasmide, le plasmide pSym. Avec les gènes *nod*, le plasmide regroupe également une série d'autres gènes essentiels pour la nodulation et dont certains sont impliqués dans la structuration de la surface bactérienne (Franssen *et al.*, 1992).

En dehors des flavonoïdes, d'autres composés aromatiques inducteurs des gènes *nod* ont été identifiés : des chalcones, des anthocyanines et des flavonoïdes conjugués (Philips *et al.*, 1994). Deux bêtaïnes (associées aux flavonoïdes), la trigonelline et la stachidine sont également capables d'induire les gènes *nod* de *Rhizobium meliloti* (Philips *et al.*, 1994). D'après ces auteurs, ces bêtaïnes plus hydrosolubles que les flavonoïdes, permettraient à la luzerne d'entrer en contact avec *Rhizobium* par des voies différentes.

I.3. Structures des facteurs *nod*

Seul le gène *nodD* est exprimé de manière constitutive en culture pure. Les facteurs de nodulation synthétisés après induction des gènes *nod* bactériens par la protéine NodD, sont des lipooligosaccharides dont la structure de base est la même pour toutes les espèces de *Rhizobium*. Celle-ci consiste en un enchaînement de quatre ou cinq N-acétylglucosamine liés en β 1 - 4, portant un acide gras à une extrémité glucosamine non réduite. La spécificité de chaque *Rhizobium* repose sur la variabilité de cette partie commune : les deux glucosamines terminales portent des groupements spécifiques et la nature de l'acide gras diffère selon les espèces. La construction de cette structure de base s'effectue en deux phases. Les gènes *nod* communs à tous les *Rhizobium*, les gènes *nod A*, *B*, et *C*, vont dans un premier temps coder pour toutes les enzymes responsables de la synthèse de la structure commune ; par la suite, les gènes *nod* propres à chaque espèce de *Rhizobium*, vont l'orner de motifs caractéristiques de l'espèce.

I.4. Activité des facteurs *nod*

Les facteurs Nod responsables de la courbure caractéristique du poil absorbant lors de l'infection agissent à très faible concentration (10^{-11} M). Purifiés, ils sont capables d'induire la

formation de primordiaux nodulaires (Ardourel *et al.*, 1994 ; Bauer *et al.*, 1996 ; Bloemberg *et al.*, 1995 ; Cardenas *et al.*, 1995 ; Lopez-Lara *et al.*, 1995 a, b ; Minami *et al.*, 1996 a, b ; Relic *et al.*, 1993 ; Sanjuan *et al.*, 1992 ; Schultze *et al.*, 1992 ; Spaink *et al.*, 1991 ; Truchet *et al.*, 1991).

II. La signalisation dans les ectomycorhizes : les mécanismes de reconnaissance mis en œuvre par la plante et le champignon.

Les plantes, organismes autotrophes pour le carbone sont capables grâce à la photosynthèse de synthétiser des sucres. Elles constituent la principale source d'éléments nutritifs pour tous les microorganismes peuplant la rhizosphère. C'est ainsi que les exsudats sécrétés par la racine, attirent une foule de microorganismes parmi lesquelles on trouve des bactéries et des champignons.

Les signaux qui vont contribuer à l'établissement de la symbiose mycorhizienne peuvent être de nature diverse. Parmi ces signaux issus du champignon, on peut citer le cas des régulateurs de croissance (auxine, cytokinines, éthylène, hypaphorine). Les signaux provenant de la plante pourront être des composants des exsudats racinaires : des composés pariétaux (monomères de cutine, protéines, oligosaccharides), des polyphénols (flavonoïdes, tannins), etc... Tous ces composés, qu'ils soient d'origine racinaire ou fongique jouent certainement un rôle lors de la phase de pré colonisation.

II.1. Les exsudats racinaires

Il est bien connu que les plantes libèrent de nombreux composés dans leur environnement immédiat. Ce sont principalement des nutriments à la disposition de la population microbienne en général ; comme en atteste l'abondance de cette communauté dans la rhizosphère. Mais ces exsudats contiennent également des composés qui eux seront suffisamment spécifiques pour permettre à la plante de sélectionner le futur "partenaire", parmi tous les microorganismes de la rhizosphère.

De nombreuses études menées par Melin (1963) ont suggéré que les racines des plantes ectomycorhiziennes produisent une substance appelée facteur M, essentielle à la croissance du partenaire fongique. L'acide indole 3-acétique (AIA) (Fortin, 1967, 1970 ; Gogala et

Pohleven, 1976) et les cytokinines (Gogala, 1971 ; Gogala et Pohleven, 1976) furent testées et ne présentèrent pas tous les effets attribués au facteur M. Néanmoins, des cytokinines apportées à une concentration optimale, stimulèrent faiblement la croissance de certains champignons mycorhiziens, mais l'inhibèrent aux autres concentrations.

Björkman (1970) a identifié chez la plante parasite, *Monotropa hypopitys*, une substance capable de stimuler la croissance d'un grand nombre de champignons symbiotiques. Il l'a baptisée "tuburcine" puis, en la comparant au facteur M de Melin (1963), cet auteur a proposé que la tuburcine pouvait attirer les champignons mycorhiziens lors des premières phases de la mise en place de la symbiose. Récemment, Lagrange (communication personnelle) a mis en évidence l'existence d'une fraction d'exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* qui stimule la croissance et affecte la morphologie des hyphes de *Pisolithus tinctorius*. Deux molécules actives ont été mises en évidence, la rutine et la zeatine (Lagrange, communication personnelle).

En termes de spécificité champignon - plante hôte, les expériences de Horan et Chilvers (1990) montrent à l'aide de plantes compatibles et incompatibles avec *Pisolithus tinctorius* et *Paxillus involutus*, que des substances diffusant à partir d'apex d'hôtes compatibles peuvent attirer les différents isolats, de manière sélective. Ainsi, des composés produits par la plante seraient capables de réguler le développement de la mycorhize, en déterminant la spécificité de l'hôte. Par ailleurs, plusieurs autres études se sont intéressées de manière individuelle aux différentes composantes des exsudats racinaires ; c'est le cas des composés phénoliques, des lectines, des flavonoïdes et des phytohormones.

II.2. Régulation du développement de la symbiose par des composés phénoliques

Il y a de plus en plus d'évidences montrant que les composés phénoliques jouent un rôle lors des interactions plante - champignon. Harborne (1980) a montré que les composés phénoliques peuvent prémunir les plantes contre les attaques par des champignons ou des bactéries. Cette protection se fait soit grâce des composés phénoliques préexistants et actifs lors de la phase de pré-infection, soit par une augmentation de la synthèse de ces composés (par exemple les phytoalexines) lors de la phase de post-infection (Ingham, 1973).

Il existe de nombreuses informations concernant le rôle des composés phénoliques au cours de la mycorhization. Ling-Lee *et al.* (1977) ont observé qu'il y avait plus de composés phénoliques dans les racines d'eucalyptus mycorhizées que dans des racines non infectées. Ces auteurs ont proposé que cette augmentation fût induite par la présence du symbionte fongique. De même Sylvia (1983) puis Sylvia et Sinclair (1983), ont observé une accumulation de tannins dans les racines de Douglas colonisées par le champignon mycorhizien *Laccaria laccata*, ou traitées avec des métabolites cellulaires de ce champignon.

II.2.1. Rôle des composés phénoliques

Les composés phénoliques produits par la plante sont toxiques pour certains champignons mycorhiziens (Olsen *et al.*, 1971 ; Pellissier, 1993), ce qui semble incompatible avec l'idée de symbiose. Cependant, selon Malajczuk *et al.* (1984), les tannins produits par la plante au cours de la mycorhization auraient pour rôle, de contrôler la progression du champignon lors de la formation du réseau de Hartig. De même, Foster et Mark (1967), puis Hillis *et al.* (1968) ont proposé que les composés phénoliques relargués par les cellules, racinaires riches en tannins, forment une sorte de barrière servant à limiter le développement du champignon à l'intérieur des tissus de la plante.

Mais dans certains cas au contraire, le champignon induit plutôt une réduction de la concentration de certaines molécules phénoliques potentiellement toxiques. C'est le cas du *p*-hydroxybenzoyl glucose, de l'acide *p*-hydroxybenzoïque glucoside, de la piceine, de la catechine, de l'epiceatine et d'un composé pariétal, l'acide férulique (Münzenberger *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent une évolution de la symbiose vers le point où la reconnaissance par l'hôte d'un champignon compatible, entraîne plutôt une inactivation de ses défenses chimiques. Münzenberger *et al.* (1990) ont proposé que la réduction en teneur de certains composés phénoliques puisse favoriser l'extensibilité des parois des cellules de l'hôte, permettant ainsi, une meilleure pénétration mécanique des hyphes du partenaire fongique.

D'autre part, Massicote *et al.* (1990) ont observé une décoloration des hyphes du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* lors de la colonisation des racines de *Betula alleghaniensis*. Cette décoloration a été interprétée par ces auteurs comme un marqueur précoce de l'assemblage des hyphes dans les régions apicales et subapicales de la racine. Comme les composés aromatiques rentrent dans la composition des pigments

(Harborne, 1980), il est possible que la confrontation entre le champignon et la plante ait induit une modification du métabolisme de ces composés dans les hyphes.

Il semble donc la colonisation de la racine par le champignon induit une modulation de l'activité métabolique des deux partenaires, dans le but de favoriser un développement équilibré de la symbiose.

II.2.2. Composés phénoliques et spécificité hôte – champignon

Bien que de nombreux champignons s'associent à un grand nombre de plantes : cas du genre *Amanita* (Molina *et al.*, 1992), il n'en demeure pas moins que pour certains champignons, il existe des relations exclusives avec leur hôte.

Dans certains cas, la production de polyphénols peut se révéler un bon moyen pour repousser les champignons incompatibles. L'incompatibilité entre *Pisolithus* et des racines non - hôtes peut parfois s'exprimer par une accumulation de polyphénols dans les tissus racinaires et par un épaississement des parois des cellules (Tonkin *et al.*, 1989 ; Lei *et al.*, 1990).

Les résultats de Koide *et al.* (1998) montrent par exemple que *Suillus intermedius* et *Amanita rubescens* Pers. répondent différemment à la présence de différents composés phénoliques (cathechine gallate et epicatechine gallate) provenant des aiguilles de pin rouge. De plus, la teneur en composés phénoliques des Pins varie fortement d'une espèce à l'autre. Ces molécules pourraient agir en structurant la population des champignons présents dans la rhizosphère (Koide *et al.*, 1998). L'augmentation des concentrations en cathechine et en epicatechine dans les racines infectées (M. Weiss, communication personnelle citée par R.T. Koide, 1998), suggèrent que ces deux composés phénoliques pourraient jouer un rôle particulier lors de la communication entre la plante et le champignon ectomycorhizien.

II.3. Rôle des lectines dans les phénomènes de reconnaissance

Connues depuis une centaine d'années, les lectines sont des molécules synthétisées par beaucoup de végétaux et d'animaux. Ce sont des protéines ou des glycoprotéines dont la propriété essentielle est de se lier d'une manière plus ou moins réversible avec des résidus

osidiques. De nombreuses activités leur sont attribuées : elles ont le pouvoir d'agglutiner les hématies (Goldstein *et al.*, 1980) ; Ersek *et al.* (1985) les ont décrits comme de simples substances de réserves, régulateurs du métabolisme glucidique, et Griffaut *et al.* (1990) comme des intermédiaires dans l'action des hormones.

Mais cette faculté qu'elles ont de se lier est similaire à ce que l'on connaît des liaisons spécifiques anticorps / antigène ou encore enzyme / substrat. Cette propriété pourrait expliquer l'affinité entre un hôte et son symbionte à condition bien sûr que l'un des partenaires possède une lectine, et que l'autre partenaire, possède une structure complémentaire (Chaboud et Lalonde, 1983 ; Petit *et al.*, 1983 ; Halverson et Stacey, 1985).

L'intervention des lectines dans les mécanismes de reconnaissance arbre- champignon semble probable. En effet, Guillot *et al.* (1994) ont montré que trois espèces de lactaires (*Lactarius deliciosus*, *Lactarius deterrimus* et *Lactarius salmonicolor*) difficiles à distinguer morphologiquement et qui sont strictement inféodées respectivement au pin (*Pinus sylvestris*), à l'épicéa (*Picea abies*) et au sapin (*Abies alba*) possèdent en fait des lectines bien différentes quant à leur structure et à leur spécificité. Par ailleurs, ces auteurs ont mis en évidence par des méthodes d'immunofluorescence, la présence des récepteurs spécifiques correspondant à chaque lectine chez chacun des trois conifères cités (Guillot *et al.* 1994).

II.4. Rôle des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques simples produits par les plantes, ils possèdent en plus du noyau aromatique, des chaînes latérales courtes. Les flavonoïdes jouent un rôle très important dans le contrôle des interactions plantes - champignons pathogènes (Dixon *et al.* 1994), plantes - *Agrobacterium* (Stachel *et al.*, 1985) ou des interactions à caractère symbiotiques entre des légumineuses et la bactérie fixatrice d'azote, *Rhizobium* (Peters *et al.*, 1986 ; Phillips *et al.*, 1992). Les flavonoïdes interviennent également lors des étapes précoces des interactions entre une racine et des champignons endomycorhiziens, en stimulant la croissance des hyphes (Nair *et al.*, 1991 ; Bécard *et al.*, 1992 ; Tsai et Phillips, 1991 ; Poulin *et al.*, 1993). Lagrange (communication personnelle) a montré que la rutine, un flavonol présent dans les exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* était capable de stimuler fortement la croissance des hyphes de *Pisolithus tinctorius*. De plus la rutine est active à

faible concentration, de l'ordre du pM. Mais le mode d'action de la rutine demeure pour le moment inconnu.

II.5. Les phytohormones et leur fonction dans la biologie des mycorhizes

Les phytohormones régulent la croissance et le développement des plantes. La synthèse d'auxine a été observée chez beaucoup de champignons mycorhiziens (Annexes, Tableau I). La production de gibbérellines ou de ses analogues a été également rapportée, chez *Boletus edulis* var *pinicolus* (Gogala, 1967, 1971), *Glomus mosseae* (Barea et Azcon-Aguilar, 1982), *Pisolithus tinctorius* (Hanley et Greene, 1987 ; Ho, 1987 a), *Rhizopogon luteolus* (Strzelczyk et Pokojaska-Burdziej, 1984), *Suillus luteus* (Strzelczyk et Pokojaska-Burdziej, 1984), *Telephora terrestris* (Hanley et Greene, 1987) et chez des champignons ectomycorhiziens symbiotes de *Pinus sylvestris* (Strzelczyk *et al.*, 1975). Plusieurs revues ont été publiées à ce sujet (Gogala, 1991 et Beyrle, 1995).

La production de phytohormones par le champignon dépend de la composition du milieu. Le rapport C/N, le pH, la concentration en ions (Rudawska, 1983), la présence ou l'absence d'acides aminés (Kampert et Strzelczyk, 1990), d'acides organiques (Strzelczyk et Pokojaska, 1990), de vitamines (Strzelczyk et Kampert, 1987 ; Strzelczyk et Pokojaska, 1990) et de polyphénols (pour une revue, voir Lonsane et Kumar, 1991) régulent la production. Le rôle physiologique de ces phytohormones sur le développement du champignon reste mal connu.

II.5.1. Phytohormones et interaction plante - champignon : cas de l'acide indole 3-acétique (AIA)

L'activité de l'AIA lors de la mise en place de la symbiose a été suggérée par de nombreux auteurs. Le fait que la majorité des champignons mycorhiziens produisent de l'AIA (Ulrich 1960 ; Ek *et al.*, 1983 ; Strzelczyk et Pokojaska-Burdziej 1984 ; Rouillon *et al.*, 1986 ; Frankenberger et Poth 1987 ; Gay *et al.*, 1994 ; Karabaghli-Degron *et al.*, 1998), a soulevé de nombreuses interrogations quant au rôle de cette molécule au cours la mise en place de la mycorhize (Gogala, 1991 ; Beyrle, 1995). Un possible rôle de l'AIA a été proposé par Slankis (1971, 1973) et Ulrich (1960). En effet, l'incubation des racines de *Pinus sylvestris* dans une solution contenant de l'AIA ou du milieu de culture de deux champignons ectomycorhiziens (*Suillus luteus* et *Suillus variegatus*), induit une stimulation de la ramification et la formation

de racines latérales dichotomes, morphologiquement similaires à des ectomycorhizes. Ces modifications morphologiques disparaissent en cas d'arrêt du traitement hormonal. Slankis (1973) a conclu dès lors que l'AIA fongique était responsable de la morphologie typique des systèmes racinaires mycorhizés. Concernant la stimulation de la ramification latérale par l'AIA fongique, Wong et Fortin (1990) ont proposé qu'elle ait pour rôle de fournir au champignon un nombre plus élevé de sites potentiels à coloniser.

Il existe de nombreuses autres évidences qui font de l'AIA fongique, une des molécules-clefs du processus symbiotique mycorhizien. Gay *et al* (1994), puis Gela *et al.* (1994) ont montré qu'un mutant d'*Hebeloma cylindrosporum* surproducteur d'AIA formait un plus grand nombre de mycorhizes que la souche sauvage, avec un réseau de Hartig hypertrophié, pouvant même atteindre l'endoderme. Rudawska et Kieliszewska-Rokicka (1997) ont pour leur part, mis en évidence une corrélation entre le nombre d'ectomycorhizes formées par *Pinus sylvestris* associé au champignon *Paxillus involutus*, et la quantité d'AIA produite par ce microorganisme. Par ailleurs, Karabaghli-Degron *et al.* (1998) ont montré qu'un inhibiteur du transport de l'AIA, le TIBA (Annexes, Fig. 1), adjoint au milieu de culture, pouvait empêcher la formation du manteau ainsi que celle du réseau de Hartig, lorsque des racines de *Picea abies* étaient colonisées par le champignon *Laccaria bicolor-s238n*. Ces résultats suggèrent que l'AIA produit par le champignon joue un rôle important tant lors de la colonisation de la surface racinaire que de la mise en place du réseau de Hartig.

II.5.2. Mode d'action de l'AIA fongique lors du développement de la mycorhize.

Il est probable qu'une production continue d'AIA par le champignon entraîne une modification de la balance hormonale dans les racines de la plante hôte. Une telle rupture de l'équilibre hormonal pourrait induire des modifications du métabolisme de la plante. L'induction d'un plus grand nombre de racines latérales ou la formation de racines dichotomes par exemple sont des processus qui seraient liés à la production d'AIA par le champignon (pour revue voir Beyrle, 1995). L'auxine, suivant la théorie de la croissance acide, est impliquée dans le relâchement pariétal et l'élongation cellulaire (Cleland 1995). Il est possible que l'auxine produite par le champignon modifie les propriétés pariétales des cellules corticales, facilitant ainsi la progression du symbionte lors de la formation du réseau de Hartig. L'auxine pourrait provoquer une acidification extracellulaire en stimulant

l'excrétion de protons par des ATPases membranaires ou en augmentant le nombre de ces pompes à protons (Hager *et al.*, 1991).

On peut également soupçonner une régulation des mécanismes de défense de la plante par l'auxine. En effet, l'auxine inhibe l'induction des chitinases lors de nombreuses interactions plante - champignon (Shinshi *et al.*, 1987) et également lorsque des racines d'*Eucalyptus* sont traitées avec des éliciteurs de champignons ectomycorhiziens (Béguiristain et Lapeyrie, résultats non publiés).

Nehls *et al.* (1998) ont montré qu'un gène de la plante, le gène *EgHypar* (pour *Eucalyptus globulus* Hypaphorine and auxine regulated) présentant une forte homologie de séquence avec des glutathion S-transférases (GST) et dont l'expression est régulée par les auxines, était fortement exprimé au cours du développement de la mycorhize. Les GSTs sont des protéines impliquées dans les processus de détoxification cellulaire. De plus, il a été rapporté que les GSTs sont capables de fixer l'AIA sur un site non catalytique (Jones, 1994 ; Bilang et Sturm, 1995). La fixation de l'auxine sur ce site non catalytique de la GST pourrait jouer un rôle dans le transport intracellulaire de cette molécule ou son stockage sous forme de conjugué AIA-GST. Dans le cas d'une ectomycorhize, l'induction du gène *EgHypar* pourrait permettre à la plante de réguler la teneur en AIA libre (active) dans les tissus de la plante.

Les travaux de Hampp *et al.* (1996) ont permis d'apporter une nuance aux résultats obtenus par Gay *et al.*, (1994) présentés plus haut. À l'aide d'une plante surexprimant des gènes responsables de la biosynthèse de l'AIA, Hampp n'a observé aucune modification concernant le nombre et l'aspect des ectomycorhizes formées par cette plante, comparé à une plante sauvage. Ces résultats suggèrent soit que lors de la mise en place de la symbiose, l'AIA fongique et l'AIA endogène de la plante pourraient ne pas jouer le même rôle, soit que dans le cas d'*Hebeloma cylindrosporum*, le tryptophane pourrait être partiellement responsable du phénotype mutant. En effet, chez ce mutant, c'est la surproduction du tryptophane qui entraîne par voie de conséquence celle de l'AIA (Gay *et al.* 1994).

Quoi qu'il en soit, il apparaît vraisemblable que l'AIA même en grande quantité dans la racine, ne contrôle pas seule l'ontogenèse des ectomycorhizes. Ce sont probablement des interactions avec d'autres molécules, y compris d'autres régulateurs de croissance

(cytokinines, gibbérellines, acide abscissique ou éthylène) qui pourraient expliquer certains des effets de l'auxine au cours de l'interaction symbiotique.

Il a été par exemple montré que, d'une part les champignons mycorhiziens pouvaient synthétiser de l'éthylène en présence de méthionine, et que d'autre part il y avait production d'éthylène lors de la formation d'ectomycorhizes (Graham et Linderman, 1980 ; Rupp *et al.*, 1989 b). De plus, le traitement de tissus végétaux avec des auxines peut stimuler la synthèse d'éthylène (Yu et Yang, 1979). Alors que l'éthylène induit les mécanismes de défense lors d'une attaque par un pathogène, dans le cas d'une ectomycorhize, l'éthylène semble sans effet sur les activités de défense de la plante. Cependant, le traitement des racines de plusieurs familles de pins avec de l'éthéphon (un composé qui relâche de l'éthylène) induit la formation de diverses structures (dichotomies et structures coralloïdes) caractéristiques des mycorhizes de ces espèces (Rupp et Mudge 1985 ; Rupp *et al.*, 1989 a). Ces auteurs ont conclu que la formation de ces structures était due à une activité de l'auxine via l'éthylène. Par la suite, Kaska *et al.* (1999) ont mis en évidence ce lien en utilisant des inhibiteurs du transport de l'auxine. Ces chercheurs ont proposé que l'inhibition du transport de l'auxine entraîne une accumulation localisée de cette hormone dans les tissus de la plante, induisant la stimulation de la synthèse d'éthylène. C'est l'éthylène qui serait responsable des déformations racinaires. Ce dernier résultat suggère certes l'implication de l'auxine au cours du processus symbiotique, mais il révèle également que l'activité auxinique doit être régulée.

La théorie hormonale de la symbiose ectomycorhizienne (Slankis 1973 ; Gogala, 1991 ; Smith et Read, 1997) a été contestée par de nombreux auteurs (Harley et Smith, 1983 ; Nylund, 1988 ; Horan, 1991 ; Wallander *et al.*, 1992, 1994). Ainsi, dans le but de simuler la colonisation par un champignon, Horan (1991) a incubé de jeunes racines d'*Eucalyptus* en présence de fortes quantités d'auxines (AIA, ANA) exogènes. Il a obtenu la formation de racines à croissance lente, renflées et fortement ramifiées, ressemblant à des ectomycorhizes. Cependant, ces racines possédaient également une forte densité de poils absorbants, des couches supplémentaires de cellules corticales et un système vasculaire plus important dans la stèle, des altérations morphologiques non observées dans les ectomycorhizes. Réciproquement, l'auxine était incapable de générer certains caractères typiques des ectomycorhizes (par exemple l'élongation radiale des cellules du rhizoderme). Le rôle de l'AIA fongique au cours de la mise en place de la symbiose reste donc toujours à préciser. De plus, des sécrétions massives d'auxines du champignon vers la racine sont improbables.

Wallender *et al.* (1992) ont observé par exemple qu'il y avait moins d'AIA (50%) dans les racines de *Pinus sylvestris* mycorhizées par *Laccaria bicolor* que dans des racines non-mycorhizes.

Il est vraisemblable que durant les différentes étapes de l'ontogénie mycorhizienne, la concentration en AIA dans les différents tissus de la racine est régulée par le partenaire fongique et par l'hôte. Cette régulation pourrait impliquer à la fois la sécrétion d'auxine et de ses conjugués, et (ou) la régulation du métabolisme de l'auxine endogène de la plante (via la synthèse ou la fourniture par le champignon d'inhibiteurs d'auxine oxydase par exemple).

Le rôle des nombreux autres composés produits par le champignon devrait être pris en compte. En effet, c'est vraisemblablement un équilibre entre la quantité d'auxine fongique délivrée dans les racines, son activité, et l'activité de nombreux autres composés fongiques, qui coordonne les différentes étapes de la mise en place de la symbiose.

II.6. Autres signaux moléculaires indoliques émis par le champignon

À l'instar de l'auxine fongique, le rôle d'autres composés indoliques produits par le champignon devrait être considéré. C'est le cas par exemple de l'hypaphorine, le principal composé indolique accumulé et sécrété par le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* (Béguiristain *et al.*, 1995).

II.6.1. Généralités sur l'hypaphorine

L'hypaphorine a été isolée pour la première fois par Greshoff (1880) à partir des graines de *Erythrina hypaphorus*, un arbre que l'on fait pousser pour son ombrage dans les plantations de café à Java. Mais ce sont P. van Romburgh et G. Barger en 1911 qui ont par la suite identifié l'hypaphorine comme étant la bêtaïne du tryptophane (Fig. 4). Plus tard l'hypaphorine a été détectée chez d'autres plantes supérieures appartenant principalement à la famille des légumineuses (voir Béguiristain, thèse) (chez la lentille, l'hypaphorine a été appelée lenticine) et chez les éponges *Pachymastisma johnstoni* (Raverty *et al.*, 1977) et *Aplysina sp.* (Kondo *et al.*, 1994). Mais chez les microorganismes y compris les champignons, il n'existe que peu de rapports faisant état de la présence d'hypaphorine. Outre les travaux de Béguiristain cités plus haut, dans les carpophores du champignon *Agaricus arvensis*, un

composé présentant les mêmes propriétés chromatographiques que l'hypaphorine a été mis en évidence par chromatographie sur couche mince et révélation au réactif de Dragendorff (Marklova et Hais, 1992). Toutefois, aucune vérification spectrale (spectre UV, IR, de masse ou RMN) n'a permis de confirmer qu'il s'agissait bien d'hypaphorine.

II.6.2. Accumulation d'hypaphorine dans les hyphes de Pisolithus tinctorius

Toutes les données présentées dans cette partie ont été obtenues par T. Béguiristain au cours de son travail de thèse au laboratoire.

À la recherche de marqueurs biochimiques des réactions précoces de reconnaissance, T. Béguiristain a mis en évidence la présence d'hypaphorine dans les hyphes de *Pisolithus tinctorius* (Béguiristain *et al.*, 1995). Il a montré que l'hypaphorine déjà présente dans les hyphes du champignon en culture pure, était sur accumulée précocement (après 1 jour de colonisation) dans les tissus fongiques au cours de la formation des mycorhizes (Béguiristain et Lapeyrie, 1997). La suraccumulation d'hypaphorine était aussi un phénomène durable puisqu'elle s'observait toujours dans des mycorhizes d'*Eucalyptus* âgées de plusieurs mois.

II.6.3. Hypaphorine et spécificité

La suraccumulation d'hypaphorine dans les hyphes fongiques, était caractéristique de l'état de symbiose. En effet, la teneur en hypaphorine dans les hyphes de *Pisolithus tinctorius* colonisant des plantes non-hôtes (la tomate, le cresson et le trèfle) mais capables de réaliser des symbioses endomycorhiziennes, demeurait 3 fois inférieure à celle d'hyphes symbiotiques associés à l'*Eucalyptus* (Béguiristain et Lapeyrie, 1997). De plus, Béguiristain constatant une forte teneur en hypaphorine dans les extrémités des hyphes bordant la colonie, a suggéré que la suraccumulation d'hypaphorine ne soit pas spécifiquement induite par la symbiose, mais spécifiquement maintenue à un niveau élevé (équivalent à celui des apex fongiques) au cours de la mycorhization et dans une mycorhize âgée.

II.6.4. Régulation de la teneur en hypaphorine par des molécules d'origine racinaire

Il apparaît évident d'après les expériences d'Horan (1991) que les plantes peuvent produire des substances diffusibles capables d'influencer la croissance du champignon et

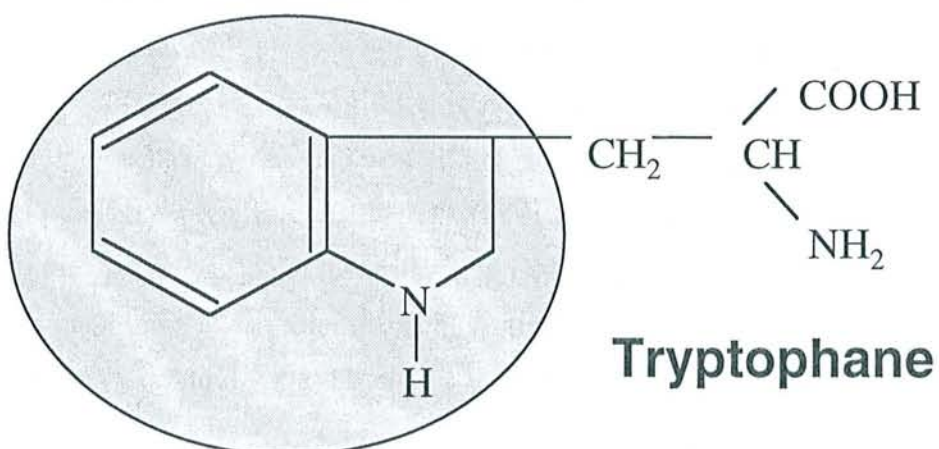
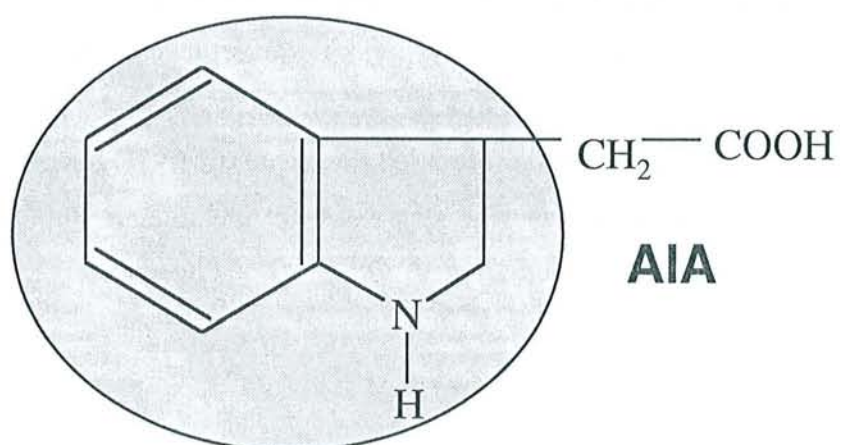
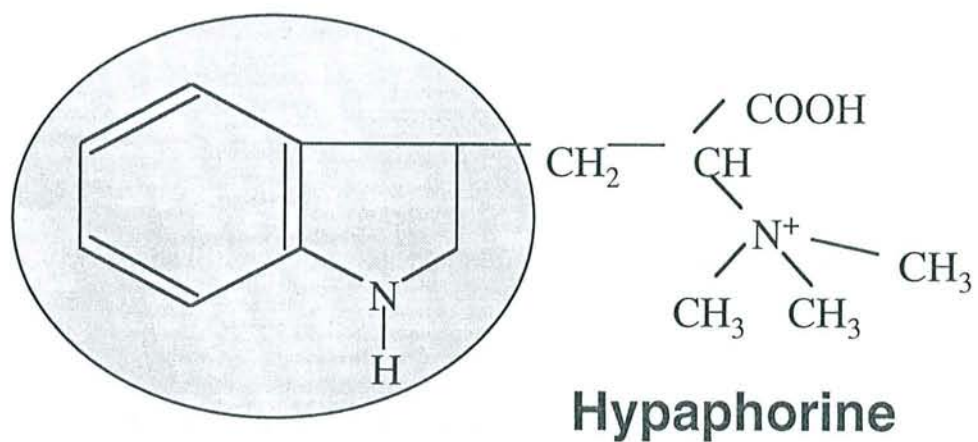


Figure 4 : Comparaison des molécules d'AIA, d'hypaphorine et de tryptophane ayant en commun un noyau indole (en gris).

même de contrôler la compatibilité entre un hôte et son symbionte. Utilisant la méthode de Chilvers *et al.* (1986) (la racine et le champignon sont séparés par une membrane de cellophane, isolant physiquement les deux partenaires tout en permettant l'échange de molécules), Béguiristain a mis en évidence l'existence de molécules diffusibles libérées par les racines d'*Eucalyptus*, capables d'induire une accumulation d'hypaphorine chez *P. tinctorius*. Un composé produit par *Eucalyptus globulus* a récemment été identifié ; Il s'agit de la zéatine, une cytokinine qui induit à la fois la modification des angles de ramification des hyphes, la modification de leur hydrophobicité, mais surtout une suraccumulation d'hypaphorine dans les hyphes de *P. tinctorius* (Lagrange, communication personnelle).

II.6.5. Activités de l'hypaphorine

II.6.5.1. Activités pharmacologiques de l'hypaphorine

L'hypaphorine ayant été détectée chez certaines plantes médicinales (*Erythrina suberosa* Roxb., *Desmodium trifolium* DC, *Desmodium gyrans*, *Sida cordifolia*, *Naucleopsis caloneura*, *Pterocarpus officinalis*, *Glycyrrhiza yunnanensis*), elle a attiré l'attention de nombreux chercheurs. L'activité pharmacologique de l'hypaphorine a été montrée chez le rat et la grenouille. Chez le rat, l'hypaphorine inhibe l'activité insulínase du foie (Tung et Lee, 1976) et l'activité phosphoénolpyruvate carboxykinase (Lee *et al.*, 1979). Chez la grenouille, elle provoque des convulsions tétaniques (Henry, 1949 ; Shrestha et Bisset, 1991).

II.6.5.2. Activités de l'hypaphorine chez les plantes

Bien que l'hypaphorine ait été découverte depuis longtemps, son rôle chez les plantes est mal connu. Toutefois, des auteurs rapportent que l'hypaphorine peut jouer un rôle protecteur dans les graines où elle est accumulée. En effet, Janzen *et al.* (1982) ont montré que la présence d'hypaphorine dans les graines de *Pterocarpus officinalis* les rendait impropres à la consommation par les petits mammifères du parc national de Corcovado au Costa – Rica. De même, les graines de *Abrus precatorius* L. sont protégées des attaques d'insectes grâce à l'accumulation d'hypaphorine. Dans ce cas, l'hypaphorine va rendre stériles les femelles de certains insectes (Dimetry *et al.*, 1992).

II.6.5.3. Activité de l'hypaphorine en tant que composés à azote quaternaire

L'hypaphorine est un tryptophane bétaine, c'est-à-dire qu'elle est constituée d'un noyau indole et d'un groupement bétaine (Fig. 4). Ce dernier possède un azote quaternaire.

Les composés à azote quaternaire peuvent agir en tant qu'osmolytes (glycinebétaine, β -alaninebétaine, prolinebétaine, hydroxyprolinebétaine, pipecolabétaine (Béguiristain, 1996)). Chez les champignons par exemple, les osmolytes les plus courant sont des polyols, des acides aminés ou des dérivés d'acides aminés (Blomberg et Adler, 1992). D'après Rhodes et Hanson (1993), les osmolytes accumulés dans le cytoplasme, empêchent la dénaturation des protéines en maintenant leur couche d'hydratation. Cependant les expériences menées par Béguiristain au cours de son travail de thèse ont montré que l'hypaphorine ne jouait pas le rôle d'osmolyte lorsque *Pisolithus tinctorius* était soumis à un stress hydrique. La teneur en hypaphorine dans les hyphes était même plutôt réduite dans ces conditions.

Les composés à azote quaternaire peuvent agir comme des régulateurs de croissance des végétaux (ce sont : les dérivés du 2-diméthylamino-1-cyclohexanol, la choline et la trigonelline). Bien qu'ils inhibent la croissance du concombre et du trèfle, ils peuvent par ailleurs stimuler la croissance du pamplemousse (Newhall *et al.*, 1975). Des composés comme la choline et la bétaine régulent la croissance et la ramification des hyphes de *Fusarium graminearum* (Strange et Smith, 1971 ; Strange et Mayer, 1974), un champignon filamenteux parasite du blé. Cependant, Béguiristain a montré que l'hypaphorine à faible dose reste sans effet sur la croissance radiale des colonies de *Fusarium graminearum*. En revanche à partir de 500 μ M, l'hypaphorine a un effet différent de celui de la choline ou de la bétaine, il réduit significativement l'allongement des hyphes entre deux ramifications. Ces résultats montrent que l'hypaphorine appliquée de manière exogène peut affecter la morphologie des hyphes de champignons qui ne produisent pas d'hypaphorine. Mais cette activité ne semble pas être liée au groupement à azote quaternaire de la molécule. De même, concernant *Pisolithus tinctorius*, l'hypaphorine est soit sans activité sur la ramification des hyphes, soit la réduit. Béguiristain a donc suggéré que l'hypaphorine ne contrôle vraisemblablement pas le développement des hyphes colonisant la racine et notamment la ramification des hyphes à la surface de la racine, lors de la formation du manteau fongique.

II.6.5.4. Rôle de l'hypaphorine en tant que composé de type auxinique

De par sa nature indolique, l'hypaphorine pourrait avoir une activité de type auxinique. Selon Hofinger *et al.* (1970), l'hypaphorine est le précurseur de la principale auxine présente dans les racines de lentille (*Lens culinaris*), l'acide indole acrylique (AIAcyl). L'hypaphorine aurait une activité de type auxinique chez cette plante en inhibant la croissance des racines (maximum d'inhibition : 20% entre 10 et 100 μ M) (Hofinger *et al.*, 1976). De plus, Nehls *et al.* (1999) ont mis en évidence l'existence d'un gène (*EgHypar*) surexprimé lors de la mise place de l'ectomycorhize (paragraphe V.2.). Ils ont montré que l'expression de ce gène était régulé de façon identique par des auxines comme l'AIA et le 2,4 D, et par de l'hypaphorine.

Il est bien connu que les auxines, apportées à forte dose dans le milieu de culture, inhibent la croissance de la racine principale et stimulent la formation de racines latérales. Cependant, bien que l'hypaphorine ait une activité de type auxinique sur l'expression du gène racinaire *EgHypar*, ce composé (même à très forte concentration) ne présente pas d'activité sur la croissance et l'architecture des racines d'*Eucalyptus* (Béguiristain *et al.*, 1997). La seule activité morphogène rapportée, est une forte réduction de la taille des poils absorbants (Béguiristain *et al.*, 1997). Ainsi, l'hypaphorine n'a pas d'activité auxinique sur les processus développementaux connus pour être régulés par cette hormone.

C - Objectifs du travail de thèse

Alors que l'hypaphorine inhibe fortement l'allongement des poils absorbants, il a été rapporté une légère stimulation de la croissance des poils absorbants par l'AIA (Jackson, 1960) et par le 2,4 D (Annexes, Fig. 1) (Ridge, 1995 ; Béguiristain et Lapeyrie, 1997). Par ailleurs, la présence dans le milieu de culture d'un antagoniste de l'AIA, l'acide chlofibrique ou PCIB (Annexes, Fig. 1) inhibe l'allongement des poils absorbants d'*Arabidopsis thaliana* (Bates et Lynch 1996). Ces derniers auteurs ont donc suggéré que le développement normal d'un poil absorbant nécessiterait le maintien d'une concentration optimale en AIA dans la cellule.

En conséquence, considérant que l'hypaphorine inhibe l'allongement des poils absorbants, et que l'hypaphorine n'a pas d'activité auxinique sur la croissance et la ramification de la racine, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'hypaphorine aurait une activité opposée à celle de l'auxine dans les tissus de la plante. Notre travail au cours de cette thèse a donc consisté à tester cette hypothèse.

Afin d'analyser les mécanismes qui aboutissent à la formation de poils absorbants de taille réduite en présence d'hypaphorine, nous allons suivre la vitesse de croissance des poils sur des temps courts de l'ordre de quelques minutes. Une altération de la croissance des poils pourrait impliquer une réorganisation du cytosquelette, la structure des filaments d'actine sera donc suivie au cours des traitements.

En utilisant la propriété que possède l'AIA d'inhiber le développement de la racine principale lorsqu'elle est apportée à forte dose, nous tenterons de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les deux molécules qui toutes deux possèdent un noyau indole. Nous envisagerons entre autres une éventuelle activité régulatrice de l'hypaphorine sur le transport de l'AIA endogène.

Par la suite, nous chercherons à vérifier si le champignon producteur d'hypaphorine *Pisolithus tinctorius*, possède une activité régulatrice au cours du développement de la symbiose.

METHODOLOGIE

Ce chapitre présente de manière succincte le matériel expérimental, la méthodologie utilisée et sa justification. Il complète les informations données dans chaque partie de la section résultat.

A. Le modèle *Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius*

I. Le Matériel fongique

Le champignon ectomycorhizien utilisé au cours de ce travail de thèse est le Gastéromycète *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch. La souche 441 “moins agressive”, a été isolée à partir d’un carpophore prélevé sous *Eucalyptus citriodora* au Brésil par le Dr M. Ivory (Université d’Oxford). La souche 2144 “plus agressive” a quant à elle, été isolée d’un carpophore collecté sous *Eucalyptus sp.* en Australie. L’agressivité est définie comme la rapidité avec laquelle ces souches colonisent les racines d’*Eucalyptus*, ainsi que leur capacité à induire des réactions de défense (Albrecht, 1994).

Le mycélium végétatif est conservé par repiquage régulier en conditions axéniques, toutes les deux semaines sur milieu gélosé de Pachlewski (Malajczuk *et al.*, 1990) (Annexes, Tableau 2), dans la mycothèque de l’équipe de Microbiologie Forestière (INRA-NANCY). Des implants (Ø 5 mm) des deux isolats du champignon sont prélevés à l’aide d’un emporte-pièce au niveau de la périphérie de la colonie fongique, zone dans laquelle les hyphes sont jeunes et en croissance. Ils sont ensuite déposés, le mycélium soit directement en contact avec le milieu, soit séparé du milieu par une membrane de Cellophane traitée à l’EDTA (0,37 g/l), sur un milieu gélosé frais (Hilbert, 1989). Le champignon est mis à croître à l’obscurité à 25 °C pendant 2 semaines.

II. Le matériel végétal

La plante hôte utilisée au cours de cette étude est *Eucalyptus globulus* sous espèce *bicostata* (Maid *et al.*) Kirkp., originaire de la Nouvelle Galles du Sud (Australie).

Les mycorhizes d’*Eucalyptus* ont fait l’objet de nombreuses études cytologiques et anatomiques (Malajczuk *et al.*, 1982, 1984 ; Lei et Dexheimer, 1988 ; Horan *et al.*, 1988 ; Dell, 1994). Ceci permet de disposer d’une somme importante d’informations et de les intégrer dans l’élaboration d’un modèle décrivant les mécanismes de reconnaissance mis en œuvres par les deux partenaires.

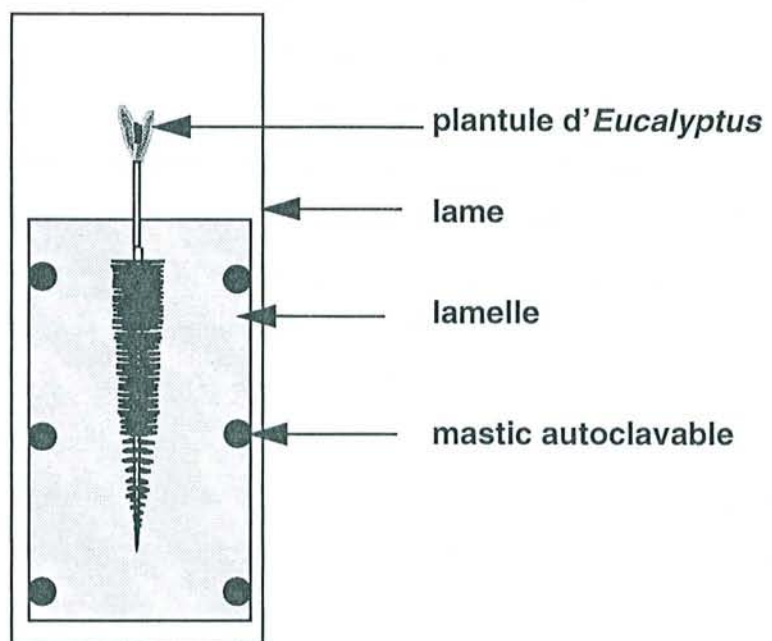


Figure 5 : Dispositif de mesure. Plantules d'*Eucalyptus* en croissance entre lame et lamelle.

Les graines d'*Eucalyptus globulus* sont prélevées sur une dizaine d'arbres semanciers à Mt. Nulo (Nouvelles Galles du Sud, Australie), et fournies par Kilysa Seeds (Weston Creek, Australie). Les graines placées dans une boule à thé, sont désinfectées pendant 5 minutes dans une solution d'éthanol à 50% (v/v), puis pendant 30 minutes dans un bain d'hypochlorite de calcium à 20% (p/v), sous agitation modérée, avant d'être abondamment rincées dans plusieurs volumes d'eau ultra pure stérile (au moins 2,5 l). Les graines sont déposées dans des boîtes de Pétri, sur un milieu gélosé (qui sera décrit suivant les expériences). Les boîtes sont ensuite refermées avec une bande de Parafilm sur seulement 90% de leur circonférence, afin de favoriser les échanges gazeux entre l'intérieur de la boîte et l'extérieur. Dans un premier temps, les graines sont mises à germer pendant 2 jours à l'obscurité (25 °C). Puis les boîtes contenant les germinations sont transférées en chambre de culture à 25 °C avec 16 h de jour ($200 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et 8 h de nuit.

B. Etude de la croissance des poils absorbants

Au cours de son travail de thèse, T. Béguiristain a montré que l'hypaphorine, la bêtaïne du tryptophane synthétisée et accumulée par *Pisolithus tinctorius* était capable de réduire fortement la taille des poils absorbants d'*Eucalyptus globulus*. Cette activité est opposée à celle des auxines. En effet, il a été rapporté une légère stimulation de la croissance des poils absorbants par des auxines comme l'AIA (Jackson, 1960) ou le 2,4 D (Ridge, 1995 ; Béguiristain et Lapeyrie, 1997).

Pour étudier plus en détail le mécanisme par lequel l'hypaphorine réduit la croissance des poils absorbants, les activités de l'hypaphorine et de l'AIA ont été comparées. Pour cela, l'évolution de la vitesse d'allongement des poils absorbants d'*Eucalyptus* a été suivie au cours de période de 3 heures.

I. Dispositif de mesure de la vitesse d'allongement des poils absorbants

La mesure de la vitesse d'allongement des poils absorbants a été effectuée sur des plantules d'*Eucalyptus globulus* en croissance entre lame et lamelle (Fig. 5). Après la germination des graines (selon la méthode décrite précédemment), des plantules d'*Eucalyptus* sont transférées dans un milieu de Pachlewski liquide (sans Agar et sans glucose) (Annexes,

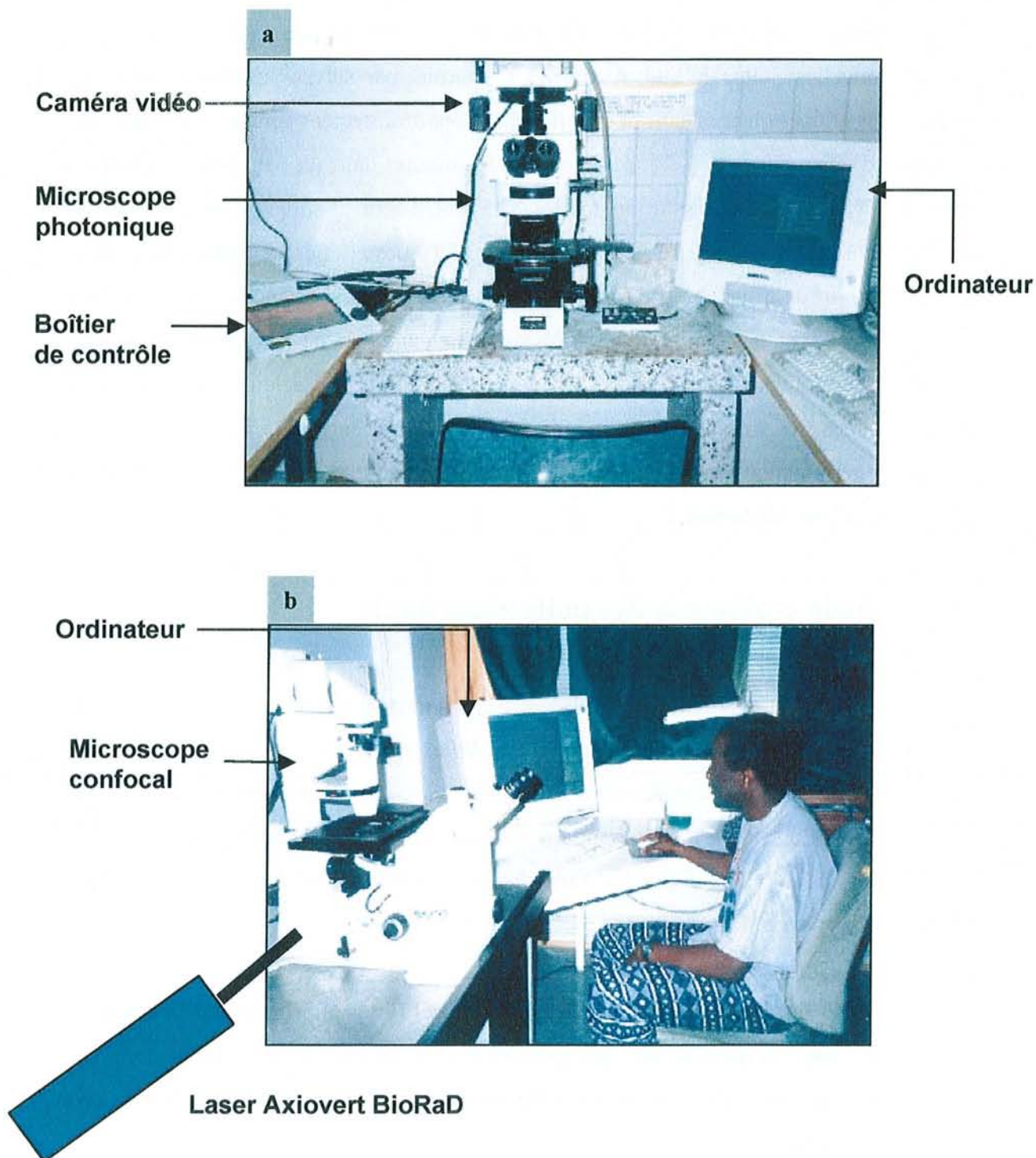


Figure 6 : (a) Dispositif utilisé pour la mesure de l'allongement des poils absorbants. (b) Microscope confocal utilisé pour la visualisation des filaments d'actine dans les poils absorbants.

Tableau 3), la racine principale s'allongeant entre lame et lamelle. La lame et la lamelle sont liées l'une à l'autre à l'aide d'un mastic autoclavable (Sodicam S.A., France). La vitesse de croissance des poils absorbants est mesurée sur des plantules âgées de 7 jours, dans la zone d'élongation des poils absorbants (les 3 derniers mm à l'apex de la racine), toutes les 15 minutes pendant 2 à 3 heures, à l'aide d'un microscope photonique relié à une caméra vidéo et à un ordinateur (Fig. 6 a). Lors de l'application des différents traitements, après 45 minutes, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais (pour les témoins), ou par du milieu de culture contenant de l'hypaphorine, du tryptophane. Pour étudier les interactions hypaphorine / auxine, 45 minutes après un premier remplacement du milieu de culture par du milieu contenant 250 μ M hypaphorine, le milieu de culture est remplacé une seconde fois, soit par une solution de milieu frais (pour les témoins), soit par solution contenant de 0.01 à 10 μ M d'AIA.

II. Visualisation des filaments d'actine

Chez les plantes, les filaments d'actine sont présumés jouer un rôle essentiel dans de nombreux processus aussi importants que la division cellulaire, la réponse aux pathogènes, les tropismes (Walker et Sack, 1995), ou l'organisation de structures cytoplasmiques lors des mécanismes d'élongation cellulaire (Thimann *et al.*, 1992). C'est ainsi que de nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle des filaments d'actine au cours de la morphogenèse des poils absorbants (Cardenas *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 1999). L'hypaphorine, à l'instar des facteurs nod (pour une revue lire Schultze *et al.*, 1994 ; Mylona *et al.*, 1995 ; Démarié *et al.*, 1996), perturbe la croissance des poils absorbants tout en induisant des déformations à l'apex des poils. D'après Cardenas *et al.* (1998) puis Miller *et al.* (1999), de telles déformations devraient impliquer une réorganisation des filaments d'actine. C'est pourquoi nous avons entrepris de visualiser les filaments d'actine dans les poils absorbants de racines incubées en présence d'hypaphorine.

Procédure expérimentale

Les plantules d'*Eucalyptus globulus* mises en croissance entre lame et lamelle (2 par lames) sont sectionnées dans 5 ml de tampon stabilisateur (Annexes, Tableau 4) et les racines, conservées dans ce tampon pendant 5 minutes. Les racines sont ensuite fixées sous vide dans le même tampon contenant 4 % formaldéhyde et 12 % DMSO pendant 2 à 3 minutes, puis

conservées pendant 60 minutes à la température de la pièce. Après fixation, elles sont rincées à 5 reprises (5 minutes par lavage) dans 10 ml de tampon stabilisateur (Annexes, Tableau 4).

Afin de visualiser les filaments d'actine, les racines ont été incubées dans la solution de marquage (Annexes, Tableau 5) contenant 0,33 μM rhodamine phalloïdine. Le cytosquelette des poils absorbants a été étudié à l'aide d'un microscope confocal.

Cette étude permettra de confirmer que même sur des temps courts, l'hypaphorine réduit fortement la vitesse de croissance des poils (voir section Résultats n°I). De plus, cette inhibition peut être levée par un apport d'AIA exogène dans le milieu (voir section Résultats n°I), ce qui suggère fortement l'existence d'un antagonisme entre l'hypaphorine et l'AIA.

C. Mise en évidence de l'antagonisme entre l'hypaphorine et l'AIA.

Afin de confirmer l'existence d'un antagonisme entre l'hypaphorine et l'AIA, nous avons utilisé la propriété que possèdent les auxines d'inhiber l'allongement du pivot lorsqu'elles sont apportées à forte dose.

Au cours de cette étude, entre 13 et 17 graines d'*Eucalyptus* ont été mises à germer dans des boîtes de Pétri (diamètre 140 mm), sur une feuille de Cellophane, en contact avec du milieu de Pachlewski modifié (Annexes, Tableau 2 B) contenant ou non 1 μM AIA, 1 μM 2,4 D, 50 μM ANA, 100 μM tryptophane ou 100 μM hypaphorine, et dans certains cas des associations hypaphorine – auxine. Après germination des graines, les boîtes sont transférées en chambre de culture. La mesure de la taille des pivots a été effectuée sur des plantules âgées au moins de 7 jours. Depuis le dépôt des graines jusqu'à la lecture des résultats, les boîtes de Pétri ont été maintenues en position verticale, légèrement inclinées, afin de permettre un bon allongement du pivot.

Cette étude permettra de montrer que l'hypaphorine est bien un antagoniste de l'AIA, en effet, elle restaure la croissance du pivot inhibée par l'AIA (voir section Résultats n°III). Dès lors, une question se pose avec acuité : Pisolithus tinctorius le champignon producteur d'hypaphorine possède-t'il une activité anti-AIA ? Pour répondre à cette question, l'inhibition par l'AIA de l'allongement du pivot ne peut plus servir de test de référence car le

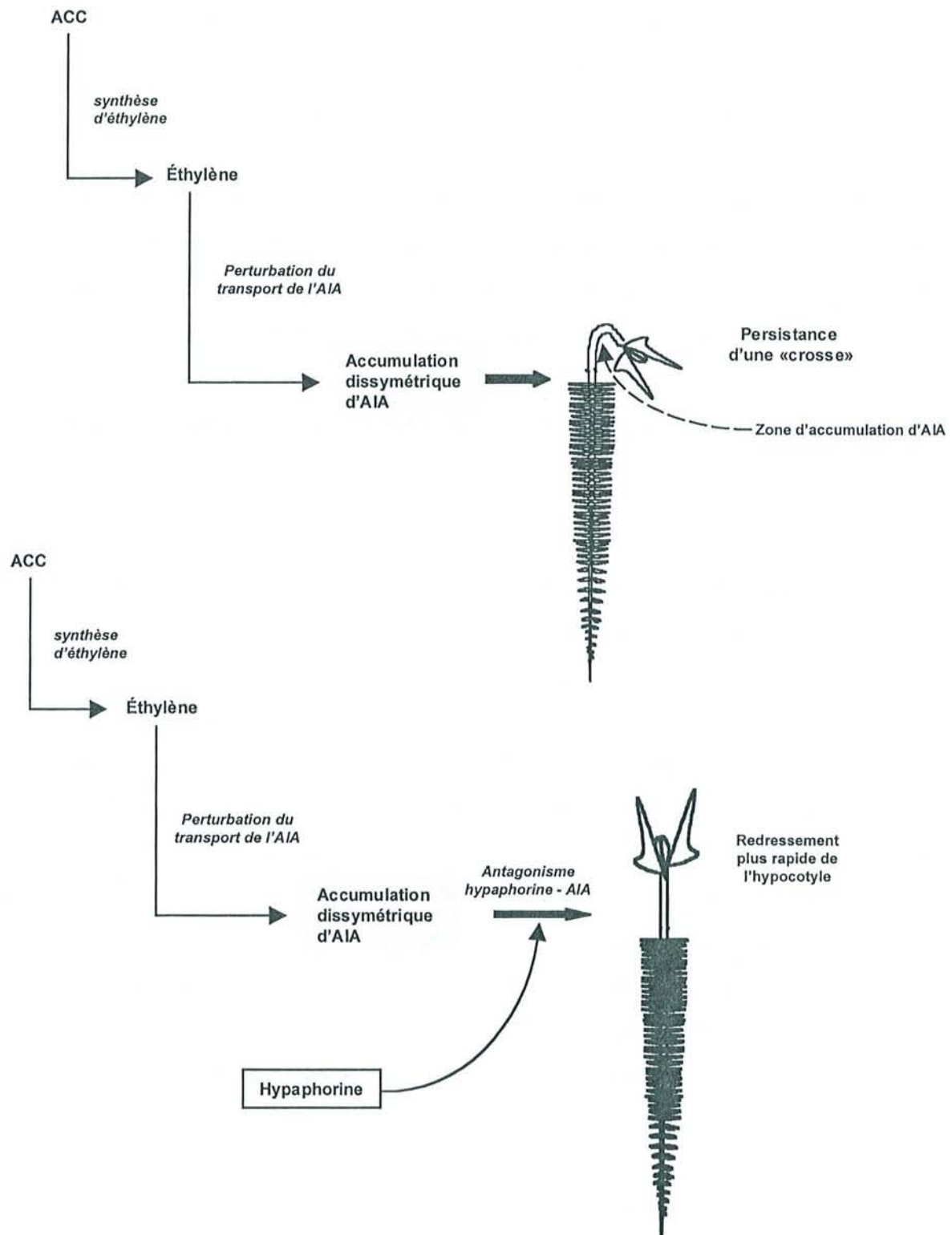


Figure 7 : Interaction hypaphorine / AIA sur le développement des hypocotyles de plantules d'*Eucalyptus* mise en croissance en présence d'ACC.

champignon, lors de la formation du manteau et de la mycorhize, perturbe lui-même fortement l'allongement de la racine d'Eucalyptus.

Pour mettre en évidence une interaction entre l'hypaphorine fongique et l'AIA endogène de la plante, nous avons utilisé la propriété que possède l'éthylène de perturber le transport de l'AIA endogène. En effet, d'après Goeschl *et al.* (1967), puis Smalle et Van Der Straeten (1997), l'éthylène va induire une accumulation différentielle d'AIA dans l'hypocotyle ; cette accumulation va entraîner une croissance différentielle des cellules de l'hypocotyle, provoquant la formation d'une "crosse" (Fig. 7). D'après ces mêmes auteurs, l'ouverture de la crosse à la lumière quant à elle, va résulter d'une accélération de la croissance des cellules situées dans la face interne de la crosse. Dès lors, si l'hypaphorine et le champignon possèdent une activité anti-AIA, elle se traduira par un redressement plus rapide des hypocotyles des plantules dont les racines auront été incubées en présence d'hypaphorine ou colonisées par les hyphes du champignon. Dans ces conditions, le site d'induction (les racines colonisées, sera distinct du site d'expression du phénotype (l'hypocotyle).

I. Traitements et germination des graines

Au cours de cette expérience, l'ACC (Amino cyclopropanecarboxylic acid), le précurseur immédiat de la synthèse d'éthylène dans les tissus des plantes (Fig. 8 a), a été apporté dans le milieu de culture. De plus, du fait de la présence éventuelle du champignon dans les boîtes de Pétri, du glucose (5 mM) a été ajouté au milieu de culture (Annexes, Tableau 2 B).

Des boîtes de Pétri contenant 10 μ M d'ACC ont été soit complétées avec un apport d'hypaphorine (100 et 500 μ M), soit inoculées avec 4 implants fongiques de deux souches de *Pisolithus* (*Pisolithus tinctorius* 441 et *Pisolithus tinctorius* 2144), répartis dans la partie basale des boîtes. Les colonies ont été mises en croissance à l'obscurité pendant 2 semaines à 25 °C à l'obscurité avant l'introduction des graines d'*Eucalyptus*. Toutes les boîtes, "scellées" avec une bande de Parafilm (sur 90% de leur circonférence) et maintenues verticalement comme précédemment décrit, ont été incubées à l'obscurité afin de permettre la germination des graines. Moins de trois jours ont été nécessaires pour que la racine émerge et entre en contact avec la colonie fongique. Les boîtes ont été ensuite transférées en chambre de culture,

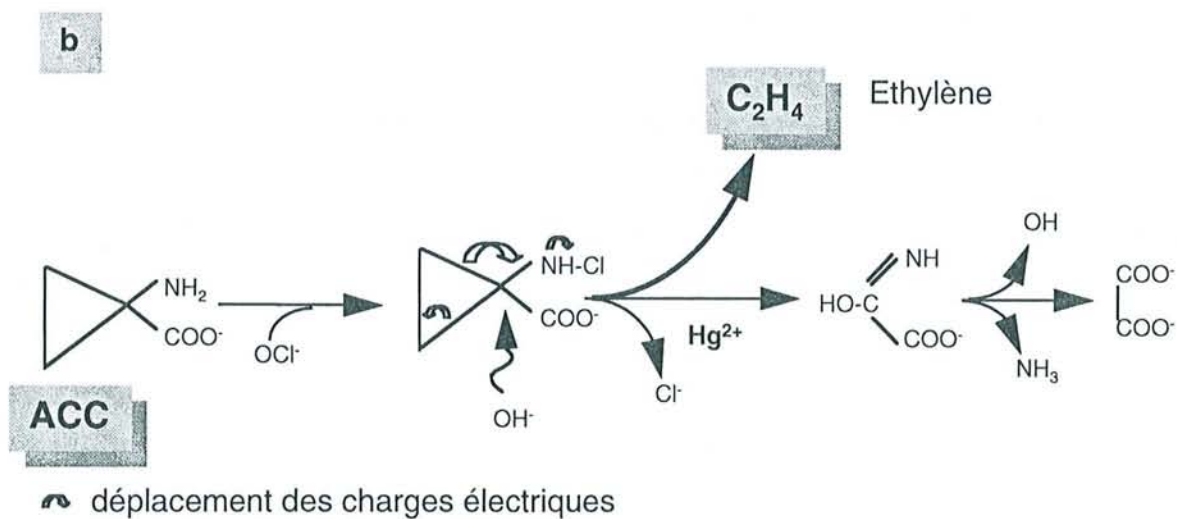
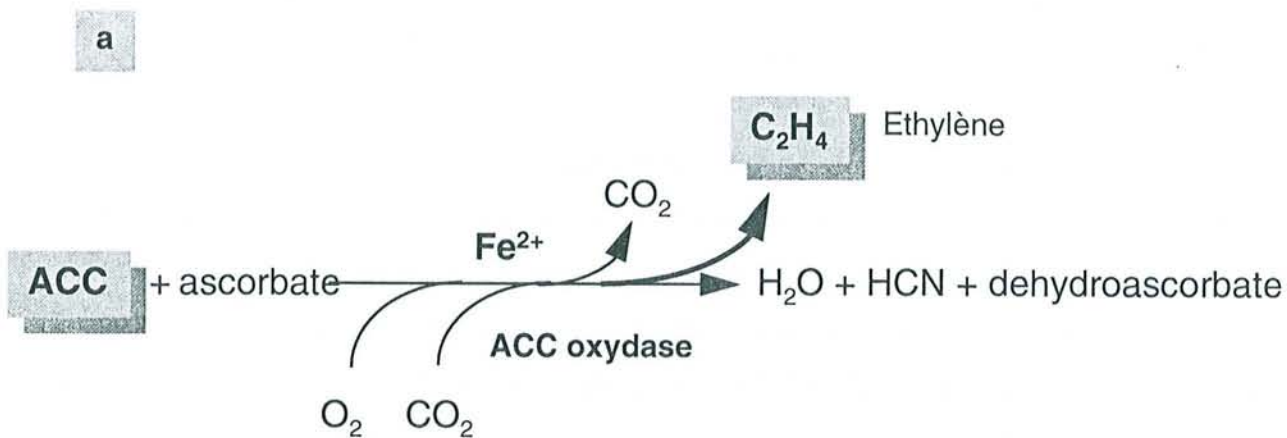


Figure 8 : Synthèse de l'éthylène à partir de l'ACC. a, sythèse d'éthylène dans les tissus de la plante. b, synhtèse chimique d'éthylène (d'après Lizada et Yang, 1979).

l'enregistrement de la cinétique redressement des hypocotyles est effectué entre 7 et 20 jours après germination.

II. Évaluation du rôle éventuel du CO₂

Puisqu'il a été rapporté que le CO₂ possède une activité anti-éthylène (John, 1997), pour certains traitements en présence d'ACC (voir section résultats n°III), des boîtes "non scellées" ont été utilisées afin d'augmenter les échanges gazeux avec le milieu extérieur et de réduire l'accumulation de CO₂ qui résulterait de la respiration fongique.

III. Évaluation du rôle d'éventuelles substances volatiles

Il est possible qu'une substance volatile (le CO₂ ou une autre molécule inconnue) produite par le champignon puisse avoir une activité anti-éthylène. Pour tester cette hypothèse, des boîtes de Pétri ont été divisées en deux compartiments verticaux, par l'intermédiaire d'une tranchée faite dans l'Agar, évitant ainsi tout contact entre hyphes et racines (voir section résultats n° III).

IV. Évaluation de l'éventuelle dégradation de l'ACC par *Pisolithus tinctorius*

Puisque l'ACC pourrait avoir été métabolisé par le champignon, nous avons mesuré la concentration en ACC, dans le milieu de culture à la fin des expériences. Pour cela, des portions d'Agar équivalent à la moitié de la boîte de Pétri, ont été congelées, décongelées puis centrifugées. Le surnageant a été analysé par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de Lizada et Yang (1979).

Il s'agit d'un dosage basé sur la transformation chimique l'ACC en éthylène, en présence de NaOCl et d'ions Hg²⁺ (catalyseurs) (Fig. 8 b). La quantification de l'éthylène libérée au cours de cette réaction permet de déterminer la concentration en ACC dans les boîtes de Pétri. Ce dosage a été effectué dans des tubes d'hémolyse (5 ml). Une μ mole d'HgCl₂ est ajoutée à la solution contenant de l'ACC, puis le volume est amené à 900 μ l avec de l'eau distillée. Les tubes sont ensuite bouchés hermétiquement et conservés dans de la glace. Approximativement 10 gouttes (100 μ l) d'une solution glacée, comprenant 45 μ moles d'une solution de NaOCl (eau de Javel du commerce à 5%), saturée en NaOH (2:1, v / v), est

injectée au travers du bouchon à l'aide d'une seringue de 1 ml munie d'une aiguille de calibre 25. Les tubes sont immédiatement "vortexés" puis incubés dans de la glace pendant 2,5 minutes. Par la suite, les tubes sont de nouveau agités pendant 5 secondes avant le prélèvement gazeux (0,5 ml).

Le dosage de l'éthylène s'effectue par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne en aluminium (3 mm x 1 m) et avec un détecteur d'ionisation à flamme. La colonne est maintenue à une température de 80 °C. Une gamme étalon est effectuée à l'aide d'une solution d'ACC de concentration connue.

D. Activité de l'hypaphorine sur le transport de l'AIA. Étude du gravitropisme

Cette étude repose sur le fait qu'une racine soumise à une modification de la gravité va, après perception du signal réorienter sa croissance dans la nouvelle direction de la gravité. Cholodny-Went (1937), ont proposé une théorie pour expliquer la réponse gravitropique. Ainsi, une modification des taux de croissance basée sur une redistribution de l'auxine à l'intérieur des tissus de la plante, serait responsable de la réponse gravitropique (Chen *et al.*, 1999 ; Rashotte *et al.*, 2000).

La perception de la gravité s'effectue par l'intermédiaire des statocytes. Ce sont de grosses cellules de la coiffe possédant des amyloplastès très denses, qui vont sédimenter en cas de modification de la gravité. Ces "capteurs gravitationnels" sont connus sous le nom de statolithes. Si la perception de la gravité a lieu au niveau de la coiffe, la courbure racinaire elle, se produit en amont de l'apex de la racine, dans la zone d'élongation. C'est un messager chimique qui permettrait d'établir la communication entre la coiffe et la zone de courbure. L'auxine en provenance de la coiffe, serait le messager chimique responsable en amont de la réponse gravitropique (Young *et al.*, 1990 ; Chen *et al.*, 1999 ; Rashotte *et al.*, 2000). D'après, Hasenstein et Evans (1988) (Fig. 9), lorsque la racine est orientée verticalement, les statolithes reposent sur la face inférieure des cellules, dans le sens de la gravité. L'AIA synthétisée dans la tige et transportée vers les racines via les cellules de la stèle serait distribuée de manière égale dans toutes les cellules de l'apex racinaire. Cette auxine provenant de la partie aérienne

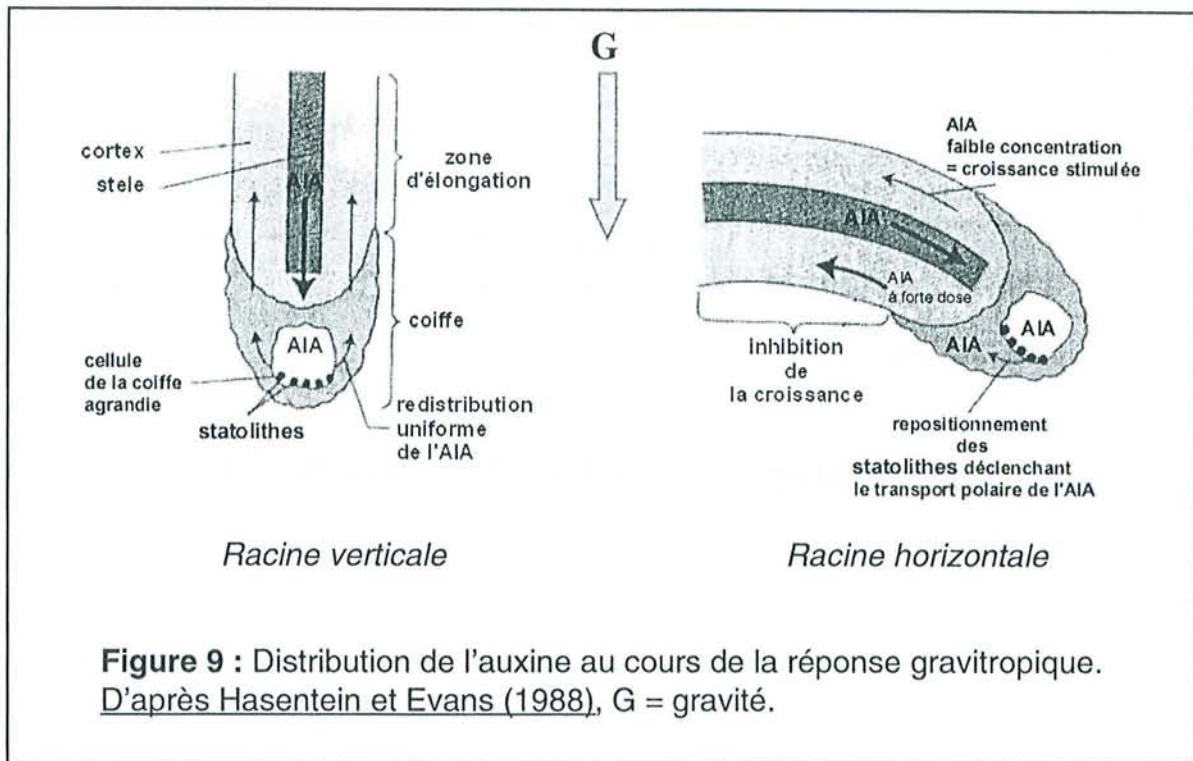


Figure 9 : Distribution de l'auxine au cours de la réponse gravitropique. D'après Hasentein et Evans (1988), G = gravité.

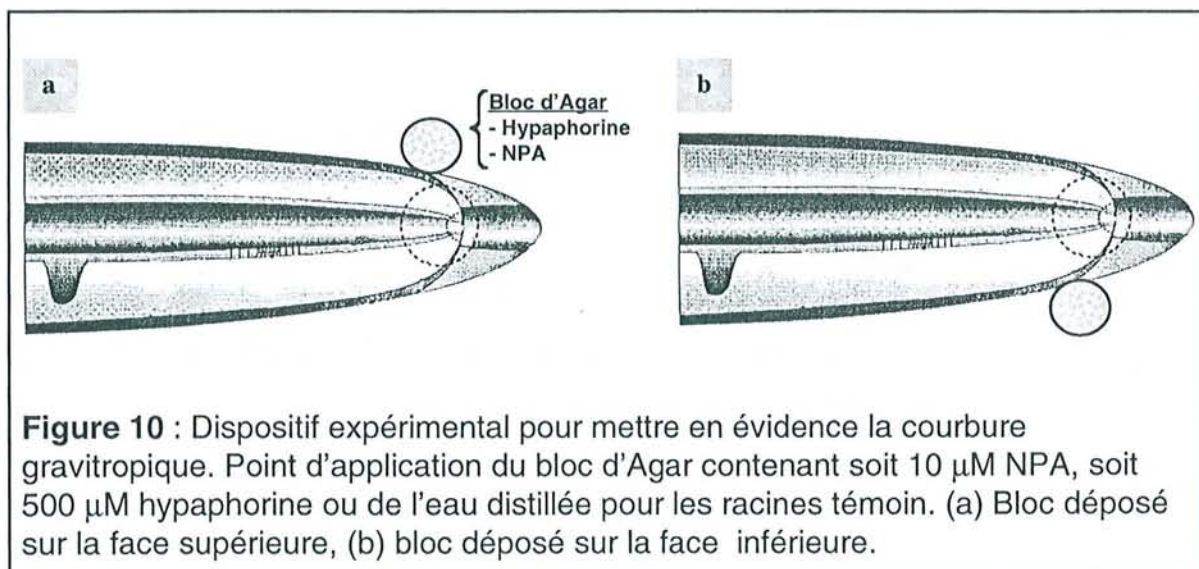


Figure 10 : Dispositif expérimental pour mettre en évidence la courbure gravitropique. Point d'application du bloc d'Agar contenant soit 10 μM NPA, soit 500 μM hypaphorine ou de l'eau distillée pour les racines témoin. (a) Bloc déposé sur la face supérieure, (b) bloc déposé sur la face inférieure.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

RESULTATS

Les résultats sont présentés sous forme de publications rédigées en anglais et précédées d'un résumé en français, à l'exception de la section résultat n°IV.

associée à celle synthétisée par les cellules de l'apex racinaire (Müller *et al.*, 1998) serait par la suite, transportée de manière basipète (de l'apex de la racine vers le collet) à l'intérieur du cortex racinaire jusqu'à la zone d'élongation où elle régulerait l'élongation cellulaire. En revanche, lorsque les racines sont orientées horizontalement, la sédimentation des statolithes sur une des faces de la cellule, orienterait le transport de l'auxine vers la face inférieure de la coiffe. Puis la majeure partie de l'auxine accumulée dans cette zone, serait transportée de manière basipète en direction de la zone d'élongation, vers la face inférieure de la racine. L'accumulation de l'AIA dans ces tissus inhiberait l'élongation des cellules situées dans cette zone, alors que la faible concentration en auxine sur la face supérieure, stimulerait l'allongement des cellules. Cette répartition dissymétrique de l'auxine dans ces tissus serait à l'origine de cette courbure en direction de la gravité. La réponse gravitropique nécessite donc que de l'AIA soit transportée au sein des tissus de l'apex racinaire.

Dans le but d'étudier l'activité de l'hypaphorine sur le transport de l'AIA, nous avons comparé l'activité de l'hypaphorine sur la réponse gravitropique des racines d'*Eucalyptus* avec celle d'un inhibiteur du transport de l'AIA, le NPA connu pour affecter la courbure gravitropique (Rashotte *et al.*, 2000).

Après germination des graines selon la méthode décrite ci-dessus, des blocs d'Agar de (2,1 mm³ de volume) contenant soit 500 µM d'hypaphorine, soit 10 µM de NPA, ou de l'eau distillée (pour les traitements témoins) ont été déposés au contact de la racine (indifféremment sur ce qui sera la face supérieure ou la face inférieure des racines après rotation), 2 à 3 mm en amont de l'apex des racines de plantes âgées de 7 jours (Fig. 10 a, b). Les boîtes de Pétri ont ensuite subi une rotation afin d'orienter les racines horizontalement et d'induire ainsi la courbure gravitropique. Les angles de courbure ont été mesurés après 24 heures de culture en chambre climatisée.

La page 44 de la thèse n'existe pas

Résultat n° I

La croissance des poils absorbants est inhibée par l'hypaphorine, l'alcaloïde indolique présent dans les hyphes du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*, et restaurée par un apport d'AIA dans le milieu de culture.

Franck Anicet Ditengou, Thierry Béguiristain et Frédéric Lapeyrie

Planta, publication acceptée

L'hypaphorine, le composé indolique majeur isolé des hyphes du champignon *Pisolithus tinctorius*, contrôle la vitesse de croissance des poils absorbants. À la concentration de 100 μ M, l'hypaphorine induit rapidement un ralentissement de la vitesse de croissance des poils absorbants. A cette concentration (100 μ M), l'hypaphorine induit également une déformation transitoire de l'apex des poils absorbants ; déformation qui s'apparente à ce que l'on peut observer lorsque des cellules à croissance apicale comme les tubes polliniques ou des hyphes sont incubés en présence de molécules perturbant les flux de calcium.

À des concentrations plus élevées (500 μ M et plus), l'hypaphorine arrête la croissance des poils absorbants, 15 minutes seulement après son apport dans le milieu de culture. Cependant, l'initiation de nouveaux poils absorbants n'est pas affectée, et cela, même à des concentrations très élevées (1 mM). D'autre part, l'activité de l'hypaphorine est dans une certaine mesure spécifique, elle ne peut être mimée par l'AIA ou le tryptophane.

Alors que l'AIA n'a pas d'activité sur l'élongation des poils absorbants, un apport d'AIA est capable de restaurer la croissance apicale de poils absorbants préalablement inhibés par l'hypaphorine. Ce dernier résultat suggère que l'hypaphorine et l'AIA endogène interagissent spécifiquement pour contrôler la croissance des poils absorbants. Ainsi, lors du développement des ectomycorhizes, l'absence des poils absorbants pourrait être dû en partie à une libération par le champignon de molécules inhibitrices, comme l'hypaphorine.

Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by IAA

Franck Anicet Ditengou, Thierry Béguiristain ¹, Frédéric Lapeyrie

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

Running title: F.A. Ditengou *et al.*: Hypaphorine-IAA interaction on root hair elongation

¹ *Present address:* Departamento Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Investigación y Desarrollo, Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona, Spain

Abbreviations: IAA = indole-3-acetic acid

Correspondence to: F. Lapeyrie; E-mail: lapeyrie@nancy.inra.fr Fax: 33 3 83 39 40 69

Planta

An International Journal of Plant Biology
Springer International

Professor Dr. A. Sievers

Managing Editor

Botanisches Institut
Universität Bonn
Venusbergweg 22
D-53115 Bonn
Germany

Tel.: +49-228-73 2685
Fax: +49-228-73 2677
E-mail: unb10e@uni-bonn.de

Dr. F. Lapeyrie
Centre de Recherches de Nancy
INRA

F-54280 Champenoux

14 March 2000

Re.: Ditengou et al., Root hair elongation....

Dear Dr. Lapeyrie,

Your manuscript has been accepted for PLANTA and will be sent to the publisher.

In case the Language Editor changes your manuscript considerably, we will return it to you for re-typing in order to facilitate printing. Otherwise, please make sure (when reading the proofs) that you agree with all changes made in your manuscript. Even though we try our best to assist you in improving the manuscript, it might occur occasionally that our corrections no longer agree with the precise meaning you have intended.

Yours sincerely,



A. Sievers

Abstract. Hypaphorine, the major indolic compound isolated from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, controls root hair elongation rate. At inhibitory concentrations (100 μ M), hypaphorine induces a transitory root hair tip swelling. Then, when the tip polar growth resumed a characteristic deformation was still visible on elongated hairs. At higher hypaphorine concentrations (500 μ M and greater), root hair elongation stops, only 15 min after application. However root hair initiation from trichoblasts is not affected by hypaphorine. Hypaphorine activity could not be mimicked by related molecules such as IAA or tryptophan. While IAA had no activity on root hair elongation, IAA was able to restore root hair polar growth following inhibition by hypaphorine. These results suggest that hypaphorine and endogenous IAA counteract to control root hair elongation. During ectomycorrhiza development, the absence of root hairs might be due in part to fungal release of root hair elongation inhibiting molecules, such as hypaphorine.

Key words: Indol Acetic Acid - Hypaphorine - Root hair - Ectomycorrhiza, Signal - Tryptophan betaine

Introduction

The development of ectomycorrhizae, a symbiotic association between soil fungi and roots, involves dramatic changes in root and hypha morphology, which must be tightly controlled in response to molecular signals. Symbiosis-regulated genes and proteins have been characterized in both partners and postulated to be involved in ectomycorrhiza morphogenesis (Martin *et al.* 1997). Among morphological changes undergone by the host plant is the suppression of root hair development.

Root hairs are tubular non-dividing cells that arise and elongate at the surface of roots. It is suggested that they play an important role by increasing the root/soil interface (reviewed in Ridge 1995). Like pollen tubes, fungal hyphae, moss and fern protonemata, root hairs are tip growing cells, which elongate by the addition of cell wall precursors delivered by vesicles from the endomembrane system (Heath 1990; Peterson and Farquhar 1996). The growth of root hairs has been extensively studied, with special regard to the role of the cytoskeleton, ion channels, intracellular ion gradients, plant hormones, and to the interaction with symbiotic microorganisms. Indeed, root hair deformation is the most prominent response of root epidermal cells, to *Rhizobium* infection and this can be induced by specific lipochito-oligosaccharides, the Nod factors (Dénarié and Cullimore 1993).

Little information is available regarding the fate of root hairs during the establishment of mycorrhizal associations. While vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi only occasionally penetrate the root tissues via root hairs, the interaction between ectomycorrhizal fungi and root hairs must be more definite as root hairs are not found in mature ectomycorrhizae (Peterson and Farquhar 1996). Authors have suggested that root hair absence is due to their incorporation into the fungal mantle (Peterson and Farquhar 1996) as close connections between hyphae and root hairs during mantle formation (Massicotte *et al.* 1987) could induce root hairs to collapse by mechanical pressure of hyphae. Such a succession of events could occur *in vitro*, when a massive amount of fungal inoculum is brought in contact with roots bearing numerous fully elongated root hairs (Chilvers *et al.* 1986). However, this is not the way ectomycorrhizae propagate from an initially infected root tip (Fig. 1). Mycorrhizal colonisation of *Eucalyptus* seedlings is initiated in the root cap region and then propagates by an acropetal extension of root and fungal tissue (Horan *et al.* 1988). Only new epidermal cells formed after fungal invasion of the apex are involved in this infection process,

and there is no backward-formation of mycorrhiza along previously differentiated root tissues. According to Chilvers (Chilvers and Prior 1965 ; Chilvers 1968), the epidermal cells of eucalypt, those bearing root hairs in uninfected root portions, elongate radially as a specialised response to the fungus. The Hartig net develops only between these elongated epidermal cells which therefore remain a part of the active ectomycorrhiza. Furthermore, during *Pinus* ectomycorrhiza branching the newly initiated root, emerging from a formerly colonized root, bears fully developed mantle and Hartig net while still inside the tap root cortex, therefore much before root hair initiation/elongation occurs (Tranvan *et al.* 2000). In such circumstances root hairs will not emerge on colonised root surface, suggesting that their development has been inhibited very early either mechanically or chemically, by the fungus.

The major indolic compound accumulating in *Pisolithus tinctorius* mats in pure culture has been identified as hypaphorine, the betaine of tryptophan (Béguiristain *et al.*, 1995). This was the first report of hypaphorine occurring in an ectomycorrhizal fungus or any microorganism in pure culture but hypaphorine, first isolated from seeds of *Erythrina hypaphorus* (Romburgh and Barger, 1911) and reported since in a few other higher plants (for a review see Béguiristain *et al.*, 1995), had earlier been detected in mushroom (*Agaricus arvensis*) (Marklovà and Hais, 1986). Preliminary observations have shown that hypaphorine has a morphogenetic effect on root hairs. Two week-old *Eucalyptus* seedlings growing over agar medium enriched with hypaphorine bear shorter root hair than control seedlings (Béguiristain and Lapeyrie, 1997). The accumulation of hypaphorine in hyphae increases four fold soon after hyphae come in contact with the host plant root surface (Béguiristain and Lapeyrie, 1997). In return, hypaphorine regulates the expression of a plant symbiosis regulated (SR) gene, the *EgHypar* gene, exhibiting a high degree of homology with plant auxin-induced glutathion-*S*-transferase (GST) (Nehls *et al.*, 1998). Such a GST could be involved in auxin metabolism and transport regulation (Marrs, 1996).

To investigate further the inhibition of root hair elongation by hypaphorine, root hair growth has been followed using a video image system. The interaction between IAA and hypaphorine, both indolic molecules, during root hair elongation was tested.

Materials and methods

Biological material.

Seeds of *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* (Kylisa Seeds Co, Weston Creek, Australia) were sterilised with 10% sodium hypochlorite (v/v) for 20 min and rinsed with four changes of sterile water.

Chemicals.

The tryptophan betaine, hypaphorine, was chemically synthesised according to Romburgh and Barger (1911) and Béguiristain *et al.* (1995). Other chemicals, indole-3-acetic acid (IAA) and tryptophan, were purchased from Sigma.

Assessment of root hair initiation on agar medium.

Sterile seeds were plated onto glucose-free Pachlewski medium in 2.0 % agar (2.7 mM di-ammonium tartrate; 7.3 mM KH_2PO_4 ; 2.0 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 2.9 μM thiamine-HCl; 1 ml of Kanieltra Co. trace-element stock solution) supplemented or not with hypaphorine (100 μM). Plates were kept vertically in a controlled environment growth chamber (25°C) with 16 h light (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and 8 h dark for 7 d. Emerging root hairs were quantified (number of root hairs per surface unit of epidermis) in the root hair initiation zone under a light microscope. Data presented are the mean values $\pm$ SD recorded on at least 15 taproot apices per treatment.

Assessment of root hair initiation and elongation in liquid medium.

Seedlings germinated as previously described were transferred into a sterile liquid glucose-free Pachlewski medium (see above), the taproots elongating vertically in between microscope slides and cover glasses. The slide and cover glasses were joined together and maintained approximately 1.5 mm apart with heat resistant mastic (Sodicam S.A., Saint Ouen l'Aumone, 95310 - France). Root hair initiation (number of root hairs per surface unit of epidermis) was estimated in the root hair initiation zone under a light microscope as above, on 7-d-old seedlings cultivated for 24 h in absence or presence (500 μM) of hypaphorine in the nutrient medium. Root hair elongation was recorded on 7-d-old seedlings, near the root tip (elongation zone) every 15 min for 2 or 3 h, under a light microscope linked to a video camera and a computer using the Visilog 5 (Noesis, Courtaboeuf, France) software. For treatment application, the nutrient medium was substituted, after 45 min, with either fresh

nutrient medium (control) or nutrient medium containing hypaphorine (10, 100, 250, 500, 1000 μM). For comparison, tryptophan or IAA were added to the substitution medium. To investigate interactions between hypaphorine and auxin, 45 min after a first nutrient medium substitution with nutrient medium containing hypaphorine (250 μM), the nutrient medium was substituted a second time. Then, either fresh nutrient medium (control), or nutrient medium containing IAA (0.01, 0.1, 1, 5, 10 μM) were introduced in contact with root hairs.

Statistical analysis and replicate experiments.

Three to 6 root hairs were monitored simultaneously on each seedling. Data presented are the mean values recorded on at least 6 root hairs from at least 2 seedlings $\pm$ SD. Between 2 and more than 10 independent replicate experiments were conducted for each treatment, all of them giving similar results. Data were analysed with Abacus Concepts, StatView Student, (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA 1991) software (ANOVA followed by Fisher's Protected Least Significant Difference test, $P=0.05$).

Results

Root hair initiation.

Hypaphorine (100 μM) added to the agar nutrient medium, did not affect significantly *Eucalyptus* root hair initiation (Fig. 2 a). The same conclusion is reached when roots were cultivated in liquid nutrient medium supplemented for 24 h with hypaphorine (500 μM).

Root hair elongation in response to hypaphorine, tryptophan and IAA.

The elongation rate of root hairs in liquid nutrient medium was constant over time, 3 h (Fig. 3 a). The addition of 100 μM hypaphorine to the nutrient medium resulted in a rapid decrease in the polar growth rate of root hairs (Fig. 3 b), a similar trend was recorded with 250 μM (Fig. 5). Hypaphorine at 500 μM stopped root hair elongation only 15 min after medium substitution (Fig. 3 c). Lower concentration of hypaphorine, 10 μM , was inactive, while higher concentration, 1 mM, stopped root hair elongation after 15 min, as recorded with 500 μM (Fig. 3 c). Tryptophan, the indolic amino acid precursor of hypaphorine synthesis in *Pisolithus tinctorius*, was inactive on root hair elongation at the lowest concentration tested (100 μM) (Fig. 3 d). Tryptophan was active at much higher concentration, 1 mM. Tryptophan 1 mM inhibited root hair elongation, as did hypaphorine 100 μM (Fig. 3 b, e). The indolic hormone, IAA had no activity on root hair elongation at any concentration from 1 nM to 1

μM (Fig. 3 f), a very high concentration which inhibit tap root elongation by 60% (Ditengou and Lapeyrie, 2000). Higher IAA concentration, 10 μM , which totally inhibit root emergence out of eucalypt seeds when applied before germination, is required to start inhibiting root hair elongation during short term experiments as those described here.

Root hair deformation.

Hypaphorine (100 and 500 μM) not only reduced root hair elongation; it also induced swelling of some root hair tips observed after 90 min (Fig. 4a, b). In most cases, at the lower hypaphorine concentration (100 μM) the swelling was transitory. Typically, 15 min after hypaphorine introduction the root hair tip started to swell (Fig. 4c, d, e, f), then the tip polar growth resumed 15 min later. A characteristic deformation was still visible on elongated hairs 45 min after hypaphorine treatment. Tip swelling could be observed on short (5 - 50 μm) as well as longer hairs from the elongation zone suggesting that they were all equally responsive to hypaphorine treatments.

Auxin-hypaphorine interaction.

IAA (1 μM) was inactive on root hair elongation (Fig. 3f). However IAA introduced into fresh nutrient medium after 45 min of hypaphorine (250 μM) treatment, was able to immediately restore the initial root hair elongation rate (Fig. 5). The introduction of a fresh nutrient medium as control in the same circumstances was ineffective to restore elongation (Fig. 5). The activity of various IAA concentrations to restore root hair elongation on hypaphorine treated roots, has been compared (Fig. 6a). The strongest response (mean growth rate after IAA treatment) was recorded with IAA 1 μM (Fig. 6b). Lower IAA concentrations tested, down to 0.01 μM , were still active, however as the IAA concentration decreased the root hair growth rate was only partially restored (Fig. 6b). Higher IAA concentrations, 5 μM and 10 μM , were inactive on hypaphorine-treated root hair elongation (Fig. 6a, b).

Discussion

Hypaphorine is the major indolic compound isolated from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, its concentrations in mycelial mats of various strains grown in pure culture on mineral nutrient media, range from 0.29 to 6.02 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (Béguiristain *et al.* 1995). Here we demonstrate that hypaphorine affects root hairs by reducing elongation rate while it has no activity on root elongation and development at corresponding concentrations (Béguiristain and Lapeyrie 1997; Ditengou and Lapeyrie 2000). At inhibitory concentrations (100 μM), hypaphorine also induced a transitory root hair swelling. At higher hypaphorine concentrations (500 μM and above), root hair elongation stops only 15 min after hypaphorine application. However the root hair initiation from trichoblast is not affected by hypaphorine, confirming that initiation and elongation are distinct phenomenon as previously reported using various mutants affected on root hair development (Schiefelbein and Somerville 1990; Baskin *et al.* 1992).

Hypaphorine activity can not be mimicked by related indolic molecules such as IAA or tryptophan suggesting that some receptor must specifically recognise hypaphorine. Indeed tryptophan activity was 10 fold lower than hypaphorine activity (1 mM tryptophan activity = 100 μM hypaphorine activity), and IAA alone has no activity on root hair elongation in our experimental conditions unless it inhibits totally root development. Furthermore, betaine, the second constitutive element of the hypaphorine molecule, has no activity either (Béguiristain and Lapeyrie 1997).

The activity of IAA on root hair elongation is still unclear. As far as we know, root hair length stimulation by IAA has been reported only twice. The elongation rate of *Agrostis alba* root hairs could be slightly stimulated by IAA 10^{-13} M (Jackson 1960). Bates and Lynch (1996) were able with IAA 1nM and 10 nM, to stimulate root hair elongation of *Arabidopsis thaliana* despite inhibitory high phosphorus concentrations. The observations that both *axr1* and *aux1*, two mutants deficient in auxin response, have shorter hairs, in which elongation can be stimulated by exogenous 2,4 D, the synthetic auxin, suggest that auxin is necessary for normal root hair elongation (Pitts *et al.* 1998). Our present results on *Eucalyptus* seedlings confirm that exogenous IAA has little or no activity on root hair elongation of healthy plants. However, IAA, at inactive concentrations on root hair elongation (0.01 μM to 1 μM), is able

to reverse root hair polar growth inhibition induced by hypaphorine. This result highlights again a role for endogenous IAA during root hair elongation. The inability of IAA at extremely high concentrations (5 and 10 μM) to restore root hair growth following hypaphorine treatment must be related to other physiological disorders induced in the plant tissues as mentioned earlier.

Such IAA activity on hypaphorine treated roots suggests that the two indolic molecules counteract to regulate root hair polar growth. Further evidence of interaction between IAA and hypaphorine during *Eucalyptus* seedling shoot development has recently been reported (Ditengou and Lapeyrie 2000). Here, the IAA concentration in control root hair cells would be sufficient to sustain the maximum root hair elongation rate, hypaphorine and endogenous IAA would counteract reducing IAA activity and consequently hair elongation. Thus, exogenous IAA would be required to make up for the deficit of endogenous IAA activity and restore normal root hair elongation.

Since numerous experimental results (Schiefelbein *et al.* 1992; Wymer *et al.* 1997; Bibikova *et al.* 1997) support the role of a Ca^{2+} gradient at the root hair tip to sustain elongation, we may suggest that following hypaphorine application, the tip-focused calcium concentration gradient has faded out. Furthermore, fungal hypaphorine also induces a transitory swelling and deformation of root hair tips. Root hairs treated with Nod factors from *Rhizobium* may develop swollen tips and deformations, very similar to those described here on hypaphorine treated roots, associated with a redistribution of Ca^{2+} ions (De Ruijter *et al.* 1998).

Thus, during ectomycorrhizal development, the absence of root hairs might be due partly to root hair elongation inhibiting molecules, such as hypaphorine, transferred by colonising hyphae to differentiating epidermal cells. The flux of hypaphorine delivered to epidermal cells still has to be quantified. However the hypaphorine concentrations applied here (from 100 μM to 500 μM) are not unrealistic, in view of the high hypaphorine concentrations detected in colonizing hyphae, up to 6 $\mu\text{moles/g FW}$ (Béguiristain *et al.* 1995). Then the underlying mechanism could involve some form of interaction between hypaphorine, endogenous auxin metabolism, and calcium ions.

Acknowledgements: The authors are grateful to Pr C. Selve (Université Nancy I, France) for helping to synthesise hypaphorine, Thierry Constant (INRA-Nancy) for numerous advises regarding image analysis, Francis Martin and Denis Tagu (INRA-Nancy) for stimulating discussions regarding plant developmental processes and S. Kotowski for helpful technical assistance. They wish to thank "Armoise Conseil" (lagrange@fnac.fr) for the illustration. FAD was supported by a fellowship from the Government of Gabon and TB by an INRA postdoctoral fellowship (AIP: Biologie du développement). This research was supported by the European Commission INCO-DC program (contract number: ERBIC18CT-98319).

References

- Baskin TI, Betzner AS, Hoggart R, Cork A, Williamson RE (1992) Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. Australian J Plant Physiol 19: 427-437
- Bates TR, Lynch JP (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. Plant Cell Environ 19/ 529-538
- Béguiristain T, Cote R, Rubini P, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (1995) Hypaphorine accumulation in the hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Phytochem 40: 1089-1091
- Béguiristain T, Lapeyrie F (1997) Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. New Phytol 136: 525-532
- Bibikova TN, Zhigilei A, Gilroy S (1997) Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. Planta 203: 495-505
- Chilvers GA (1968) Low power electron microscopy of the root cap region of eucalypt mycorrhizas. New Phytol 67: 663-665
- Chilvers GA, Pryor LD (1965) The structure of eucalypt mycorrhizas. Aust J Bot 13: 245-259
- Chilvers GA, Douglass PA, Lapeyrie FF (1986) A paper sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. New Phytol 103: 397-402
- Dénarié J, Cullimore J (1993) Lipo-oligosaccharide nodulation factors : a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Cell 74: 951-954
- De Ruijter NCA, Rook MB, Bisseling T, Emons AMC (1998) Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. Plant J 13: 341-350
- Ditengou FA, Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in *Eucalyptus* seedlings. Mol Plant-Microbe Interact 13: 151-158
- Heath, IB (1990) Tip growth in plant and fungal cells. Academic Press, San Diego
- Horan DP, Chilvers GA, Lapeyrie F (1988) Time-sequence of the infection process in Eucalypt ectomycorrhizas. New Phytol 109: 451-458
- Jackson WT (1960) Effect of indoleacetic acid on rate of elongation of root hairs of *Agrostis alba* L. Physiol Plant 13: 36-45

- Marklovà E, Hais IM (1986) Metabolismus kyseliny indolylacrylové. I. Hypaphorin. Supplementum Sbornicu vědeckých prací LFUK v Hradci Králové 29: 435-442
- Marrs K (1996) The function and regulation of glutathione-S-transferases in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 127-158
- Martin F, Lapeyrie F, Tagu D (1997) Altered gene expression during ectomycorrhiza development. In: Lemke P, Carroll G (eds) The Mycota. vol. VI. Plant relationships. Springer, Berlin Heidelberg, pp 223-242
- Massicote HB, Melville LH, Peterson RL (1987) Scanning electron microscopy of ectomycorrhizae: Potential and limitation. Scan Microscop 1: 1439-1454
- Nehls U, Béguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F, Martin F (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Planta 207: 296-302
- Peterson RL, Farquhar ML (1996) Root hairs: Specialized tubular cells extending root surfaces. Bot Rev 62: 1-40
- Pitts RJ, Cernac A, Estelle M (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. Plant J 16: 553-560
- Ridge RW (1995) Recent development in the cell and molecular biology of root hairs. J Plant Res 108: 399-405
- Romburgh PV, Barger G (1911) Preparation of the betaine of tryptophane and its identity with the alkaloid hypaphorine. J Am Chem Soc 99: 2068-2070
- Schiefelbein JW, Somerville C (1990) Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 2: 235-243
- Schiefelbein JW, Shipley A, Rowse P (1992) Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. Planta 187: 455-459
- Tranvan H, Habricot Y, Jeannette E, Gay G, Sotta B (2000) Dynamics of symbiosis establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. in press
- Wymer CL, Bibikova TN and Gilroy S (1997) Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 12: 427-439

Legend to the Figures

Fig. 1. Dynamic of *Eucalyptus* root epidermal cells colonisation by the ectomycorrhizal fungus during symbiosis establishment. Colonisation is initiated in the root cap region and then propagates by an acropetal extension of root and fungal tissue. The epidermal cells, those bearing root hairs in uninfected root portions, elongate radially as a specialised response to the fungus. The Hartig net develops only between these elongated epidermal cells which therefore remain a part of the active ectomycorrhiza.

Fig. 2. Initiation of *E. globulus ssp bicostata* root hairs (number of root hairs per surface unit of epidermis) on agar (a) or in liquid (b) nutrient media. For treatments on agar medium (a) the seedling taproots were grown for 7 d on agar glucose-free Pachlewski nutrient medium, supplemented or not (control) with 100 μM hypaphorine. For treatments in liquid medium (b), 7-d-old seedling taproots elongating in between microscope slides and cover glasses were cultivated for 24 h in absence (control) or presence of 500 μM hypaphorine. Mean values recorded on at least 5 taproot apices in liquid medium and 15 taproot apices on agar medium $\pm$ SD, compared by Fisher's Protected Least Significant Difference test, $P=0.05$

Fig. 3 a-f. Elongation of *E. globulus ssp bicostata* root hairs. The control seedlings were incubated in glucose-free liquid Pachlewski nutrient medium for 3 h (a). The nutrient medium of the treated seedlings was replaced, after 45 min (arrowheads), by fresh nutrient medium supplemented with 100 μM hypaphorine (b), or 500 μM hypaphorine (c), or 100 μM tryptophan (d), or 1 mM tryptophan (e), or 1 μM IAA (f). Mean values recorded on at least 6 root hairs from at least 2 seedlings $\pm$ SD

Fig. 4 a-f. Deformation of *E. globulus ssp bicostata* root hairs. Non-treated control hairs (a) and root hair tip swelling recorded 90 min (b) after treatment with 500 μM hypaphorine. Time-series showing transitory deformation of hairs 0 (c), 15 (d), 30 (e) and 45 (f) min after application of 100 μM hypaphorine

Fig. 5. Interaction of IAA and hypaphorine on elongation of *E. globulus ssp bicostata* root hairs. The glucose-free liquid Pachlewski nutrient medium of the treated seedlings was substituted, after 45 min (first arrowhead), by fresh nutrient medium supplemented with 250 μM hypaphorine (Hyp.). Forty five min later (second arrowhead), the hypaphorine containing

medium was substituted by fresh nutrient medium (f.m.) or fresh nutrient medium supplemented with 1 μ M IAA (IAA). The control seedlings were incubated in glucose-free liquid Pachlewski nutrient medium. Mean values recorded on at least 6 root hairs from at least 2 seedlings $\pm$ SD

Fig. 6 a-b. Interaction between IAA and hypaphorine on elongation of *E. globulus ssp bicostata* root hairs. The glucose-free liquid Pachlewski nutrient medium of the treated seedlings was substituted, after 45 min (first arrowhead), by fresh nutrient medium supplemented with 250 μ M hypaphorine (a). Forty five min later (second arrowhead), the hypaphorine containing medium was substituted by fresh nutrient medium supplemented with IAA in concentrations from 0.01 to 10 μ M. Response curves (mean values recorded on at least 6 root hairs from at least 2 seedlings) were recorded as in Fig. 5, then combined. To compare the growth restoration by various IAA concentrations, the growth rate (slope of growth curve) for each root hair has been calculated following IAA treatment (b). Mean growth rates $\pm$ SD are compared by Fisher's Protected Least Significant Difference test, $P=0.05$

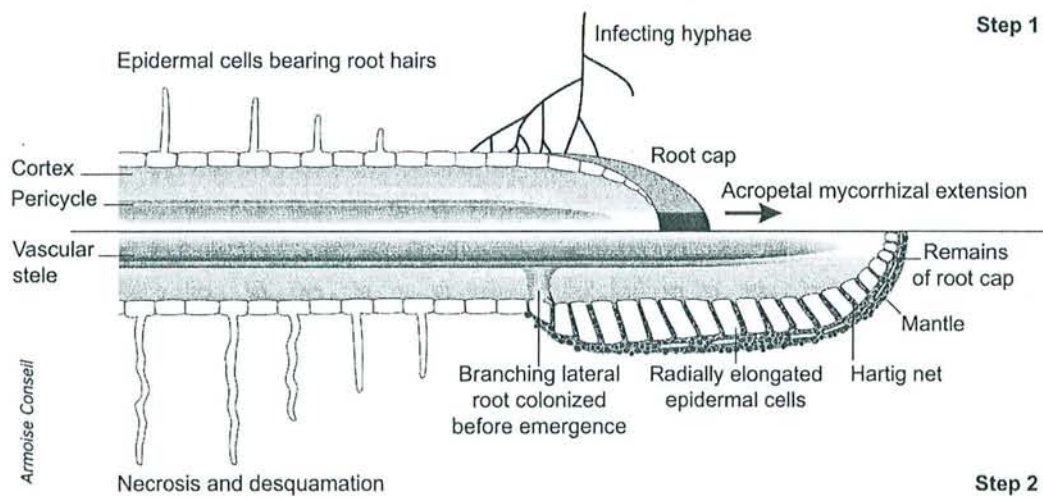


Fig. 1

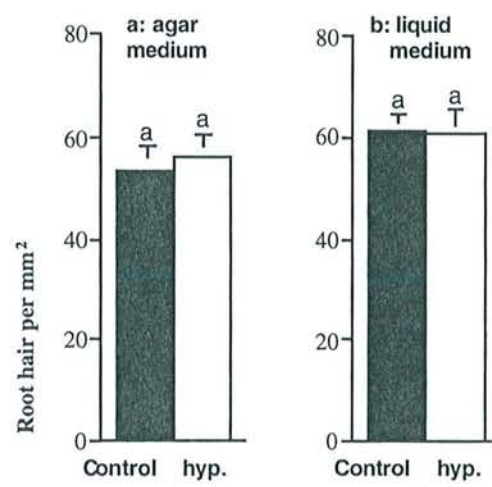


Fig. 2

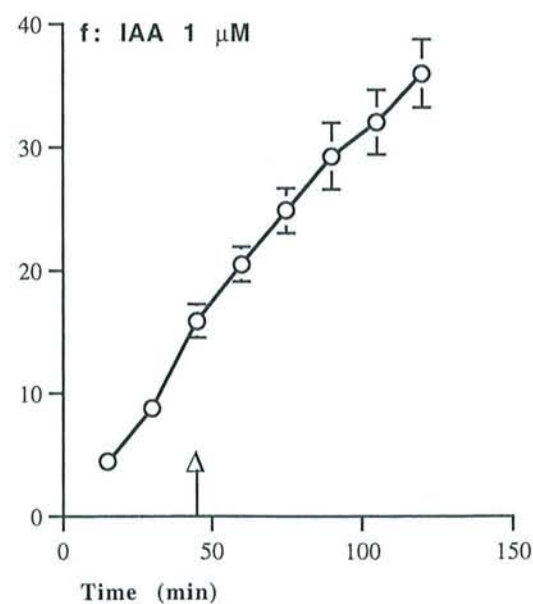
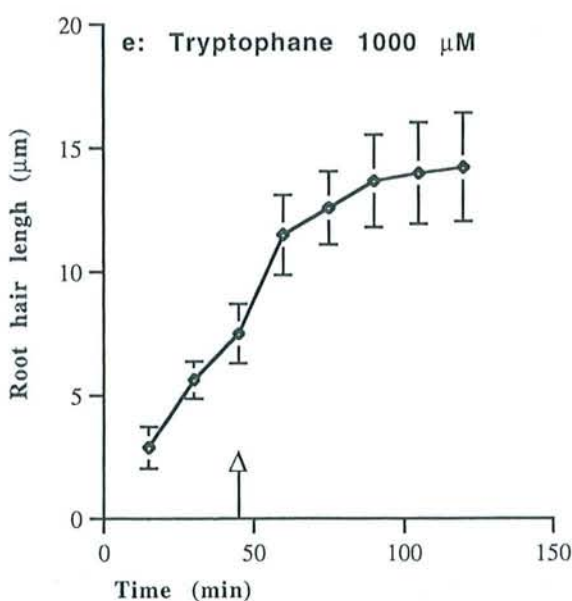
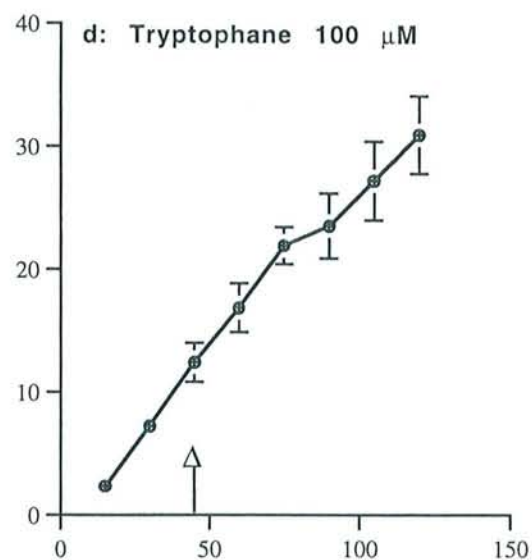
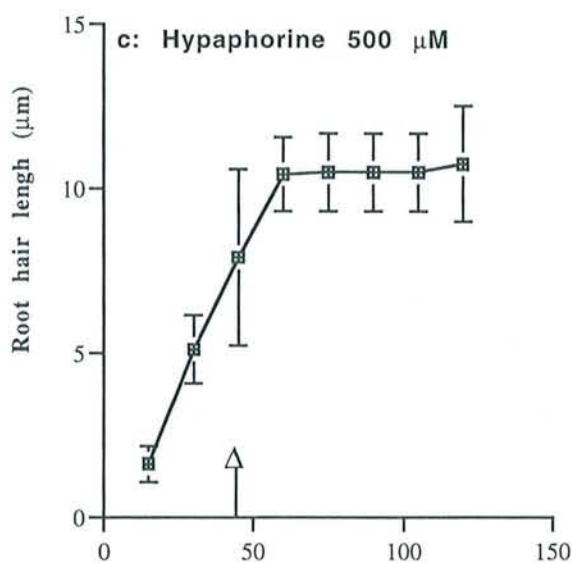
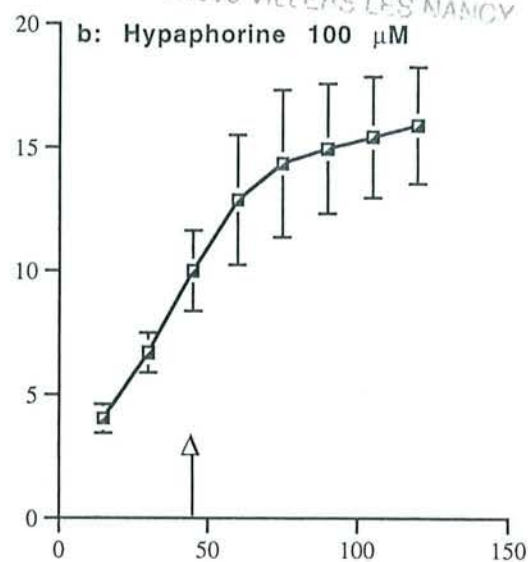
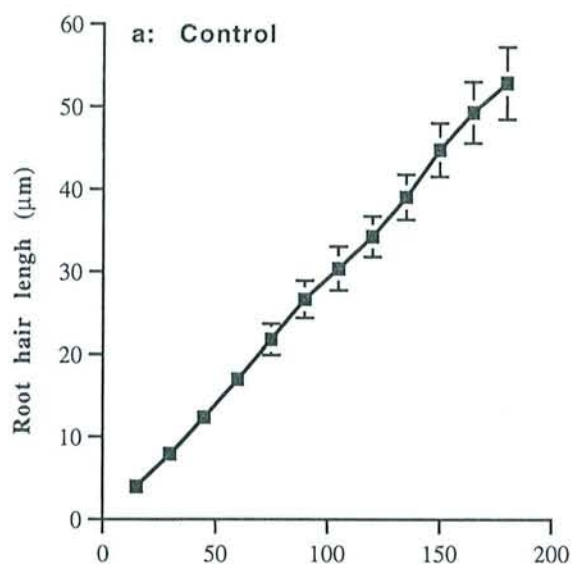


Fig. 3

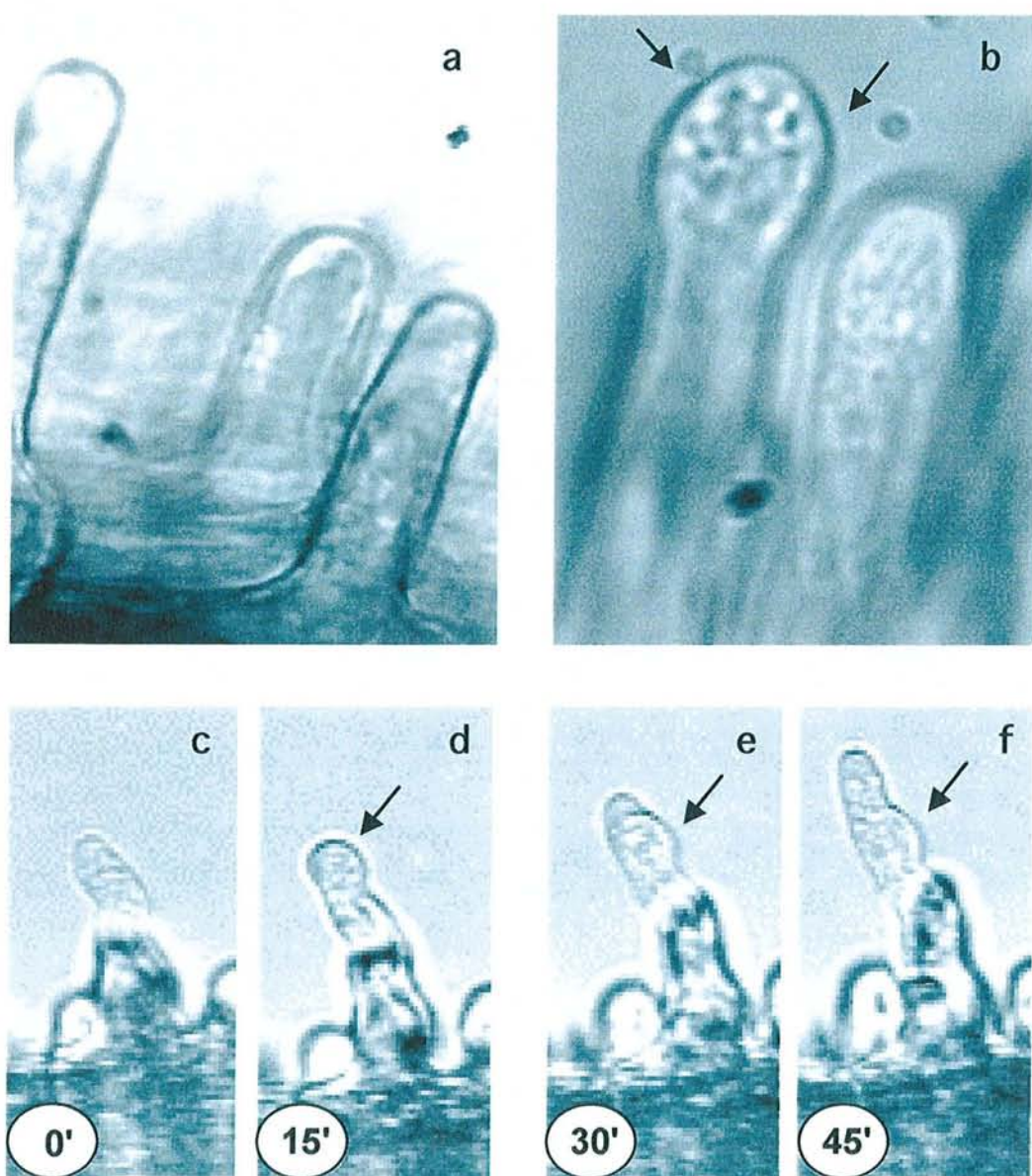


Fig. 4

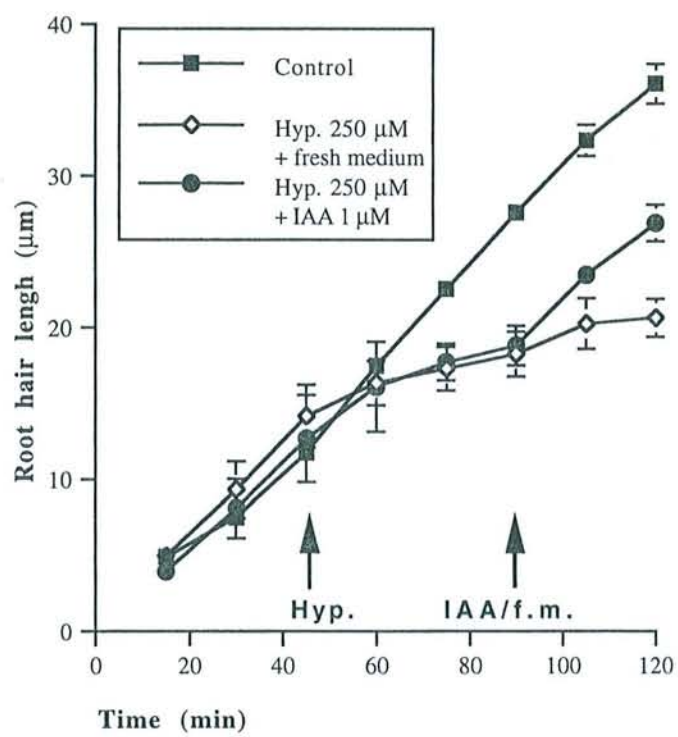


Fig. 5

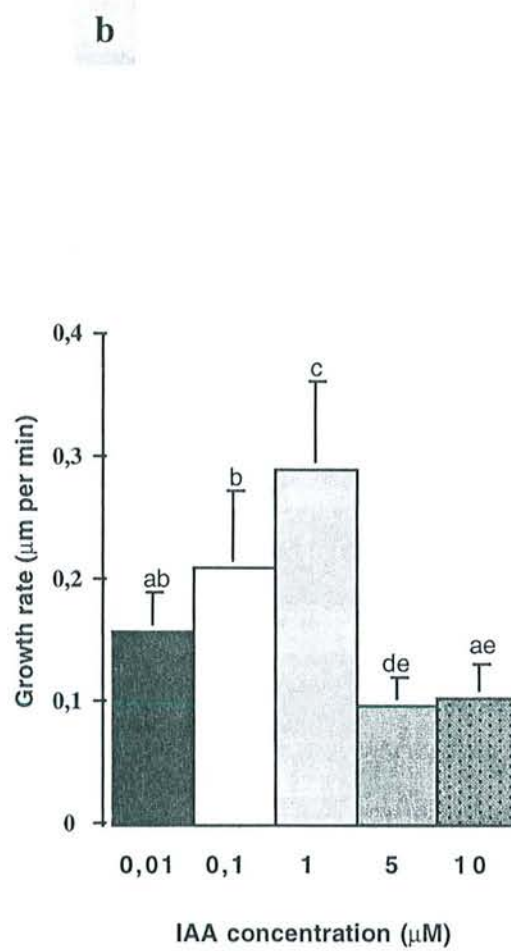
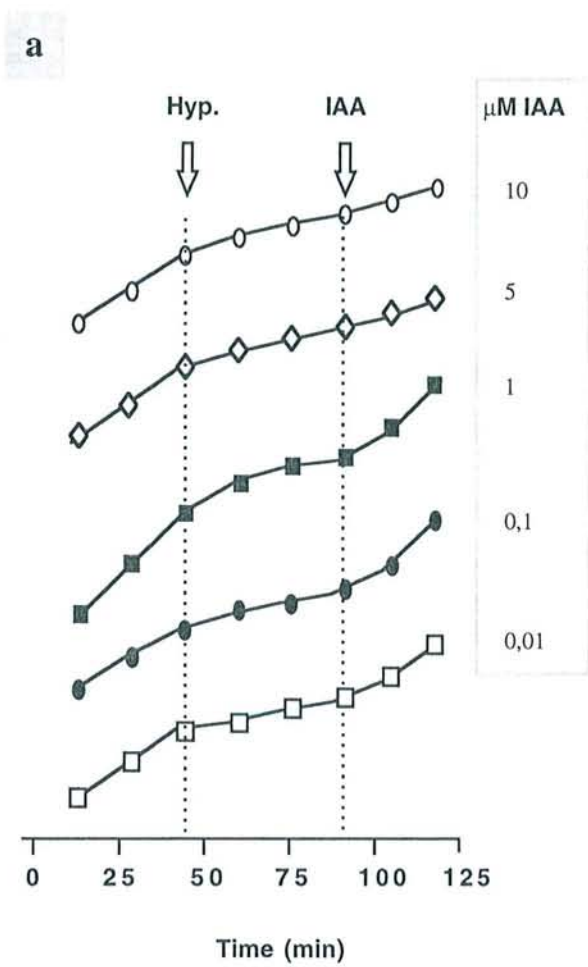


Fig. 6

Short communication

Le rôle de l'hypaphorine sur la croissance des poils absorbants : l'hypaphorine induit la réorganisation des microfilaments d'actine.

Franck Anicet Ditengou, Marjatta Raudaskoski et Frédéric Lapeyrie

L'hypaphorine, le principal composé indolique synthétisé et accumulé par le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*, inhibe l'allongement des poils absorbants d'*Eucalyptus globulus*, une plante hôte. Cette inhibition s'accompagne d'un renflement transitoire de l'apex des poils absorbants. L'observation des poils absorbants de racines témoins en croissance active montre que, conformément à ce qui a été déjà rapporté chez d'autres plantes, les filaments d'actine sont présents sous formes de "faisceaux" répartis dans tout l'espace cytoplasmique. La région sub-apicale des poils absorbants se caractérise par des filaments d'actine qui semblent moins agrégés et diffus. À l'apex du poil, les filaments sont très agrégés et convergent pour former une sorte de "coiffe". Dans les poils absorbants traités avec de l'hypaphorine, des faisceaux de filaments d'actine ont pu être détectés dans la zone sub-apicale. La "coiffe" observée dans les poils témoins, n'est plus visible dans les poils traités, suggérant que les microfilaments d'actine ne convergent plus à l'apex. Il est difficile de dire pour l'heure s'il existe un lien entre l'agrégation des filaments d'actine dans la zone subapicale et l'absence de convergence des filaments à l'apex du poil absorbant. Le mécanisme par l'intermédiaire duquel l'hypaphorine contrôle l'organisation du cytosquelette reste à déterminer. Il a été rapporté que ce sont les filaments d'actine qui gouvernent l'élongation des cellules à croissance dite terminale. Les renflements observés à l'apex des poils en présence d'hypaphorine, pourraient être dus à une nouvelle répartition des vésicules, qui ne seraient plus conduites là où elles auraient permis une croissance orientée.

Hypaphorine induces reorganisation of actin microfilaments in *Eucalyptus globulus* root hairs.

Franck Anicet Ditengou, Marjatta Raudaskoski and Frédéric Lapeyrie.

Summary

Hypaphorine, the major indolic compound isolated from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, controls root hair elongation rate. At inhibitory concentrations hypaphorine induces as well a transitory root hair swelling and deformation. Regarding the cytoskeleton, the sub apical region of control hairs was generally characterised by a gap zone where it seems that actin filaments are less aggregated, diffusing through the cytoplasm. Following hypaphorine treatment, in the sub apical region, actin bundles could be detected where they were previously absent. Then the actin cap observed in the tip region of control hairs was not visible suggesting that microfilaments did not converge anymore. Whether both phenomenon, the aggregation of actin filaments in sub apical zone and the absence of convergence at the tip are linked, is still questionable. Indeed, microfilaments might need to be diffuse in the subapical region to freely converge at the root hair tip. The mechanism by which hypaphorine control microfilaments organisation still need to be investigated. Since tip growth is supposed to be governed by the actin cytoskeleton, following hypaphorine treatment, root hairs tip swelling may be due to a relocalisation of vesicles that are not brought to the right site in the right amount for growth to proceed in the right direction.

Introduction

Changes in root morphology occurring during the development of ectomycorrhizae, a symbiotic association between soil fungi and roots, must be tightly controlled by fungal molecules. Among morphological changes undergone by the host plant is the suppression of root hair development.

Root hairs are tubular cells that arise and elongate at the surface of roots. It is suggested that they play an important role by increasing the root / soil interface (reviewed in Ridge, 1995). Root hairs are tip growing cells, which elongate by the addition of cell wall precursors delivered by vesicles from the endomembrane system (Heath, 1990 ; Peterson and Farquhar, 1996). The growth of root hairs has been extensively studied, with special regard to the role of the cytoskeleton, plasma membrane ion channels, intracellular ion gradients, plant hormones, and to the interaction with symbiotic microorganisms. Indeed, root hair deformation can be induced by specific lipochito-oligosaccharides from *Rhizobium*, the Nod factors (Denarié and Cullimore, 1993).

Little information is available regarding the fate of root hairs during the establishment of mycorrhizal associations. The interaction between ectomycorrhizal fungi and root hairs must be dramatic, as root hairs can not be found in mature ectomycorrhizae. Authors have suggested that root hair absence be due to their incorporation into the fungal mantle (Peterson and Farquhar 1996). However, we suggested earlier that root hair elongation could be suppressed very early during root tip colonisation by fungal inhibiting molecules such as hypaphorine (Ditengou *et al.*, 2000).

Hypaphorine, the major indolic compound isolated from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Béguiristain *et al.*, 1995), controls root hair elongation rate (Ditengou *et al.*, 2000). Furthermore hypaphorine brought at inhibitory concentrations (100 μ M), induces as well a transitory root hair swelling and deformation. Such deformations are reminiscent of those associated with the Ca^{2+} ions redistribution in tip growing cells (Felle *et al.*, 1998 ; Gehring *et al.*, 1997). At higher hypaphorine concentrations (500 μ M and greater), root hair elongation stops, only 15 minutes after application. However root hair initiation from trichoblasts is not affected by hypaphorine.

The cytoskeleton is thought to play an important role during root hair initiation, development and response to Nod factors application (Cardenas *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 1999).

Here, to understand the mechanism of root hairs elongation inhibition by hypaphorine we investigated actin microfilaments organisation in response to hypaphorine treatments.

Materials and Methods

Biological material. Seeds of *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* (Kylisa Seeds Co., Weston Creek, Australia) were sterilised with 10% sodium hypochlorite (v/v) for 20 min and rinsed with four changes of sterile water. Sterile seeds were plated onto glucose-free Pachlewski medium in 2.0 % agar (2.7 mM Di-ammonium tartrate ; 7.3 mM KH_2PO_4 ; 2.0 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2.9 μM thiamine-HCl; 1 ml of Kanieltra Co. trace-element stock solution). For germination, plates were kept vertically in a controlled environment growth chamber (20 °C) with 16 h light (200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and 8 h dark for 7 days. Germinated seedlings were transferred into a sterile liquid glucose-free Pachlewski medium (see above), the tap roots elongating vertically in between microscope slides and cover glasses. The slide and cover glasses were joined together and maintained approximately 1.5 mm apart with heat resistant mastic (Sodicam S.A., France). Seven days old seedlings were treated with 250 μM hypaphorine or distilled water (control) during 2 hours (Ditengou *et al.*, 2000) before actin staining.

Actin staining. Primary Eucalyptus roots were excised and kept in 5 ml of stabilising buffer (50 mM Pipes; 5 mM EGTA; 5 mM MgSO_4 ; pH 6.9) for 5 min at room temperature. At least 10 roots per treatments were used. Afterward, the roots were fixed under vacuum with 4% paraformaldehyde in stabilising buffer containing 12% DMSO and incubated for 60 min at room temperature. Fixed roots were washed five times in 10 ml of stabilising buffer (5 min per rinse). Actin filaments were stained on microscope slide with 0.33 μM rhodamine phalloidin in buffer solution (100 mM Pipes; 0.1% Triton X100; 1 mM MgCl_2 ; 5 mM EGTA; 3 mM DTT; 1 mM PMSF; 50 μg / ml leupeptin; 20 μg / ml aprotinin).

Actin filament observation. Root hairs were observed with a fluorescence microscope using a Nikon 20X DIC 0.5 NA or 40X Plan DIC 0.7 NA objective on a Nikon Optiphot microscope. Then images were recorded on a Panasonic wv-E550 3 CCD camera using a Prysm frame grabber with AcQuis 2.0 software (Synoptics Ltd, Cambridge, UK). For fine observation of root hairs cytoskeleton a BIO-RAD MRC 1024 laser scanning confocal microscope mounted onto an Axiovert 135M inverted microscope (Zeiss) and equipped with Krypton/Argon laser with an exciting laser line at 488 nm and a 515 nm emission filter was used. Fluorescence images from the confocal microscope were captured using a Zeiss Plan-

Apochromat 100X oil immersion objective (1,40 DIC, ∞ 0.17) and a detector with 522 DF $\pm$ 32 nm emission filter. Confocal images were enhanced with Kalman averaging for 4 scans. Serial optical sectioning was done at 0.3 to 0.5 μ m intervals and 5 to 10 sections were compiled to 3D images and saved as TIFF files. Images were contrast enhanced in Adobe PhotoShop (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA).

Results and Discussion

Root hairs have been observed along tap root in the initiation and elongation zones. Since cytoskeleton staining procedures in living cells have been previously criticised (Miller *et al.*, 1999 ; De Ruijter *et al.*, 1999), we used a chemical fixation method to visualise the actin cytoskeleton in intact root hairs. Actin cytoskeleton was stained in at least 95% of observed root hairs allowing to investigate a large population of hairs.

Actin microfilaments in control root hairs.

Actin filament organisation in *Eucalyptus globulus* control root hairs was similar to the general configuration already reported in *Vicia sativa* (Miller *et al.*, 1999; De Ruijter *et al.*, 1999), cress or *Arabidopsis* (Braun *et al.*, 1999). Before root hair emergence, actin filament bundles were observed in trichoblasts, oriented mostly along the root axes. During root hair initiation actin filaments concentrate into the bulge (Fig. 1). Bulges evolved toward elongating root hairs where actin filaments extend toward the new tip (Fig. 2). In young actively growing root hairs (30 to 70 μ m), actin microfilaments were visible all along the cell, in the entire cytoplasm (Fig. 3). Actin microfilaments appeared aggregated forming bundles along most of the root hair length (Fig. 3). Conversely the sub apical region was generally characterised by a gap zone with strongly reduced labelling or even absence of fluorescence (Fig. 3). It seems that in this zone the actin filaments are less aggregated, diffusing through the cytoplasm, the bundles appear therefore thinner or even invisible. At the root hair tip the actin filaments converge forming a highly fluorescent apical actin cap (Fig. 3). In this actin cap, highly fluorescent spots could be seen, which might correspond to microfilaments anchoring sites onto the plasma membrane (Fig. 4). Our observations are in strict agreement with the description of root hairs of various plants published by Braun *et al.* (2000), but, we could not observe the tinny region devoid of actin filaments at the very tip, described as a

cleft by Miller *et al.* (1999). Since cell wall digesting enzymes were not used here after cell fixation, this may explain why, just like Braun *et al.* (2000), we could not see the cleft reported by Miller *et al.* (1999). It has been suggested that this cleft in the actin zone spatially coincides with the vesicle-rich region (Miller *et al.*, 1999; De Ruijter *et al.*, 1999).

Actin microfilaments in hypaphorine treated root hairs

Treated root hairs showed characteristic apical deformations previously reported (Ditengou *et al.*, 2000) (Fig. 5). Compare to control elongating root hairs, actin bundles labelling was lower along the cells (Fig. 5). Such figure could result either from a higher aggregation of pre existing bundles reducing their number in the cytoplasm, or a desagregation of preexisting bundles making some of them not visible anymore. In the sub apical zone, contrasting with control hairs, actin bundles could be then detected. Such aggregation of microfilaments in the subapical zone tend to support the above hypothesis claiming that microfilaments were highly aggregated along the treated cells. The previously described actin cap in the tip region was not visible anymore in hypaphorine treated hairs suggesting that microfilaments did not converge anymore (Fig. 5).

Whether both phenomenon, the aggregation of actin filaments in sub apical zone and the absence of convergence at the tip are linked, is still questionable. Indeed, microfilaments might need to be diffuse in the subapical region to freely converge at the root hair tip. Thus, over aggregation of microfilaments in hypaphorine treated hairs might oppose filament convergence to the tip. Hence, since tip growth is supposed to be governed by the actin cytoskeleton (Kropf *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1999), following hypaphorine treatment, root hairs tip swelling may be due to a relocalisation of vesicles that are not brought to the right site in the right amount for growth to proceed in the right direction.

Reorganisation of actin microfilaments had been reported to be linked to calcium gradient perturbation at the tip (De Ruijter *et al.*, 1998; Felle *et al.*, 1998). Indeed Gehring *et al.* (1997) have recorded a cytoplasmic calcium concentration increase in the root hairs of *Vigna unguiculata* after application of Nod factors. This high calcium concentration may modify the equilibrium between monomeric actin, actin binding proteins, and actin filaments (De Ruijter *et al.*, 1999). Actin interaction with the G-actin binding protein, the profilin,

which has been reported to regulate cellular growth and morphogenesis, could have been disturbed by hypaphorine treatment (Staiger *et al.*, 1994, 1997 ; Valster *et al.*, 1997).

We have reported in a previous paper that IAA was able to restore root hair polar growth following inhibition by hypaphorine (Ditengou *et al.*, 2000). Fungal hypaphorine and endogenous IAA may counteract to control root hair growth (Ditengou *et al.*, 2000; Ditengou and Lapeyrie, 2000). The present results suggests that initial actin filament organisation could be restored by IAA. Such step still need to be investigated further and will probably help to understand the role of hypaphorine during ectomycorrhizal development.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

References

- Béguiristain T, Cote R, Rubini P, Jay-Allemand C and Lapeyrie F (1995). Hypaphorine accumulation in the hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Phytochem.* **40**: 1089-1091
- Braun M, Baluska F, Witsch VM and Menze ID (1999). Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta* **209**: 435-443
- Cardenas L, Vidali L, Dominguez J, Perez H, Sanchez F, Hepler PK and Quinto C (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* **116**: 871-877
- De Ruijter NCA, Bisseling T and Emons AMC (1999). *Rhizobium* Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 829-832
- De Ruijter NCA, Rook MB, Bisseling T and Emons AMC (1998). Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant J.* **13**: 341-350
- Denarié J and Cullimore J (1993). Lipo-ologosaccharide nodulation factors: a new class of signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**: 951-954
- Ditengou FA and Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in *Eucalyptus* seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 151-158
- Ditengou FA, Béguiristain T and Lapeyrie, F. (2000). Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by IAA. *Planta*. In press
- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A and Schultze M(1998). The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* **13**: 455-463
- Gehring CA, Irving HR, Kabbara, AA, Parish RW, Boukli NM and Broughton WJ (1997). Rapid, plateau-like increases in intracellular free calcium are associated with Nod-factor-induced root-hair deformation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 791-802
- Heath IB (1990). Tip growth in plant and fungal cells. Academic press, San Diego
- Kropf DL, Bisgrove SR and Hable PK (1998). Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 117-122

- Miller DD, De Ruijter NCA, Bisseling T and Emons AMC** (1999). The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J.* **17**: 141-154
- Peterson RL and Farquhar ML** (1996). Root hairs: Specialised tubular cells extending root surfaces. *Bot. Rev.* **62**: 1-40
- Ridge RW** (1995). Recent development in the cell and molecular biology of root hairs. *J. Plant Res.* **108**: 399-405
- Staiger CJ, Gibbon BC, Kovar DR and Zonia LE** (1997). Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organisation in plants. *Trends Plant Sci.* **2**: 275-281
- Staiger CJ, Yuan M, Valenta R, Shaw PJ, Warn RM and Lloyd CW** (1994). Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr. Biol.* **4**: 215-219
- Valster AH, Pierson ES, Valenta R, Hepler PK and Emons AMC** (1997). Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profilin microinjection. *Plant cell* **9**: 1815-1824

Fig 1. Actin filament staining (rhodamine phalloidin) in *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* control root hair bulges.

Fig 2. Actin filament staining (rhodamine phalloidin) in *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* elongating control root hairs.

Fig 3. Actin filament staining (rhodamine phalloidin) in *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* elongating control root hairs (30-70 μ M) showing actin bundles (B), sub-apical zone (SA), and apical actin cap (AA).

Fig 4. Actin filament staining (rhodamine phalloidin) in *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* elongating control root hairs showing hypothetical actin filament anchoring sites (arrow).

Fig 5. Actin filament staining (rhodamine phalloidin) in *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* elongating root hairs treated with hypaphorine showing actin bundles (B), aggregation in sub-apical zone (SA), and lack of apical actin cap (AA).



Fig. 1



Fig. 2

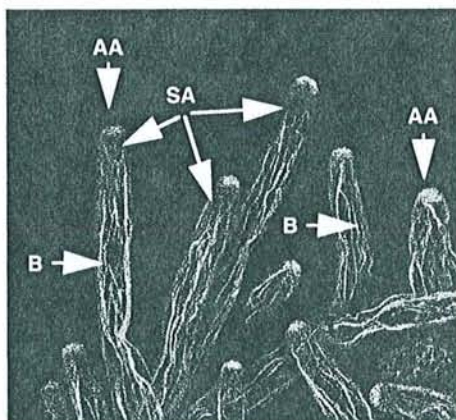


Fig. 3

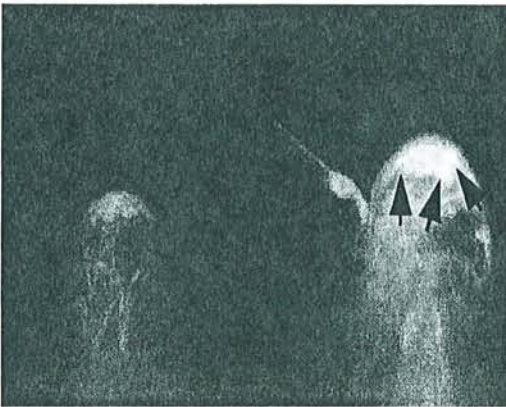


Fig. 4

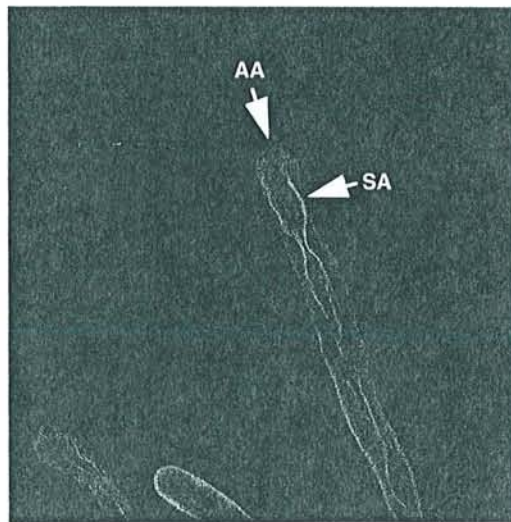
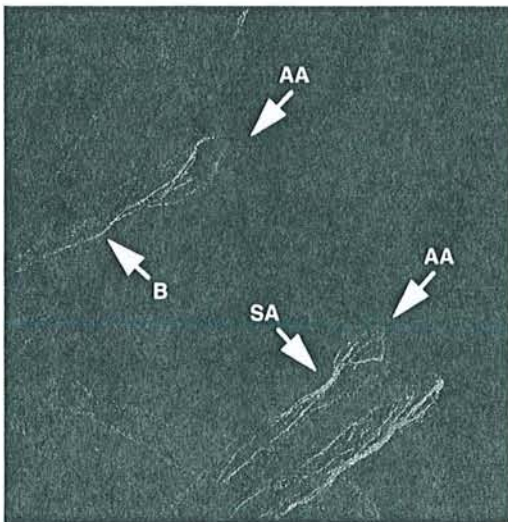


Fig. 5

Résultat n° III

L'hypaphorine synthétisée par le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* inhibe les activités de l'acide indole 3-acétique et de l'éthylène mais pas celle des auxines de synthèses (ANA et 2,4 D), dans les plantules d'*Eucalyptus globulus*.

Franck Anicet Ditengou and Frédéric Lapeyrie

Molecular Plant Microbe Interaction (MPMI).

Très peu d'informations sont disponibles concernant les molécules qui régulent le développement des racines lors des interactions entre plantes et champignons ectomycorhiziens. Le rôle de l'auxine fongique bien que régulièrement suggéré, pose néanmoins de nombreuses questions. Ainsi, si l'auxine fongique contrôle certaines étapes du développement de la racine colonisée, il semble que son activité doive être régulée dans le temps et dans l'espace via des mécanismes propres à la plante et/ou au champignon. Nous avons démontré au cours de cette étude, que l'hypaphorine, la bétaine du tryptophane, régule l'activité inhibitrice de l'AIA sur l'élongation des racines d'*Eucalyptus*. Mais l'hypaphorine n'affecte pas les activités des analogues synthétiques de l'AIA (ANA ou 2,4 D). Ces résultats suggèrent que l'AIA et l'hypaphorine interagissent très tôt, lors de la perception ou des premières étapes de la transduction du signal auxinique. De plus, alors que le traitement des plantules avec de l'ACC, le précurseur de l'éthylène, inhibe le redressement des hypocotyles et induit la formation d'une "crosse" caractéristique, l'application d'hypaphorine, ainsi que la colonisation des racines par les hyphes de *Pisolithus tinctorius*, entraîne un redressement précoce des hypocotyles. Le rôle du CO₂ libéré par le champignon est ici minime puisque l'activité anti-auxinique du champignon nécessite un contact direct entre les hyphes et les racines. De même, nous avons pu confirmer que le champignon ne métabolisait pas l'ACC apporté dans la boîte de Pétri, la teneur en ACC au début et en fin d'expérience était identique. L'interaction entre l'hypaphorine et l'ACC observée ici est probablement la conséquence d'un antagonisme entre l'hypaphorine et l'AIA dans les tissus en croissance de l'hypocotyle (Fig. 7). De nombreuses interactions plante / micro organismes conduisent à une accumulation d'auxine dans les tissus de la plante. L'interaction *P. tinctorius* / *Eucalyptus* serait le premier exemple d'interaction au cours de laquelle le microbe réduit l'activité de

l'auxine dans les tissus de la plante hôte. L'hypaphorine serait le premier antagoniste spécifique de l'AIA identifié.

Hypaphorine from the Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus tinctorius* Counteracts Activities of Indole-3-Acetic Acid and Ethylene but Not Synthetic Auxins in Eucalypt Seedlings

Franck Anicet Ditengou and Frédéric Lapeyrie

Equipe de Microbiologie Forestière, Centre de Recherches de Nancy, Institut National de la Recherche Agronomique, F-54280 Champenoux, France
Accepted 20 October 1999.

Very little is known about the molecules regulating the interaction between plants and ectomycorrhizal fungi during root colonization. The role of fungal auxin in ectomycorrhiza has repeatedly been suggested and questioned, suggesting that, if fungal auxin controls some steps of colonized root development, its activity might be tightly controlled in time and in space by plant and/or fungal regulatory mechanisms. We demonstrate that fungal hypaphorine, the betaine of tryptophan, counteracts the activity of indole-3-acetic acid (IAA) on eucalypt tap root elongation but does not affect the activity of the IAA analogs 2,4-D ((2,4-dichlorophenoxy)acetic acid) or NAA (1-naphthaleneacetic acid). These data suggest that IAA and hypaphorine interact during the very early steps of the IAA perception or signal transduction pathway. Furthermore, while seedling treatment with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), the precursor of ethylene, results in formation of a hypocotyl apical hook, hypaphorine application as well as root colonization by *Pisolithus tinctorius*, a hypaphorine-accumulating ectomycorrhizal fungus, stimulated hook opening. Hypaphorine counteraction with ACC is likely a consequence of hypaphorine interaction with IAA. In most plant-microbe interactions studied, the interactions result in increased auxin synthesis or auxin accumulation in plant tissues. The *P. tinctorius* / eucalypt interaction is intriguing because in this interaction the microbe down-regulates the auxin activity in the host plant. Hypaphorine might be the first specific IAA antagonist identified.

During ectomycorrhizal development, the plant and fungus undergo profound reorientation of their development due to the interaction between both symbionts (Dexheimer and Pagny 1991; Martin et al. 1997). This interaction must be controlled by signal molecules exchanged very early between the symbionts, but so far very little is known about these molecules. Much attention has been focused on auxin. Indeed, most ectomycorrhizal fungi are able to synthesize auxin (Beyle

1995), and auxin applied on roots mimics some of the features seen after colonization of roots by ectomycorrhizal fungi (Gogala 1991). The addition of 2,3,5 triiodobenzoic acid (TIBA), an inhibitor of auxin transport, in the culture medium blocked the colonization of the Norway spruce main root cortex and the Hartig net formation by *Laccaria bicolor* (Karabaghli-Degron et al. 1998). Studies of fluoroindole-resistant mutants of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* that overproduce tryptophan and indole-3-acetic acid (IAA) support the idea that fungal IAA controls major anatomical features of pine ectomycorrhizae (i.e., enhanced lateral root formation and an increased number of ectomycorrhizal tips were recorded), but IAA overproduction also induced an abnormal proliferation of the intercellular network of hyphae and intracellular penetration of hyphae (Gay et al. 1994; Gea et al. 1994). The role of fungal auxins in ectomycorrhizal development has been challenged repeatedly (Harley and Smith 1983; Wallander et al. 1992). Ectopic expression of the T-DNA IAA-biosynthetic gene in transgenic hybrid aspen roots did not result in any obvious change in mycorrhizal morphology (Hampp et al. 1996). According to Horan (1991), while treatment of *Eucalyptus* spp. seedling roots with micromolar concentrations of exogenous IAA induced the formation of slow-growing, swollen, and highly branched roots that were superficially similar to ectomycorrhizae, these roots exhibited anatomical alterations that are not observed in ectomycorrhizae, including an increased number of cortical cell layers and an increased number of vascular bundles in the stele. This literature survey would suggest that if fungal auxins control some steps of ectomycorrhizal development, auxin activity might be tightly controlled in time and in space by plant and/or fungal regulatory mechanisms.

Recently, we purified hypaphorine (or tryptophan betaine) the major indole alkaloid in *Pisolithus tinctorius* mycelium and exudates (Béguiristain et al. 1995). The accumulation of hypaphorine increases fourfold soon after the hyphae come in contact with the host plant root surface (Béguiristain and Lapeyrie 1997). Fungal hypaphorine has a morphogenetic effect by reducing root hair elongation (Béguiristain and Lapeyrie 1997), but elongation of hypaphorine-inhibited-root hairs could be restored by an exogenous IAA application (F. A. Ditengou and F. Lapeyrie, unpublished data). Furthermore,

hypaphorine regulates the expression of a plant symbiosis regulated (SR) gene, the *EgHypar* gene, exhibiting a high degree of homology with plant auxin-induced glutathion-S-transferase (GST) (Nehls et al. 1998). Some of these GSTs could be involved in auxin metabolism and transport regulation (Marrs 1996). Therefore, among numerous hypotheses, we suggested that fungal hypaphorine could regulate auxin activity during ectomycorrhizal symbiosis development.

Here we demonstrate that fungal hypaphorine counteracts the activity of IAA in host plant organs. While there are numerous examples of plant-microbe interactions that lead to increased auxin accumulation in plant tissues (Morris 1995; Mathesius et al. 1998), this is, as far as we know, the first reported case in which the microbe down-regulates the auxin activity in the host plant organs.

RESULTS

Interaction between hypaphorine and exogenous auxins.

Eucalyptus globulus subsp. *bicostata* seedlings were grown on a cellophane film over agar in petri dishes maintained vertically. Compared with control plants, the addition of 1 μ M IAA in the nutrient medium resulted in a 60% inhibition of tap root elongation (Figs. 1A and 2). The addition of hypaphorine at 100 μ M (Figs. 1A and 2) and up to 1 mM (data not shown) had no effect on tap root elongation. In the presence of IAA at 1 μ M, normal tap root elongation, equal to that of the control, could be restored by the simultaneous addition of 100 μ M hypaphorine (Figs. 1A and 2).

Hypaphorine and tryptophan activities were compared in the presence of 1 μ M IAA (Fig. 1A). Tryptophan at 100 μ M lightly inhibits tap root elongation, but 100 μ M tryptophan is able to stimulate the elongation of the tap root in the presence of 1 μ M IAA, compared with roots treated with IAA alone. However, 100 μ M tryptophan does not restore normal growth, compared with control.

The activities of IAA and two synthetic auxins on root growth were compared. Inhibition of tap root elongation could be induced with both synthetic auxins, 1 μ M 2,4-D ((2,4-dichlorophenoxy)acetic acid) (Fig. 1B) and 50 μ M NAA (1-naphthaleneacetic acid) (Fig. 1C). While 100 μ M hypaphorine counteracts the activity of IAA (Fig. 1B,C), as previously observed, it did not counteract the activities of the synthetic auxin (Fig. 1B,C) at any of the concentrations applied, up to 1 mM (data not shown).

Interaction between hypaphorine and exogenous ACC.

Incorporation of the immediate precursor of ethylene, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) at 10 μ M in the agar medium enhanced the formation of an apical hook on *E.*

globulus hypocotyl (Fig. 3) and delayed hook opening and cotyledon expansion (Fig. 4), as described for numerous plant species (Smalle and Van Der Straeten 1997). After 7 days of incubation in a growth chamber, 100% of the hypocotyls of control seedlings were elongated, while in the presence of

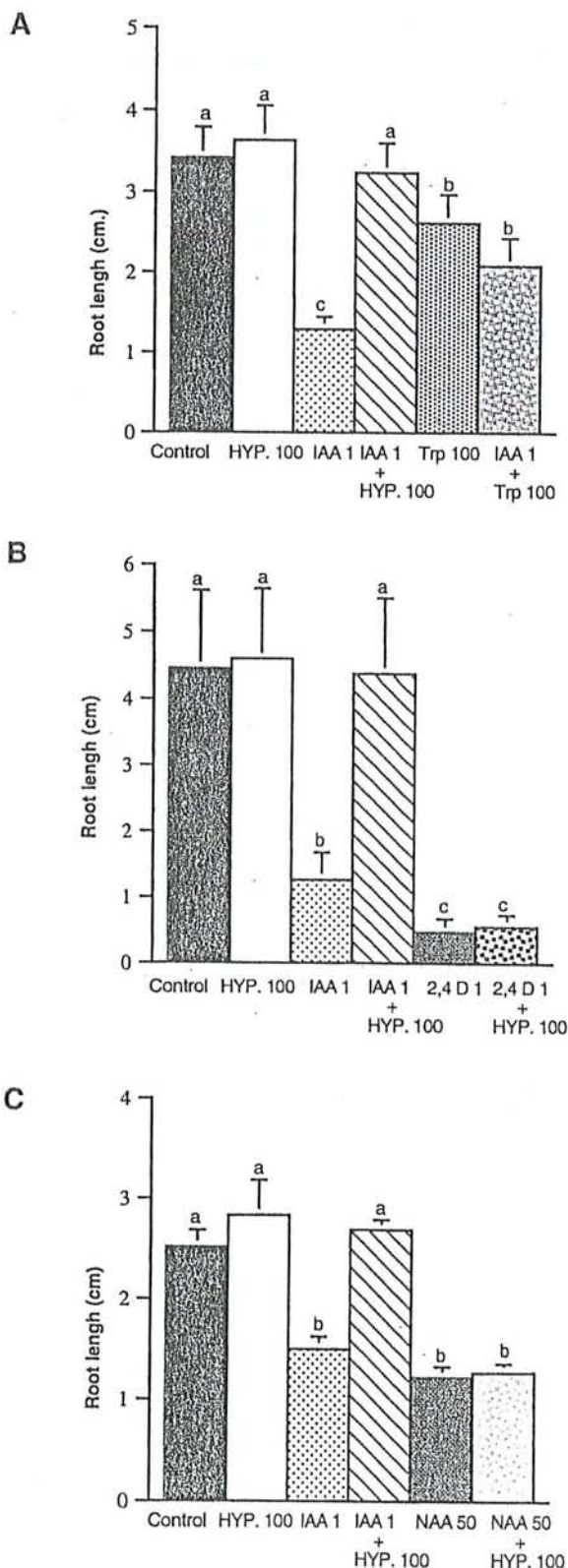


Fig. 1. Interaction between hypaphorine and indole-3-acetic acid (IAA) controlling tap root elongation. *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* seedlings were cultivated for 7 days over agar nutrient medium (Control) supplemented with 100 μ M hypaphorine (HYP. 100), 1 μ M IAA (IAA 1), 100 μ M tryptophan (Trp 100), 1 μ M 2,4-D ((2,4-dichlorophenoxy)acetic acid) (2,4-D 1), 50 μ M NAA (1-naphthaleneacetic acid) (NAA 50), or a combination of some of these molecules. Mean values were recorded on at least 30 seedlings $\pm$ SD, then compared among each experimental set (1a, 1b, 1c) by analysis of variance and Fisher's protected least significant difference test, $P = 0.05$.

ACC, 100% of the seedlings displayed an apical hook. It took 15 days for 75% of the ACC-treated seedlings to elongate and, after 20 days of incubation, 5% of the hooks had not yet opened (Figs. 3 and 4).

The incorporation of hypaphorine at 100 or 500 μM in the nutrient medium does not affect shoot development, compared with control seedlings (data not shown).

When 500 μM hypaphorine was added to the agar medium together with 10 μM ACC, seedlings elongated much earlier than those treated with ACC alone (Figs. 3 and 4). Around 50% of the hypocotyls were elongated after 7 days, 90% after 15 days, and 100% after 20 days (Fig. 4). The same trend was recorded, with a lower intensity, when hypaphorine at 100 μM or even 10 μM (Fig. 4) was added with 10 μM ACC. While elongation of the tap root was inhibited as well by 10 μM ACC, the addition of hypaphorine did not always allow this inhibition to be overcome (Fig. 3). The activity of 100 μM tryptophan was not significantly different from that of hypaphorine at the same concentration (Fig. 4).

ACC activity in host plants colonized by *P. tinctorius*.

While the results above suggest that the hypaphorine producing fungus, *P. tinctorius*, could counteract the IAA-induced inhibition of tap root elongation, it was not possible to test such a hypothesis because root elongation and ramification are strongly altered by hyphal colonization as well. On the other hand, such a comparison between the exogenous hypaphorine supply and the activity of hypaphorine-producing strains on shoot elongation in the presence of ACC could be made. Indeed the site of fungal infection, the root, and the site of symptom development, the shoot, are then distinct.

The respective developments of control seedlings and seedlings germinated on 10 μM ACC agar medium were closely related to those described above (Figs. 3 and 5). Seedling root colonization by *P. tinctorius* strain 2144, on media containing 10 μM ACC, stimulated hypocotyl elongation, as did 500 μM hypaphorine (Figs. 3 and 5). After 7 days, approximately 50%

of hypocotyls were elongated; after 10 days, 90% were elongated; and after 15 days, all hooks were opened. With a delay, a similar trend was recorded when roots were colonized by *P. tinctorius* strain 441, a less aggressive strain toward *Eucalyptus* spp. roots (Fig. 5). To rule out the objection that roots were isolated from the agar medium by colonizing hyphae, preventing the absorption of ACC, the same experiment was conducted again, but some seeds were purposely placed further away from the fungal colonies. Consequently, most of the root length, bearing root hairs, was still clearly in contact with the agar surface and only the root tip was colonized by *P. tinctorius* strain 2144 (Fig. 3, lower row); however, these seedlings responded to hyphal colonization as previously described. Then, the hypaphorine concentration in the agar medium under *P. tinctorius* strain 2144 colonies was still very low (highest concentration recorded: 2.5 μM) and not significantly different whether the agar medium was supplemented or not with ACC.

Carbon dioxide can be an ethylene antagonist (John 1997). To rule out the objection that hypocotyl elongation could be mediated by the CO_2 resulting from fungal respiration in sealed petri dishes, the same experiment was conducted in sealed or unsealed petri dishes, with or without contact between roots and hyphae. The same conclusion was reached regarding the role of hypaphorine (Fig. 6). Indeed, after 10 days, less than 25% of the hypocotyls were elongated among ACC-treated seedlings (Fig. 6A), while 96% of the hypocotyls were elongated following *P. tinctorius* colonization whether the petri dishes were sealed (Fig. 6B), or unsealed (Fig. 6C). Furthermore, when, in sealed dishes, the hyphae were grown without direct contact with the seedling roots, both organisms being separated by a trench in the agar, *P. tinctorius* activity was strongly reduced, as only 50% of the hypocotyls were elongated (Fig. 6D). This residual activity, which could be attributed to fungal CO_2 , was slightly lower when the dishes were maintained unsealed, as expected if a volatile compound was involved (Fig. 6E).

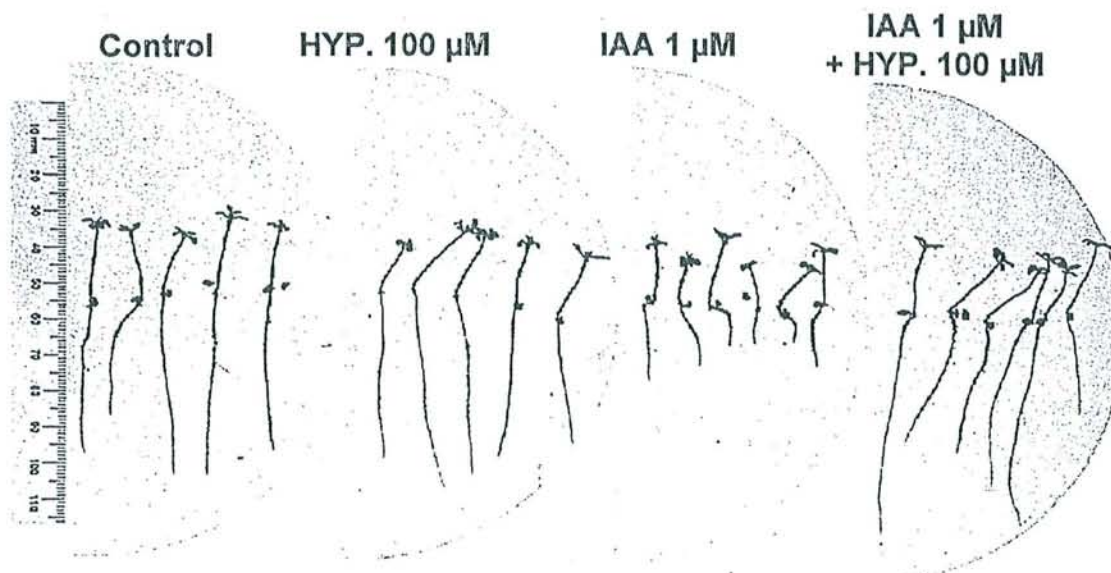


Fig. 2. Development of 7-day-old *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* seedlings cultivated over agar nutrient medium (Control) supplemented with 100 μM hypaphorine, 1 μM indole-3-acetic acid (IAA), or a combination of 1 μM IAA and 100 μM hypaphorine.

Since ACC could have been metabolized by the hyphae, the concentration of ACC in the agar medium at the end of the experiment under fungal colonies was accessed, and was found to be not significantly different from the initial concentration ($10.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$). Furthermore, at the end of the experiment, the cellophane films were removed together with seedlings and fungal colonies, to allow fresh seeds to be laid over the agar surface. Following germination, the new seedlings suffered the same symptoms as the first rotation seedlings (data not shown), confirming that ACC was still present in the nutrient medium and that hypaphorine did not accumulate significantly in the agar medium.

DISCUSSION

The aim of this study was to determine whether fungal hypaphorine could regulate auxin activity during host plant root colonization.

The results presented demonstrate that hypaphorine is able to antagonize exogenous IAA activity on root elongation. In contrast to known molecules inhibiting auxin-regulated growth, hypaphorine probably does not directly control the

activity of secondary messengers (Augur et al. 1992) or the basic machinery of cell elongation (Hoson et al. 1992; Morré et al. 1995) because hypaphorine alone has no activity on root elongation, and because hypaphorine does not restore root elongation following 2,4-D or NAA treatment. While the mechanism of IAA/hypaphorine antagonism has not yet been elucidated, four major steps could be involved. Hypaphorine could regulate IAA transport, induce a cellular, IAA-specific detoxification mechanism, compete with IAA for some receptor, or interfere with IAA signal transduction.

So far the only auxin activity regulators identified are clofibric acid (PCIB) (Tsai and Arteca 1984) and anion-channel blockers (Thomine et al. 1997). We cannot exclude that hypaphorine regulates anion channels and consequently signal transduction. However, our results clearly contrast with those of Thomine et al. (1997) on elongating *Arabidopsis* hypocotyl. Indeed, anion-channel blockers counteract NAA and 2,4-D as well as IAA whereas hypaphorine counteracts exclusively IAA activity. Furthermore, while anion-channel blockers attenuated only partially auxin-induced responses, hypaphorine fully restored root elongation. Regarding PCIB, binding of 2,4-D to the auxin binding protein ABP40 was completely

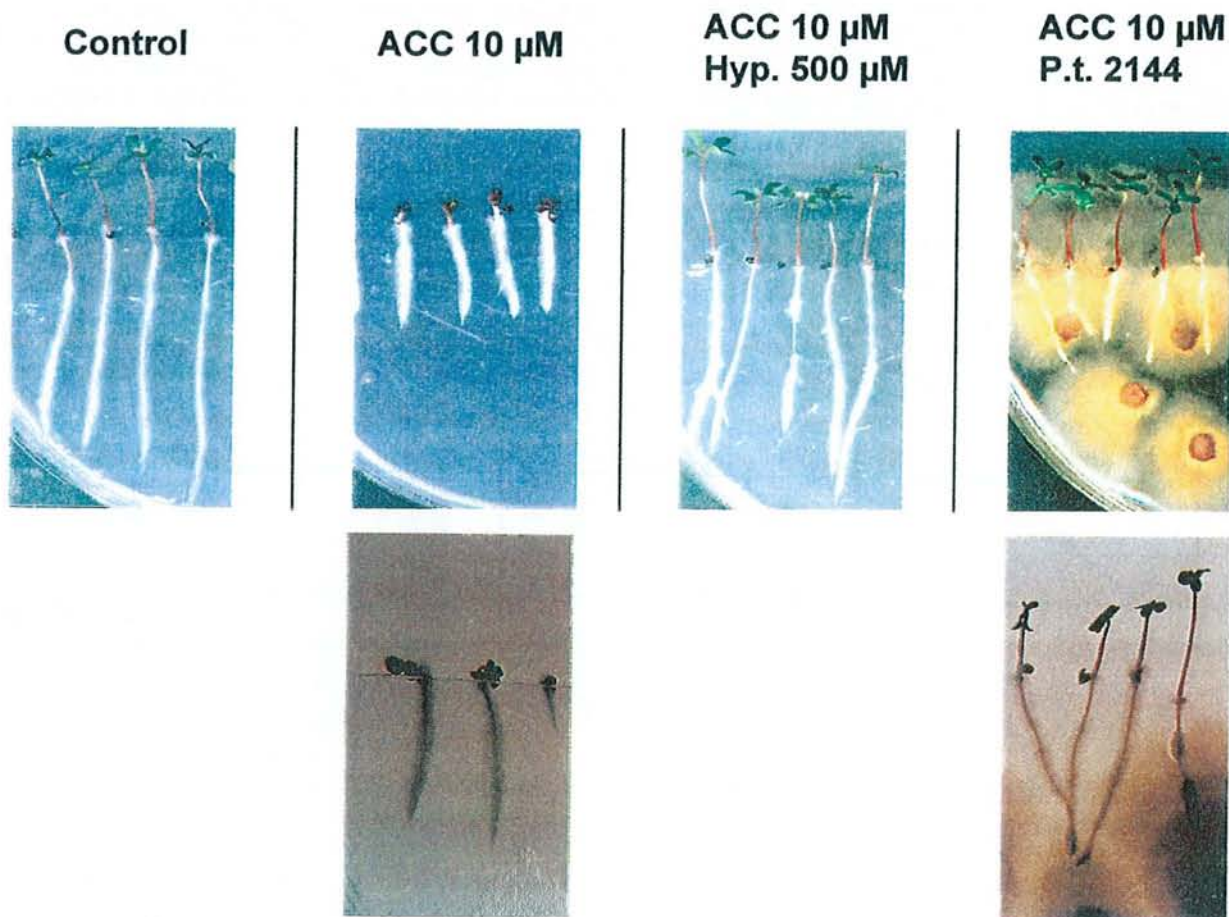


Fig. 3. Development of 10-day-old *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* seedlings cultivated over agar nutrient medium (Control) supplemented with $10 \mu\text{M}$ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), or a combination of ACC and $500 \mu\text{M}$ hypaphorine. Seedlings treated with $10 \mu\text{M}$ ACC were inoculated as well with the hypaphorine-producing fungus *Pisolithus tinctorius* strain 2144. To visualize the contact zone between roots and the agar medium, both photographs in the lower row were taken through the agar medium.

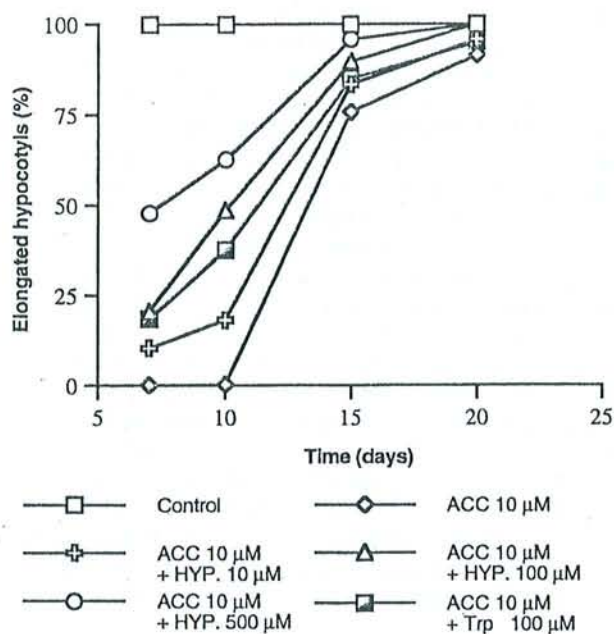


Fig. 4. Interaction between hypaphorine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) controlling hypocotyl elongation. *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* seedlings were cultivated over agar nutrient medium (Control) supplemented with 10 µM ACC, a combination of ACC and hypaphorine (10, 100, 500 µM), or ACC and tryptophan (100 µM). The kinetics of the hypocotyl elongation were followed over 20 days. Percentages of elongated hypocotyls were recorded among at least 30 seedlings per treatment.

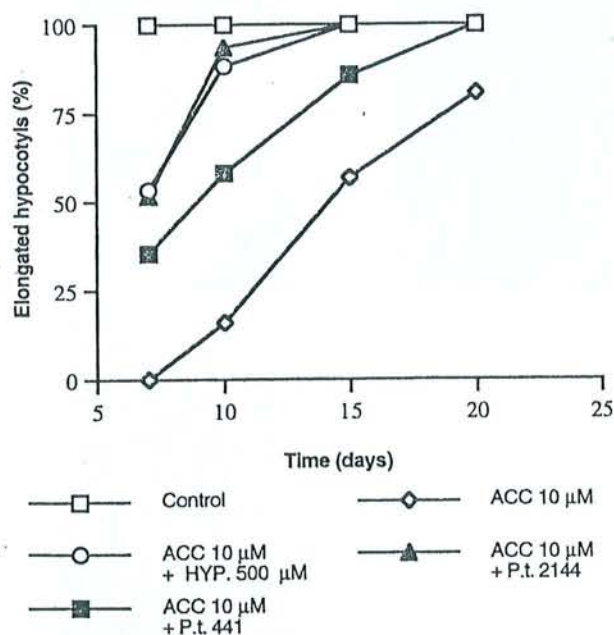


Fig. 5. Regulation of hypocotyl elongation by ectomycorrhizal fungi in the presence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* seedlings were cultivated over agar nutrient medium (Control) supplemented with 10 µM ACC, or a combination of ACC and 500 µM hypaphorine. Seedlings treated with 10 µM ACC were inoculated as well with two different strains of the hypaphorine-producing fungus *Pisolithus tinctorius*, an aggressive strain (441) and a very aggressive strain (2144). The kinetics of hypocotyl elongation were followed over 20 days. Percentages of elongated hypocotyls were recorded among at least 30 seedlings per treatment.

inhibited by PCIB (Sugaya and Sakai 1996), while our results recorded on elongating tap root suggest that hypaphorine and 2,4-D do not compete.

Hypaphorine probably does not interfere with IAA transport. Indeed, since NAA and 2,4-D are assumed to share either the influx or the efflux carrier with IAA (Delbarre et al. 1996; Yamamoto and Yamamoto 1998), hypaphorine would be expected to counteract as well with at least one of these two non-indolic auxins.

Here we assume that IAA and hypaphorine counteract during the very early steps of IAA perception or IAA signal transduction. Indeed, to a lesser extent, tryptophan antagonizes IAA activity as does hypaphorine. This suggests that the indol ring is a major active component of the hypaphorine molecule and therefore that both indolic molecules, IAA and hypaphorine, could be competing on a receptor involving the indol ring. The fact that both non-indolic auxins are not antagonized by hypaphorine would suggest that IAA is not perceived in the present case by the same receptors as those involved with 2,4-D and NAA.

The curvature of the apical hook in response to treatment with ACC, the precursor of ethylene, would result from accelerated growth of cells on the outer side of the hook, while hook opening under light would be due to accelerated growth of cells on the inner side thought to result from a reduction of ethylene biosynthesis or sensitivity (Goeschl et al. 1967; Smalle and Van Der Straeten 1997). Hypaphorine applied on roots antagonizes ACC activity in eucalypt seedling shoots.

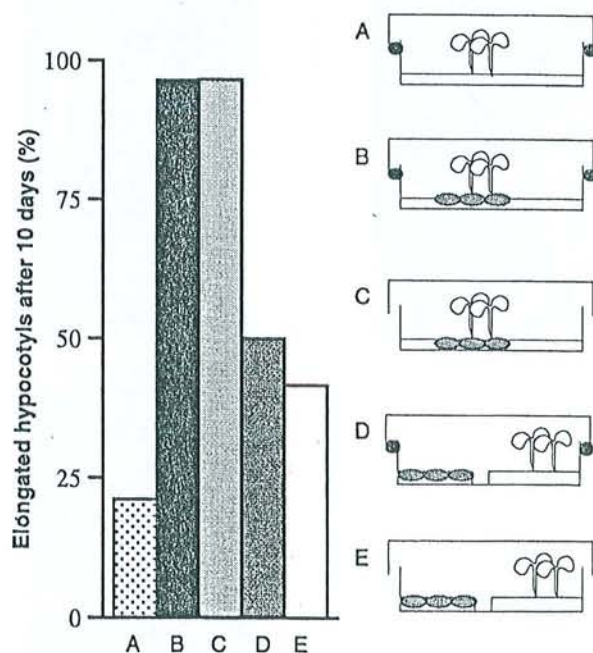


Fig. 6. *Pisolithus tinctorius* requires direct contact with roots to fully regulate hypocotyl elongation in the presence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* hypocotyl elongation was recorded after 10 days of culture over agar nutrient medium supplemented with 10 µM ACC in (A, B, D) sealed or (C, E) unsealed petri dishes. The hypaphorine-producing fungus *Pisolithus tinctorius* strain 2144 was introduced as well in the same petri dishes (B, C, D, E), either (B, C) in contact with the seedling roots or (D, E) separated from the roots by a trench into the agar medium. Percentages of elongated hypocotyls were recorded among at least 30 seedlings per treatment.

Both observations, hypaphorine interaction with IAA and ACC, tend to confirm that ethylene and IAA activities are linked somewhere to control the apical hook, as previously reported by Lehman et al. (1996). Indeed, while overexpression of the *HLS1* gene in *Arabidopsis* results in constitutive hook curvature, treatment of such seedlings with 2([1-naphthalenylamino]carbonyl)benzoic acid (NPA), an inhibitor of auxin transport, gives rise to *hls1* phenocopies in which hook curvature cannot even be induced by exogenous ethylene (Lehman et al. 1996). Therefore, here in eucalypt seedlings, by analogy with the above role of NPA and because hypaphorine is an indol alkaloid counteracting with IAA, we postulate that hypaphorine counteraction with ACC is a consequence of hypaphorine interaction with IAA.

The significance during root colonization of such hypaphorine interaction with IAA has been addressed. Because root elongation and ramification are strongly altered during fungal infection, it would have been hopeless to attempt to visualize IAA and fungal hypaphorine antagonism during root colonization by *P. tinctorius*. However, we could demonstrate that hypaphorine-producing fungal strains can mimic exogenous hypaphorine activity on shoot elongation in the presence of ACC. Considering the above postulate that hypaphorine counteraction with ACC is a consequence of hypaphorine interaction with IAA, this result suggests that the fungus is down-regulating the IAA activity in some plant tissues. As far as we know this is the first reported case of IAA activity in a plant being down-regulated by a microorganism. On the other hand, there are numerous cases in which microorganism colonization resulted in auxin over-accumulation in plant organs due to either massive microbial auxin delivery (Clark et al. 1989), host plant synthesis of auxin following microbe genome integration (Morris 1995), or auxin transport disruption (Mathesius et al. 1998).

Root colonization by *P. tinctorius* promotes hook opening, as does exogenous hypaphorine application. *P. tinctorius* activity is similar to the activities of hypaphorine concentrations ranging from 100 to 500 μM . Such hypaphorine concentrations are not unrealistic, in view of the high hypaphorine concentrations detected in mycelial mats of various *P. tinctorius* strains grown in pure culture on mineral nutrient media, ranging from 0.29 to 6.02 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (Béguiristain et al. 1995). For comparison, the IAA concentration in *P. tinctorius* strain 441 hyphae, in the same experimental conditions, was 5.62 nmol g^{-1} FW while the hypaphorine concentration was 1,000 times higher, 5.14 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (Béguiristain et al. 1995). The concentration of free tryptophan in *P. tinctorius* hyphae is at least 10-fold lower than the hypaphorine concentration and therefore tryptophan should not interfere significantly.

The flux of hypaphorine delivered to the root by colonizing hyphae still needs to be quantified. The fact, that after removal of the mycelium, hypocotyls again exhibited apical hooks when a second rotation of seedlings was grown over the ACC containing medium, suggests that fungal hypaphorine is not simply released into the nutrient medium where it accumulates before being absorbed by the roots. Accordingly, very low concentrations of hypaphorine were detected in the agar medium at the end of the experiment. Instead, hypaphorine must be transferred directly from hyphae to root cortex, i.e., through the Hartig net, the specialized transfer cells. There-

fore, the hypaphorine flux must be highly dependent on strain aggressiveness, its ability to rapidly colonize the root and develop a typical Hartig net. Here, the comparison of strains Pt 441 and Pt 2144 supports this idea. Indeed, among numerous strains compared in vitro or in a glasshouse, strain 2144 is one of the most aggressive toward *Eucalyptus* spp. seedlings (Albrecht et al. 1994; Burgess et al. 1994); accordingly, Pt 2144 is much more active on hook opening than is Pt 441. This is true despite the fact that both strains share rather similar hypaphorine concentrations in pure culture (4.98 and 5.14 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW, respectively).

While in the present experimental conditions hypaphorine acts as an IAA antagonist, we reported previously the induction of *EgHypar* gene expression in eucalypt seedlings treated by IAA as well as hypaphorine (Nehls et al. 1998). As it is widely accepted that IAA is perceived by different types of receptors in the cell, this apparent contradiction would suggest that IAA and hypaphorine interact differently with different receptors.

Therefore, while the ectomycorrhizal fungus *P. tinctorius* is producing auxin (Beyrle 1995; Béguiristain et al. 1995), it is also accumulating and releasing an auxin antagonist, hypaphorine, whose concentration in hyphae increases fourfold during root tip colonization (Béguiristain and Lapeyrie 1997). It is not yet understood how, when, and where fungal and plant IAA on the one hand and fungal hypaphorine on the other interact during ectomycorrhiza development. We assume that such a subtle balance between active and counteractive molecules would regulate some critical developmental steps.

Regulation of IAA activity in host plant tissues by *P. tinctorius* hypaphorine could be a significant pathway of the symbiotic interaction; however, generalization of such a conclusion to other fungal species is still under investigation. Indeed, while hypaphorine has been detected so far only in *P. tinctorius* strains (Béguiristain et al. 1995), it cannot be excluded that other indole alkaloids, among some 1,200 described in plant and fungi, play a similar role in mycorrhizae involving non-hypaphorine-accumulating species.

MATERIALS AND METHODS

Biological material.

The host plant was *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* (Maid. et al.) Kirkp. Seeds were collected at Hill Top via Wee Jasper NSW, Australia and purchased from Kylisa Seeds (Australian Capital Territory, Australia). The ectomycorrhizal fungi were two strains of *Pisolithus tinctorius* Coker & Couch. These strains differ in their ability to colonize the root and to induce defense reactions (Albrecht et al. 1994). Strain 441, less aggressive, and strain 2144, more aggressive, toward *Eucalyptus* spp. were isolated from sporocarps collected respectively under *Eucalyptus citriodora* in Brazil and a *Eucalyptus* sp. in Australia.

Chemicals.

Hypaphorine was synthesized in vitro from tryptophan (Romburgh & Barger 1911). The purity of the product was determined by nuclear magnetic resonance (NMR) and high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis (Béguiristain et al. 1995). Tryptophan, ACC, IAA, 2,4-D, and NAA were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Eucalypt seedling growth conditions and treatments.

Eucalypt seedlings were germinated in petri dishes (140 mm diameter) on cellophane laid over modified Pachlewski's medium (7.3 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM diammonium tartrate, 7.3 mM MgSO_4 , 2.9 μM thiamine-HCl, 1 ml of trace element stock solution [Kanieltra, St. Pierre des Corps, France] and 20 g of agar per liter) supplemented or not with IAA (1 μM), ACC (10 μM), 2,4-D (1 μM), NAA (50 μM), tryptophan (100 μM), or hypaphorine (10, 100, 500 μM). When fungi were grown together with seedlings, and in comparative treatments, glucose (5 mM) was added to the nutrient medium. Petri dishes were "sealed" with Parafilm along 90% of their circumference. Where specified, to increase gas exchange during ACC treatment, "unsealed" petri dishes were used. Plates were maintained vertically with a slight angle to allow full elongation of the roots on the agar surface, in a controlled environment growth chamber (25°C) with 16 h light (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) and 8 h dark. Tap root length was recorded 7 days after germination; shoot elongation was monitored between 7 and 20 days after germination. At least 30 replicate seedlings were analyzed for all presented data. Each observation was confirmed by at least three independent replicate experiments.

Eucalyptus root colonization by *P. tinctorius* hyphae.

Petri dishes prepared as described above were inoculated with 9 fungal plugs distributed in the lower part of the plates. Colonies were grown for 2 weeks at 25°C in dark before eucalypt seeds were introduced as previously indicated. Then it took less than 3 days for the emerging roots to come in contact with the fungal colony.

Split-plate experiments.

When specified, to separate hyphae from roots inside the same plate, the medium was divided vertically into two compartments by removing a 5-mm-wide slice of agar.

Quantification of hypaphorine and ACC.

To assess the ACC and hypaphorine concentrations in the medium at the end of the experiment, agar samples were frozen, thawed, and centrifuged. The supernatant was analyzed by gas chromatography according to Lizada and Yang (1979) for ACC, and by HPLC according to Béguiristain and Lapeyrie (1997) for hypaphorine.

Statistical analysis.

Data from replicates were analyzed with StatView Student software (Abacus Concepts, Berkeley, CA) (analysis of variance followed by Fisher's protected least significant difference test, $P = 0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to C. Selve (Université Nancy I, France) for helping to synthesize hypaphorine and to H. Lagrange for hypaphorine HPLC analysis. We wish to thank S. Kotowski and C. Zipfel for helpful technical and bibliographic assistance. F. D. was supported by a fellowship from the Government of Gabon. This work was supported by the European Union Commission (INCO-DC contract: IC18 CT98 0319).

LITERATURE CITED

Albrecht, C., Burgess, T., Dell, B., and Lapeyrie, F. 1994. Chitinase and peroxidase activities are induced in eucalyptus roots according to ag-

- gressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. New Phytol. 127:217-222.
- Augur, C., Lu, Y., Sakai, K., Ogawa, T., Sinaý, P., Darvill, A. G., and Albersheim, P. 1992. Further studies of the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. Plant Physiol. 99: 180-185.
- Béguiristain, T., Côté, R., Rubini, P., Jay-Allemand, C., and Lapeyrie, F. 1995. Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry 40:1089-1091.
- Béguiristain, T., and Lapeyrie, F. 1997. Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. New Phytol. 136:525-532.
- Beyrle, H. 1995. The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. Pages 365-390 in: Mycorrhiza: Structure, Molecular Biology and Function. A. K. Varma and B. Hock, eds. Springer-Verlag, Berlin.
- Burgess, T., Dell, B., and Malajczuk, N. 1994. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. New Phytol. 127: 731-739.
- Clark, E., Vigodsky-Haas, H., and Gafni, Y. 1989. Characteristics in tissue culture of hyperplasia induced by *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophylae*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 35:383-390.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., and Guern, J. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. Planta 198:532-541.
- Dexheimer, J., and Pargney, J. C. 1991. Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. Experientia 47:312-320.
- Gay, G., Normand, L., Marmeisse, R., Sotta, B., and Debaud, J. C. 1994. Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. New Phytol. 128:645-657.
- Gea, L., Normand, L., Vian, B., and Gay, G. 1994. Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. New Phytol. 128:659-670.
- Goeschl, J. D., Pratt, H. K., and Bonner, B. A. 1967. An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. Plant Physiol. 42:1077-1080.
- Gogala, N. 1991. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. Experientia 47:331-340.
- Hampp, R., Ecker, M., Schaeffer, C., Wallenda, T., Wingler, A., Kottke, I., and Sundberg, B. 1996. Axenic mycorrhization of wild type and transgenic hybrid aspen expressing T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. Trees 11:59-64.
- Harley, J. L., and Smith S. E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- Horan, D. P. 1991. The infection process in eucalypt mycorrhizas. Ph.D. thesis. Australian National University, Canberra, Australia.
- Hoson, T., Masuda, Y., and Nevins, D. J. 1992. Comparison of the outer and inner epidermis inhibition of auxin-induced elongation of maize coleoptiles by glucan antibodies. Plant Physiol. 98:1298-1303.
- John, P. 1997. Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. Physiol. Plant. 100:583-592.
- Karabaghli-Degron, C., Sotta, B., Bonnet, M., Gay, G., and Le Tacon, F. 1998. The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. New Phytol. 140:723-733.
- Lehman, A., Black, R., and Ecker, J. R. 1996. HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required, for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. Cell 85:183-194.
- Lizada, M. A. C., and Yang, S. F. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Anal. Biochem. 100:140-145.
- Marrs, K. A. 1996. The functions and regulation of glutathion S-transferases in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 127-158.
- Martin, F., Lapeyrie, F., and Tagu, D. 1997. Altered gene expression during ectomycorrhizal development. Pages 223-242 in: The Mycota. Vol. V part A. G. Carroll and P. Tudzynski, eds. Springer-Verlag, Berlin.

- Mathesius, U., Schalman, H. R. M., Spaink, H. P., Sautter, C., Rolfe, B. G., and Djordjevic, M. A. 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoides and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14:23-34.
- Morré, D. J., Brightman, A. O., Hidalgo, A., and Navas, P. 1995. Selective inhibition of auxin-stimulated NADH oxidase activity and elongation growth of soybean hypocotyls by thiols reagents. *Plant Physiol.* 107:1285-1291.
- Morris, R. O. 1995. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in procaryotes. Pages 318-339 in: *Plant Hormones*. P. J. Davies, ed. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands.
- Nehls, U., Béguiristain, T., Ditengou, F., Lapeyrie F., and Martin, F. 1998. The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta* 207:296-302.
- Romburgh, P. V., and Barger, G. 1911. Preparation of the betaine of tryptophan and its identity with the alkaloid hypaphorine. *J. Am. Chem. Soc.* 99:2068-2070.
- Smalle, J., and Van Der Straeten, D. 1997. Ethylene and vegetative development. *Physiol. Plant.* 100:593-605.
- Sugaya, S., and Sakai, S. 1996. Identification of a soluble auxin-binding protein as a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Plant Sci.* 114:1-9.
- Thomine, S., Lelievre, F., Boufflet, M., Guern, J., and Barbier-Brygoo, H. 1997. Anion-channel blockers interfere with auxin response in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiol.* 115:533-542.
- Tsai, D. S., and Arteca, R. N. 1984. Inhibition of IAA-induced ethylene production in etiolated mung bean hypocotyl segments by 2,3,5-triodobenzoic acid and 2-(p-chlorophenoxy)-2-methyl propionic acid. *Physiol. Plant.* 62:448-452.
- Wallander, H., Nylund, J. E., and Sundberg, B. 1992. Ectomycorrhiza and nitrogen effects on root IAA: Results contrary to current theory. *Mycorrhiza* 1:91-92.
- Yamamoto, M., and Yamamoto, K. T. 1998. Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol.* 39:660-664.

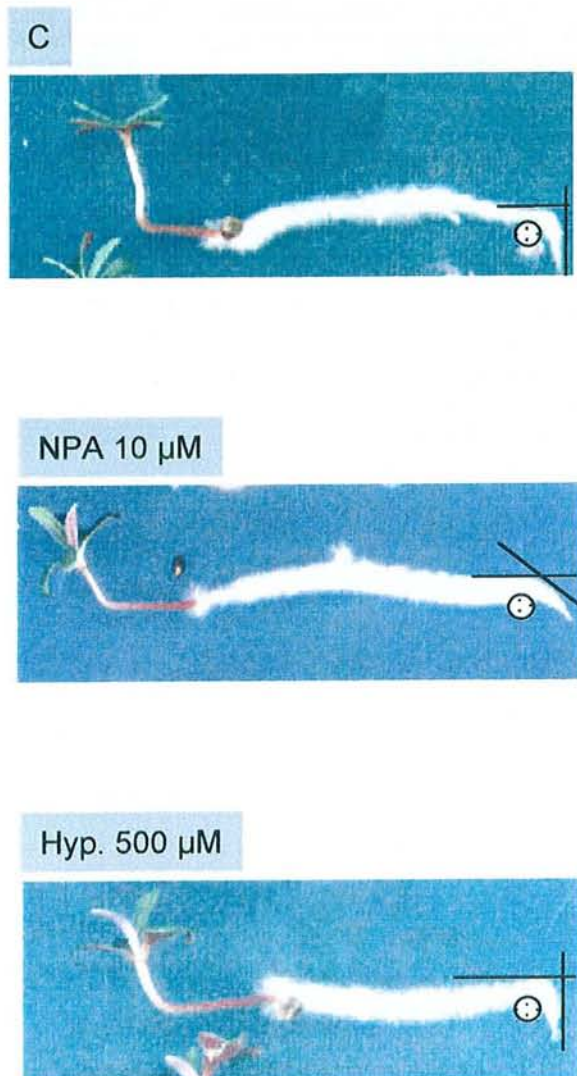


Figure 11 : Activité de l'hypaphorine sur la courbure gravitropique de racines d'*Eucalyptus globulus* orientées horizontalement.

C, control. Le NPA (10 μM) inhibe la courbure gravitropique.

L'hypaphorine (500 μM) est sans effet sur la courbure gravitropique.

⌚ Emplacement du bloc d'Agar

Résultat n° IV

Activité de l'hypaphorine sur le transport de l'AIA.

Dans le but d'étudier l'activité de l'hypaphorine sur le transport de l'AIA, nous avons comparé l'activité de l'hypaphorine sur la courbure gravitropique des racines d'*Eucalyptus* avec celle d'un inhibiteur du transport de l'AIA, le NPA connu pour affecter la réponse gravitropique (Rashote *et al.*, 2000).

Résultats et discussion

La figure 12 présente l'angle de courbure des racines, 24 heures après le dépôt au contact de la racine d'un bloc d'Agar (2 à 3 mm de l'apex) contenant soit de l'hypaphorine (500 μ M, une concentration qui régule l'allongement des poils absorbants, du pivot et de l'hypocotyle des d'*Eucalyptus*), soit du NPA (10 μ M). Les racines témoins sont traitées avec des blocs d'Agar ne contenant que de l'eau distillée.

Le fait de déposer le bloc d'Agar sur la partie supérieure ou sur la partie inférieure de la racine n'a pas affecté l'angle de courbure racinaire. En accord avec les résultats de Rashote *et al.* (2000), le NPA inhibe la courbure des racines d'*Eucalyptus* soumises à une modification de l'attraction gravitationnelle (Fig. 11). L'angle de courbure des racines en présence de NPA est de 47,8 ($\pm$ 8,585), alors que celui des racines témoins est de 80,6 ($\pm$ 6,348). Ce résultat confirme que le transport de l'AIA est une composante importante de la réponse gravitropique. En revanche, l'apport d'hypaphorine n'a pas, à l'instar du NPA, affecté la courbure gravitropique des racines d'*Eucalyptus* (Fig. 11). L'angle de courbure des racines traitées avec de l'hypaphorine (82,375 $\pm$ 5,449) est égal à celui des racines témoins, suggérant que l'hypaphorine n'a aucune activité sur le transport de l'auxine (Fig. 12).

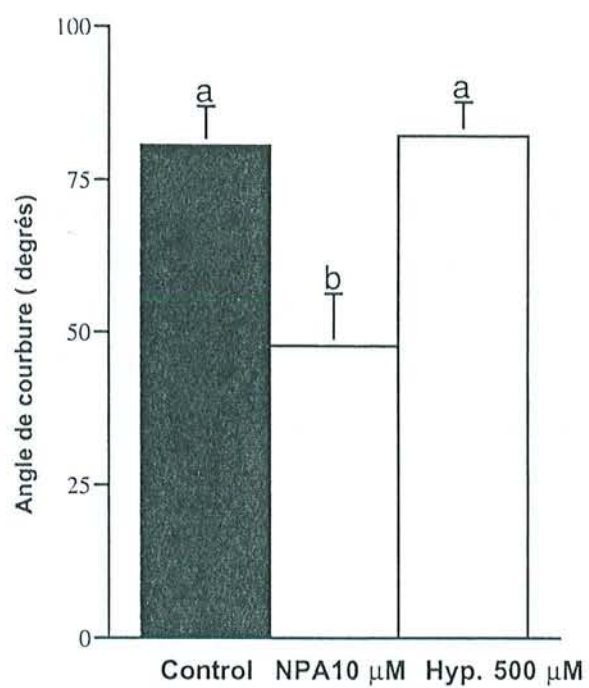


Figure 12 : Coubure gravitropique des racines d'*Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* en présence de NPA 10 µM, d'hypaphorine 500 µM ou d'eau distillée pour les témoins. Les valeurs moyennes d'au moins 5 racines sont comparées à l'aide d'un test t ($p = 0,05$).

DISCUSSION GENERALE

La mise en place d'une ectomycorhize nécessite l'établissement d'un dialogue étroit entre les deux partenaires. Cette communication impliquerait un échange de signaux moléculaires entre le champignon et son hôte. C'est à la recherche de ce type de signaux que T. Béguiristain au cours de son travail de thèse, a mis en évidence une forte accumulation d'hypaphorine dans les hyphes de *Pisolithus tinctorius* colonisant les racines de la plante hôte *Eucalyptus globulus* (Béguiristain et Lapeyrie, 1995). Plus récemment, H. Lagrange a identifié une molécule racinaire capable d'induire une suraccumulation d'hypaphorine dans les hyphes du partenaire fongique, *Pisolithus tinctorius* ; il s'agit d'une cytokinine, la zéatine qui joue vraisemblablement ici le rôle de molécule signal (Lagrange, communication personnelle).

Très tôt, de nombreuses questions se sont posées quant au rôle de l'hypaphorine au cours de la mise en place de l'ectomycorhize. T. Béguiristain au terme de son travail de thèse (Béguiristain, 1996) avait conclu que l'hypaphorine était probablement un analogue d'auxines. Ainsi, non seulement l'AIA et l'hypaphorine possèdent tous les deux un noyau indole, mais les deux molécules induisent l'expression du gène *EgHypar*, un gène racinaire régulé au cours de l'établissement de la symbiose (Nehls *et al.*, 1999).

Cependant, les résultats obtenus au cours cette thèse suggèrent déjà que l'hypaphorine puisse avoir une activité anti-auxinique au cours de l'ontogenèse mycorhizienne. En effet, l'hypaphorine n'induisait pas de prolifération racinaire, mais inhibait l'allongement des poils absorbants.

Comment l'hypaphorine régule-t-elle la croissance des poils absorbants ?

Contrairement aux résultats de Jackson (1960), puis de Ridge (1995) qui montraient une faible stimulation de la croissance des poils absorbants en présence d'auxines (AIA et 2,4 D), un apport d'hypaphorine dans le milieu de culture induit une forte réduction de la taille des poils absorbants (Béguiristain, 1997), la seule activité morphogène de l'hypaphorine.

L'étude approfondie de ce phénomène en milieu liquide et sur des temps courts (2 à 3 heures) nous a permis de montrer que l'hypaphorine, apportée dans le milieu d'incubation entraîne rapidement (15 minutes) un ralentissement (hypaphorine 100 μ M), voire un arrêt (hypaphorine 500 μ M ou plus) de la croissance des poils absorbants. Ce contrôle de la vitesse

de croissance des poils absorbants s'accompagne de déformations à l'apex des poils. Mais, même aux concentrations élevées (500 μ M ou plus), l'induction de nouveaux poils absorbants à partir des trichoblastes n'est pas affectée, confirmant que l'initiation des poils absorbants est un phénomène bien distinct de l'élongation. L'hypaphorine régule donc uniquement l'élongation de la cellule.

Cette activité de l'hypaphorine sur les poils absorbants est dans une certaine mesure spécifique, en effet, l'activité du tryptophane (un acide aminé indolique), est 10 fois inférieure à celle de l'hypaphorine, tandis que l'AIA (l'auxine naturelle) dans nos conditions expérimentales, n'a pas d'activité sur l'élongation des poils. Par ailleurs, la bétaine, le deuxième élément constitutif de la molécule d'hypaphorine est également sans effet (Béguiristain et Lapeyrie 1997).

D'autres résultats ont permis de montrer que l'hypaphorine et l'AIA possèdent des activités opposées sur l'allongement des poils absorbants. En effet, sur des poils absorbants dont la croissance a été préalablement inhibée par l'hypaphorine, un apport d'AIA à des concentrations pourtant inactives ici (0.01 à 1 μ M), permet de restaurer rapidement une vitesse d'allongement normale. Cette activité de l'AIA sur des poils préalablement inhibés par l'hypaphorine suggère qu'il existe une interaction entre ces deux molécules et tend à confirmer l'hypothèse émise par T. Béguiristain. Ces résultats confortent également l'idée précédemment énoncée par Pitts *et al.* (1998), selon laquelle, dans les poils absorbants, la teneur en AIA endogène est optimale, pour maintenir un taux d'élongation maximum. Ici, l'interaction hypaphorine / AIA endogène, induirait une diminution de l'activité de l'AIA endogène et par voie de conséquence, une réduction de la croissance des poils absorbants. Un apport d'AIA exogène permettrait quant à lui, de compenser le déficit d'activité de l'AIA endogène et de restaurer un allongement normal des poils absorbants.

Le mécanisme gouvernant l'interaction hypaphorine / AIA dans les poils absorbants demeure pour l'heure inconnu. Il pourrait par exemple impliquer une perturbation du transport de l'AIA. L'interaction hypaphorine / AIA pourrait également impliquer une perturbation des flux de calcium. En effet, de nombreux résultats expérimentaux (Schiefelbein *et al.*, 1992 ; Wymer *et al.*, 1997 ; Bibikova *et al.*, 1997) ont montré l'importance du gradient apical de calcium dans le maintien d'un allongement des cellules à croissance dite apicale (hyphes, tubes polliniques ou poils absorbants). L'inhibition de l'allongement des poils absorbants par

l'hypaphorine pourrait être une conséquence de la modification du gradient de calcium à l'apex du poil, via un mécanisme qui reste à élucider. Des résultats préliminaires enregistrés sur des cellules en culture semblent confirmer partiellement cette hypothèse (Kawano, communication personnelle).

Concomitamment à un arrêt de croissance, l'hypaphorine fongique induit également des renflements et des déformations transitoires à l'apex des poils absorbant. Ces déformations rappellent celles qui sont observées sur des poils absorbants de légumineuses traités avec des facteurs Nod de *Rhizobium*. Elles sont alors associées à une redistribution des ions calcium à l'apex des poils (De Ruijter 1998). Nous avons émis l'hypothèse que de telles modifications impliquent, comme en présence des facteurs Nod, une nouvelle organisation du cytosquelette, ce que nous avons vérifié. Les déformations induites par l'hypaphorine s'accompagnent d'une réorganisation des filaments d'actine dans les poils absorbants. Les filaments d'actine sont fins et convergent vers l'apex des poils témoins. En présence d'hypaphorine, ils sont agrégés dans la zone subapicale et ne sont plus focalisés à l'apex. Il est difficile de dire à ce stade de nos travaux, si c'est une perturbation de la croissance qui va induire une nouvelle organisation du cytosquelette ou l'inverse. Ce sont les filaments d'actine qui gouvernent l'élongation des cellules à croissance dite apicale en orientant la distribution des vésicules à l'apex des poils (Kropf *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 1999). Les renflements observés à l'apex en présence d'hypaphorine, pourraient être la conséquence d'une nouvelle distribution de ces vésicules.

Nous savons qu'il existerait un lien entre l'organisation du cytosquelette et les flux de calcium cellulaires. Selon De Ruijter *et al.* (1999), une modification de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} entraînerait un déséquilibre entre les monomères d'actine, les protéines sur lesquelles s'accrochent ces filaments et les filaments d'actine eux-mêmes. Le mécanisme mis en jeu au cours du phénomène étudié ici reste à élucider. Cependant, on peut proposer que celui-ci implique une interaction hypaphorine / AIA ayant pour conséquence une modification des teneurs en calcium cytoplasmique, laquelle induirait une réorganisation du cytosquelette. Le rôle des ions calcium pourrait être précisé en étudiant la réponse de poils absorbants dont la croissance aura été préalablement inhibée en présence d'hypaphorine à un apport externe de calcium ou de ionophore à calcium.

Existe-t-il un antagonisme entre les molécules d'AIA et d'hypaphorine ?

Pour confirmer ce qui n'était encore à ce stade du travail, qu'une hypothèse, l'existence d'un antagonisme hypaphorine / AIA, nous avons utilisé la propriété que possède l'AIA d'inhiber l'allongement racinaire à forte concentration.

Conformément aux résultats obtenus par Béguiristain et Lapeyrie (1997), l'hypaphorine ne possède aucune activité sur le développement des pivots d'*Eucalyptus* alors que l'AIA (1 μ M), inhibe fortement l'allongement de celui-ci. Cependant, lorsque dans le même milieu de culture sont apportés simultanément l'hypaphorine (100 μ M) et l'AIA (1 μ M), les pivots s'allongent normalement. Ces résultats démontrent que l'hypaphorine et l'AIA ont des activités antagonistes sur l'élongation du pivot. Par contre l'hypaphorine ne restaure pas l'élongation de racines inhibées par un apport d'ANA ou de 2,4 D. A notre connaissance, il s'agit là de la première mise en évidence d'une différence d'activité entre l'AIA et ces deux auxines de synthèse. Ceci suggère que l'antagonisme AIA / hypaphorine intervient très précocement, lors de la perception du signal AIA ou lors des toutes premières étapes de la transduction. En effet, l'absence jusqu'à ce jour de résultats expérimentaux différenciant les activités de l'AIA de l'ANA et du 2,4 D, laisse soupçonner que toutes ces auxines partagent les mêmes voies de transduction. Pour pouvoir interpréter nos résultats expérimentaux, il faut donc admettre que ces trois auxines ne sont pas perçues par les mêmes récepteurs. Cette interprétation paraît d'autant plus plausible que seul l'AIA possède un noyau indole comme l'hypaphorine. Des résultats récents confirment le rôle clef du noyau indole lors de la perception de l'AIA, en effet deux autres alcaloïdes indolique, la yohimbine et la brucine possèdent une activité antagoniste de l'AIA strictement identique à celle de l'hypaphorine sur les poils absorbants, le pivot et les hypocotyles (A. Jambois, communication personnelle).

Nous écartons ici toutes les interprétations qui prendraient en compte une éventuelle inhibition du transport de l'AIA par l'hypaphorine. L'hypaphorine ne devrait pas perturber l'activité des transporteurs de l'AIA puisque que selon Delbarre *et al.* (1996) puis Yamamoto et Yamamoto (1998), le 2,4 D et l'ANA partageraient les mêmes transporteurs que l'AIA lors de l'influx ou de l'efflux cellulaire. Si l'hypaphorine régulait le transport de l'AIA, on s'attendrait donc à ce qu'elle interagisse avec au moins une de ces deux auxines synthétiques non indoliques. De plus, nous avons confirmé expérimentalement cette absence d'activité de l'hypaphorine sur le transport de l'AIA. En effet, l'hypaphorine n'inhibe pas la courbure

gravitropique des racines d'*Eucalyptus*, un phénomène qui dépend du transport basipetal de l'AIA (Chen *et al.*, 1999 ; Larkin *et al.*, 1996 ; Rashotte *et al.*, 2000).

Nous avons mis en évidence une nouvelle classe de molécules antagonistes de l'activité auxinique, les alcaloïdes indoliques. Les seules molécules identifiées à ce jour régulant l'activité de l'auxine étaient l'acide clofibrique ou PCIB (Tsai et Arteca 1984) et des inhibiteurs de canaux anioniques (Thomine *et al.*, 1997). L'hypaphorine interagit exclusivement avec l'AIA, ce qui la différencie des deux inhibiteurs cités ci-dessus. Les inhibiteurs de canaux anioniques bloquent aussi bien l'activité du 2,4 D, de l'ANA, que celle de l'AIA, et ceci seulement partiellement. Concernant le PCIB, une évidence indirecte suggère qu'il interagisse également avec le 2,4 D, Sugaya et Sakai (1996) ont rapporté l'inhibition complète de la fixation du 2,4 D sur l'ABP40 (un récepteur potentiel des auxines) par le PCIB.

L'hypaphorine fongique possède-t-elle une activité au cours de la colonisation racinaire ?

Considérant l'activité antagoniste de l'hypaphorine de synthèse en présence d'AIA, on peut s'attendre à ce que l'hypaphorine produite et accumulée en forte quantité dans les hyphes du champignon au cours de la colonisation racinaire soit active dans les tissus de la plante colonisée. En présence d'ACC, l'activité de l'hypaphorine de synthèse et celle de *P. tinctorius* sur le développement de l'hypocotyle démontrent que l'hypaphorine produite par le champignon régule l'activité de l'AIA au sein des tissus de la plante hôte. L'activité du champignon est équivalente à celle d'un apport de 100 ou 500 μM d'hypaphorine. Ceci suggère que les quantités d'hypaphorine délivrées par le champignon à la plante sont au moins de cet ordre, ce qui semble réaliste au regard des concentrations mesurées dans les hyphes de *P. tinctorius* en culture pure (0,29 - 6,02 $\mu\text{moles g}^{-1}$ de poids frais) (Béguiristain et Lapeyrie, 1995). Si les flux d'hypaphorine délivrés du champignon vers la plante restent à quantifier, il a été néanmoins montré récemment que la plante était capable d'absorber puis de transférer vers les parties aériennes de l'hypaphorine fournie dans le milieu de culture (Lagrange, communication personnelle). Nos résultats suggèrent que l'hypaphorine est transférée directement des hyphes vers le cortex racinaire, à travers le réseau de Hartig. En effet, les quantités d'hypaphorine s'accumulant dans le milieu de culture sont toujours très faibles. De plus l'activité anti-auxinique du champignon semble liée à son agressivité, son aptitude à coloniser rapidement les racines et à développer un réseau de Hartig fonctionnel.

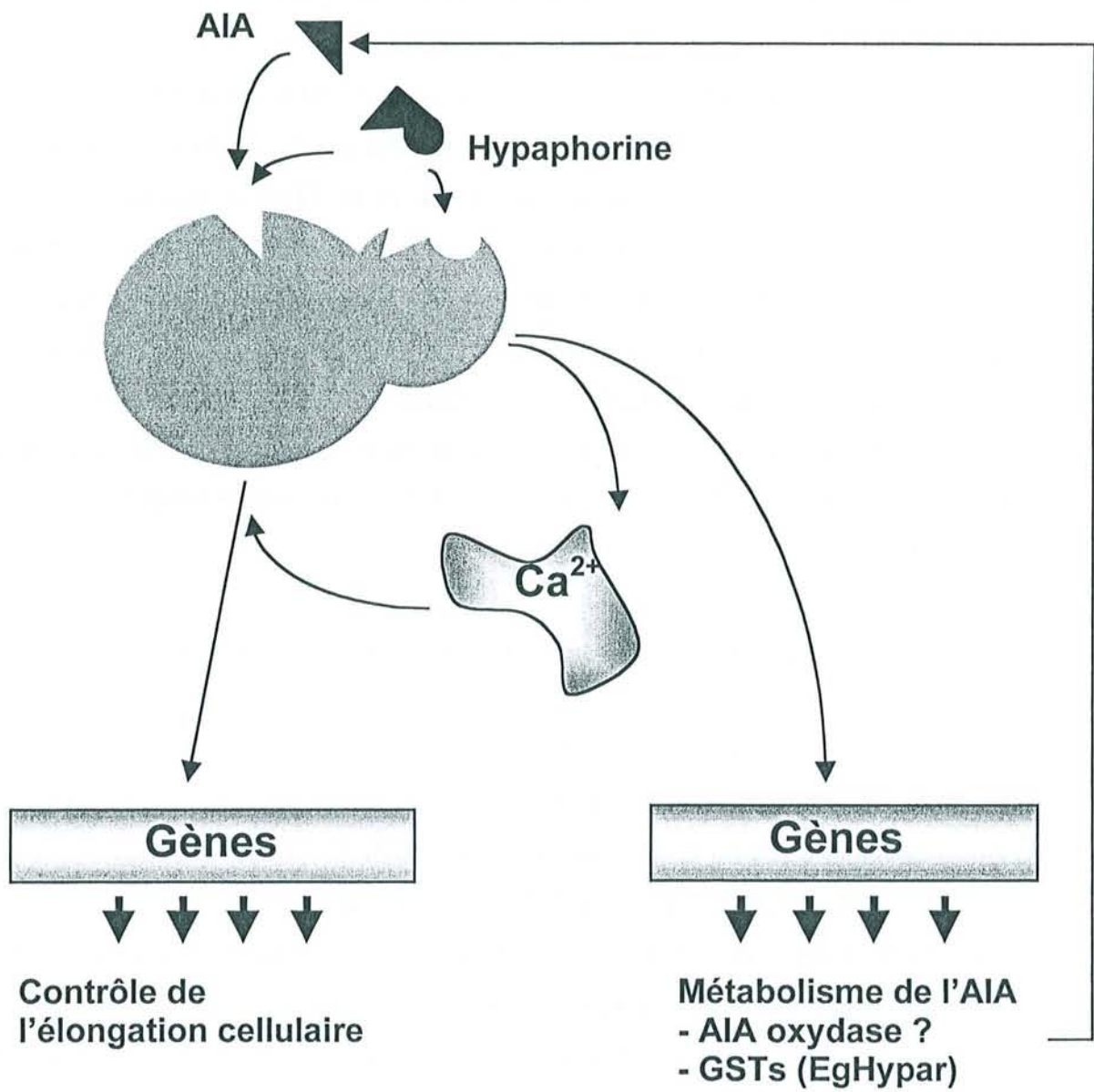


Figure 13 : Mode d'action de l'hypaphorine

Il s'agit là, de la première démonstration faisant état d'une réduction de l'activité de l'AIA par un microorganisme, dans les tissus de la plante hôte. À l'opposé, de nombreux cas ont été rapportés, dans lesquels la colonisation de la plante par un microorganisme conduit à une suraccumulation d'auxine dans les organes végétaux. Cette suraccumulation d'auxine est due, soit à une livraison massive d'auxine par le microorganisme (Clark *et al.*, 1989), soit à une synthèse accrue d'auxine par la plante après intégration du génome microbien (Morris, 1995), soit à une perturbation du transport de l'auxine par le microorganisme (Mathesius *et al.*, 1998).

Quel pourrait être le mode d'action de l'hypaphorine ?

À la suite de ce travail, les hypothèses ci-après sont formulées quant au mode d'action de l'hypaphorine (Fig. 13).

L'hypaphorine par l'intermédiaire du noyau indolique, pourrait rentrer en compétition avec l'AIA sur son site de perception ou se fixer sur un autre site du même récepteur, ce qui induirait par exemple la déformation du site de perception de l'AIA et le rendrait inaccessible. L'hypaphorine pourrait également agir sur les étapes précoces de la voie de perception de l'AIA via par exemple une modification des pools de calcium cellulaire. Mais il ne peut cependant pas être exclu que l'hypaphorine régule l'expression de certains gènes. C'est le cas par exemple des gènes codant des AIA-oxydases (Frenkel, 1972) ou des GSTs. Ces protéines pourraient en retour contrôler la teneur en AIA active dans la cellule.

Pourquoi l'hypaphorine, une molécule anti-auxinique, ne possède qu'une seule activité morphogène ?

Les résultats présentés ici montrent que l'hypaphorine agit comme un antagoniste de l'AIA, bien que précédemment nous ayons rapporté que l'hypaphorine avait une activité auxinique, comme l'AIA elle régule l'expression du gène *EgHypar* (Nehls *et al.*, 1998). Cette apparente contradiction suggère que l'AIA et l'hypaphorine interagissent différemment sur différents récepteurs. En effet, il est généralement admis que l'AIA est perçue par différentes familles de récepteurs répartis de façon non homogène entre les différents tissus et les différentes cellules d'une plante (Napier et Venis, 1995 ; Guilfoyle *et al.*, 1998).

Ceci permettrait d'expliquer pourquoi l'hypaphorine, une molécule anti-auxinique, ne possède qu'une seule activité morphogène, l'inhibition de l'allongement des poils absorbants. Le développement de la racine n'est par ailleurs pas affecté par un apport d'hypaphorine, même à de très fortes concentrations. Ainsi, l'interaction hypaphorine / AIA n'interviendrait que dans des processus impliquant l'élongation cellulaire. C'est le cas, lors de l'allongement des poils absorbant, mais aussi lorsqu'un apport d'hypaphorine restaure l'allongement du pivot ou de l'hypocotyle inhibés par une accumulation d'AIA. À l'opposé, l'hypaphorine n'inhibe ni le fonctionnement, ni l'induction de nouveaux méristèmes. Il existerait donc dans ces deux types de cellules (en division ou en élongation), deux "familles" de récepteurs ; une famille percevant uniquement l'AIA sur les cellules en division et une famille percevant à la fois l'AIA et l'hypaphorine sur les cellules en élongation. On peut également imaginer qu'un même récepteur puisse changer de conformation lorsque la cellule se différencie, lorsque après s'être divisée, elle va s'allonger.

Quel pourrait être la signification d'une interaction hypaphorine / AIA lors du développement d'une ectomycorhize ?

Le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* synthétise à la fois de l'AIA (Beyrle 1995 ; Béguiristain *et al.*, 1995), et un antagoniste de l'auxine, l'hypaphorine. La concentration en hypaphorine des hyphes augmente d'un facteur 4 lorsque le champignon colonise la racine de la plante hôte *Eucalyptus globulus* (Béguiristain *et al.*, 1997). Pour l'heure, il reste difficile de dire comment, quand et à quel endroit l'auxine de la plante, celle du champignon et l'hypaphorine interagissent durant le développement de l'ectomycorhize. Cependant, au cours du processus symbiotique, l'activité de l'AIA est vraisemblablement régulée dans le temps et dans l'espace.

Certaines étapes critiques de l'ontogenèse ectomycorhizienne, devrait impliquer un subtil équilibre entre des molécules actives telles que l'AIA et des molécules régulatrices comme l'hypaphorine. Ainsi, la régulation de l'activité de l'AIA dans les tissus de la plante par le champignon pourrait constituer une étape indispensable à la mise en place de certains tissus symbiotiques. Des travaux récents abondent dans ce sens, en effet un apport d'inhibiteurs du transport de l'auxine, permet d'induire le développement de racines rappelant des ectomycorhizes (Kaska *et al.* 1999).

À ce jour, parmi les champignons analysés seul *P. tinctorius* produit de l'hypaphorine en quantité détectable, on pourrait donc douter du caractère universel de ces interactions, auxine / anti-auxine, au cours de l'établissement de la symbiose. En fait des travaux en cours semblent montrer qu'un champignon ectomycorhizien appartenant à un genre différents (*Paxillus involutus*) et ne produisant pas d'hypaphorine, possède néanmoins une activité anti-auxinique, cette activité pouvant être attribuée à la présence d'autres alcaloïdes indoliques (A. Jambois communication personnelle). À ce jour il existe environ 1200 alcaloïdes indoliques identifiés.

L'établissement d'une ectomycorhize bloque le développement des poils absorbants. À la place, chez les angiospermes, les cellules du rhizoderme qui auraient du porter les poils absorbants s'allongent radialement. Considérant l'activité de l'hypaphorine sur l'allongement des poils absorbants observée ici in vitro, nous suggérons que l'hypaphorine pourrait contribuer à cette réorientation du développement cellulaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce chapitre présente les perspectives à court et à moyen terme qui se dégagent à l'issu de ce travail de thèse. Certaines recouvrent des études en cours, dont quelques résultats préliminaires ont été mentionnés dans la discussion générale.

A. Conclusion générale

Le développement d'une ectomycorhize conduit à la différenciation de tissus spécialisés et à la formation d'interfaces cellulaires indispensables au bon fonctionnement de la symbiose. La mise en place de telles structures implique l'établissement d'un dialogue permanent entre les deux partenaires. Ce flux d'informations s'effectue par l'intermédiaire d'un échange de molécules signal dont certaines ont déjà été identifiées. De nombreuses études ont par exemple mis en évidence le rôle de l'auxine fongique au cours du développement de l'ectomycorhize. Cependant, cette hormone bien qu'active n'agit vraisemblablement pas seule et son activité est probablement régulée.

Nous avons montré que l'hypaphorine synthétisée et accumulée par le champignon *P. tinctorius* au cours du développement de l'ectomycorhize, possède une activité anti-auxinique. Ainsi, certaines étapes critiques de l'ontogenèse ectomycorhizienne, devrait impliquer un subtil équilibre entre des molécules actives telles que l'AIA et des molécules régulatrices telles que l'hypaphorine. La régulation de l'activité de l'AIA dans les tissus de la plante par le champignon pourrait constituer une étape indispensable à la mise en place de certains tissus symbiotiques.

Ce travail constitue la première démonstration faisant état d'une réduction de l'activité de l'AIA par un microorganisme, dans les tissus de la plante hôte. De plus il semblerait que cela soit un phénomène général. En effet, des travaux en cours (A. Jambois) montrent qu'un champignon ectomycorhizien appartenant à un genre différent et ne produisant pas d'hypaphorine, possède néanmoins une activité anti-auxinique, cette activité pouvant être attribuée à la présence d'autres alcaloïdes indoliques.

B. Perspectives

Voici, les questions auxquelles il nous semble prioritaire de répondre à court terme :

Le rôle de l'hypaphorine sur les flux de calcium.

Nos résultats suggèrent que l'activité de l'hypaphorine sur l'allongement des poils absorbants et sur l'organisation du cytosquelette implique vraisemblablement une modification des gradients de calcium cytoplasmiques. L'utilisation de fluorochromes spécifiques, devrait permettre de visualiser les flux de calcium dans les poils absorbants en présence d'hypaphorine.

Nous avons montré que l'AIA était capable de restaurer la croissance des poils absorbants d'*Eucalyptus* préalablement inhibés par l'hypaphorine. Il serait nécessaire de vérifier l'impact de cette reprise rapide de croissance à la fois, sur l'organisation du cytosquelette et sur les flux de calcium dans les poils absorbants. Ceci devrait permettre de préciser la relation qui lie hypaphorine, auxine et flux de calcium à l'apex des poils absorbants.

La mise en évidence d'une compétition hypaphorine / auxine sur un récepteur

Nous avons montré que l'hypaphorine possède une activité antagoniste de l'auxine au cours du développement de l'ectomycorhize. Mais, comme l'hypaphorine n'interagit qu'avec l'acide indole 3-acétique (l'auxine naturelle), nous avons proposé que l'hypaphorine et l'AIA devaient entrer en compétition par l'intermédiaire du noyau indole, sur un même récepteur. Pour tester cette hypothèse, il faudrait étudier la compétition hypaphorine / AIA / 2,4 D / ANA sur des ABPs (Auxin Binding proteins) purifiées ou *in situ*, à l'aide de plantes surexprimant certaines ABPs.

La mise en évidence de gènes régulés par l'hypaphorine

Comme il est vraisemblable que l'interaction hypaphorine / AIA met en jeu la régulation de l'expression de certains gènes, nous envisageons également de nous intéresser aux gènes régulés par l'hypaphorine. Cela pourra se faire à l'aide d'ESTs (Expressed Sequence Tag) d'*Eucalyptus* ou de *Populus*, en cours d'obtention. L'identification des gènes régulés par l'hypaphorine et / ou l'auxine au cours de la colonisation racinaire contribuera à une meilleure connaissance de l'ontogenèse ectomycorhizienne.

À long terme, la transformation de *Pisolithus tinctorius* en vue d'obtenir des souches non productrices ou surproductrices d'hypaphorine, passage inévitable, devrait permettre de préciser le rôle de l'hypaphorine au cours de la mise en place de la symbiose.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS LES NANCY

BIBLIOGRAPHIE

Les références bibliographiques présentées dans ce chapitre concernent tous les articles cités dans les parties Introduction, Méthodologie, Discussion générale et dans la section Résultats n° IV. Les références citées dans les autres sections résultats se trouvent à la suite de chaque publication.

- Albrecht C**, Burgess T, Dell B and Lapeyrie F (1994). Chitinase and peroxylase activities are induced in eucalyptus roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus tinctorius* sp. *New Phytol.* **127** : 217-222.
- Ardourel M**, Demont N, Debelle F, Maillet F, Billy F, De Prome JC, Denarié J and Truchet G (1994). *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**: 1357-1374.
- Barea JM** and Azcon-Aguilar C (1982). Interactions between mycorrhizal fungi and soil microorganisms. *Colloques de L'Inra* **13**: 181-193.
- Bates TR** and Lynch JP (1996). Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* **19**: 529-538.
- Bauer P**, Ratet P, Crespi MD, Schultze M and Kondorosi A (1996). Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsEnod12A expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* **10**: 91-105.
- Bécard G** and Fortin JA (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* **108**: 211-218.
- Bécard G**, Douds DD and Pfeffer PE (1992). Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO and flavonols. *Appl. & Environ. Microbiol.* **58**: 821-825.
- Béguiristain T** (1996). Isolement et caractérisation du composé indolique majeur de *Pisolithus tinctorius*, l'hypaphorine. Etude de son rôle au cours de l'établissement de l'ectomycorhize d'*Eucalyptus* - *Pisolithus*. Thèse de Doctorat (spécialité Biologie Végétale et Forestière) de l'Université Henri Poincaré Nancy I France.
- Béguiristain T** and Lapeyrie F (1997). Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytol.* **136**: 525-532.
- Béguiristain T**, Cote R, Rubini P, Jay-Allemand C and Lapeyrie F (1995). Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. *Phytochem.* **40**: 1089-1091.
- Beyrle H** (1995). The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. In: A Varma and B Hock Eds, *Mycorrhiza*. Springer -Verlag, Berlin Heidelberg. pp 365-390.
- Bilang J** and Sturm A (1995). Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-Azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* **109**: 253-260.

- Björkman E** (1970). Forest tree mycorrhiza - The conditions of its formation and the significance for tree growth and afforestation. *Plant and Soil* **32**: 589-610.
- Bloemberg GV**, Kamst E, Harteveld M, Drift KMG, M van der Harteveld J, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ and Spaink HPA. (1995). central domain of *Rhizobium* NodE protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors. *Mol. Microbiol.* **16**: 1123-1136.
- Blomberg A** and Adler L (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microbial Physiol.* **33**: 145-512.
- Bofante-Fasolo P** and Gianizazzi-Pearson V (1982). Plant and endomycorrhizal fungi: the cellular and the molecular basis of their interaction. In: Molecular signal in Plant-Microbe Communication, Verma D.P.S. Eds.. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 445-470.
- Boullard B** et Lemoigne Y (1971). Les champignons endophytes du *Rhynia Gwynne-Vaughanii* : étude morphologique et déduction sur leur biologie. *Le Botaniste*, serie LIV (1-6): 49-89.
- Brunner I** and Scheidegger C (1992). Ontogeny of synthetized *Picea abies* (L.) Karst.-*Hebeloma crutiliniforme* (Bull. ex St Amzns) Quél. ectomycorrhizas. *New Phytol.* **120**: 359-369.
- Burgess T**, Laurent P, Dell B, Malajczuk N and Martin F (1995). Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. *Planta* **195**: 408-417.
- Caetano-Anollés G**, Crist-Estes DK and Bauer WD (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* **170**: 3164-3169.
- Caetano-Anollés G**, Wall LG, De Micheli AT, Macchi EM, Bauer WD and Favelukes G (1988). Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **86**: 1228-1235.
- Cardenas L**, Dominguez J, Quinto C, Lopez-Lara IM, Lugtenberg BJJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J and Thomas-Oates JE (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* **29**: 453-464.
- Cardenas L**, Vidali L, Dominguez J, Perez H, Sanchez F, Hepler PK and Quinto C (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* **116**: 871-877.

- Carnero Diaz E** (1996). Contribution à l'étude des gènes régulés par la symbiose chez l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius*. Etude de l'expression des gènes codant pour les α -tubulines au cours de la morphogenèse de l'ectomycorhize. Thèse de Doctorat en Sciences (Spécialité Phytopathologie) de l'Université de Paris XI, France.
- Chaboud A** and Lalonde M (1983). Lectin binding on surfaces of *Frankia* strains. *Can. J. Bot.* **61**: 2889-2897.
- Chen R**, Rosen E and Masson PH (1999). Gravitropism in higher plants. *Plant Physiol.* **120**: 343-350.
- Chilvers GA** (1968). Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. *A. J. Bot.* **26**: 49-70.
- Chilvers GA**, Douglass PA and Lapeyrie F (1986). A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytol.* **103**: 397-402.
- Clark E**, Vigodsky-Haas H and Gafni Y (1989). Characteristics in tissue culture of hyperplasia induced by *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophylae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **35**: 383-390.
- Cleland, RE.** (1995). Auxin and cell elongation. In: Plant hormones, Davies JP Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 214-227.
- Clowe FAL** (1951). The structure of mycorrhizal roots of *Fagus sylvatica*. *New Phytol.* **53**: 525-529.
- Cuming JR** (1990). Nitrogen source effects on Al toxicity in nonmycorrhizal and mycorrhizal pitchpine (*Pinus rigida*) seedlings. II. Nitrate reduction and NO_3^- uptake. *Can. J. Bot.* **68**: 2653-2659.
- D'Souza SE**, Ginsberg MH and Plow EF (1991). Arginyl-glycyl-Aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 246-250.
- De Ruijter NCA**, Bisseling T and Emons AMC (1999). *Rhizobium* Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 829-832.
- Dell B**, Botton B, Martin F and Le Tacon F (1989). Glutamate dehydrogenases in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.* **111**: 683-692.
- Dexheimer J** and Pargney JC (1991). Mycorrhizal interfaces. An example of parietal interactions. *Bulletin de la Société Botanique de France-Actualités Botaniques* **138**: 243-255.

- Dimetry** NZ, EL-Gengaihi S, Reda AS and Amer SAA (1992). Biological effects of some isolated *Abrus precatorius* L. alkaloids towards *Tetranychus urticae* Koch. Anz. Schädlingsskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz **65**: 99-101.
- Dixon** RA, Harrison MJ and Lamb CJ (1994). Early events in the activation of plant defense responses. Annual Review of Phytopathology. Annual Reviews Inc, Palo Alto 32. pp 479-501.
- Duddridge** JA, Malibari A and Read DJ (1980). Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* **287**: 834-836.
- Ek** M, Ljungquist PO and Stenstrom E (1983). Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. *New Phytol.* **94**: 401-407.
- Ersek** T, Gaborjanyi R, Holtzl P and Kiraly Z (1985). Sugar-specific attachment of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* to isolated single leaf cells of resistant soybean cultivars. *Phytopathologische Zeitschrift* **113**: 260-270.
- Farquhar** ML and Peterson RL (1990a). Early effects of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* on the root rot organism *Fusarium* associated with *Pinus resinosa*. *Can. J. Bot.* **68**: 1589-1596.
- Fortin** JA (1967). Action inhibitrice de l'acide 3-indolyl-acétique sur la croissance de quelques Basidiomycètes mycorrhizateurs. *Physiol. plant.* **20**: 528-532.
- Fortin** JA (1970). Interaction entre Basidiomycètes mycorrhizateurs et racines de pins en présence de d'acide 3-indolyl-acétique. *Physiol. plant.* **23**: 365-371.
- Foster** RC and Marks GC (1967). Observations of the mycorrhizas of forest trees II. The rhizosphere of *Pinus radiata* D. Don. *Aust. J. Biol. Sci.* **19**: 1027-1038.
- Frankenberger** WT and Jr Poth M (1987). Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. & Environ. Microbiol.* **53**: 2908-2913.
- Franssen** HJ, Vijn I, Yang WC and Bisseling T (1992). Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* **19**: 89-107.
- Frenkel** C (1972). Involvement of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase isoenzymes in pear, tomato, and blueberry fruit ripening. *Plant physiol.* **49** : 757-763.
- Gay** G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B and Debaud JC (1994). Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum Romagnesi* have increased mycorrhizal activity. *New Phytol.* **128**: 645-657.

- Gea L, Normand L, Vian B and Gay G (1994).** Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum Romagnesi*. *New Phytol.* **128**: 659-670.
- Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P, Didier E (1993).** Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiol.* **101**: 513-522.
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C and Citerinesi AS (1993b).** Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytol.* **123**: 115-122.
- Godbout C and Fortin JA (1983).** Morphological features of synthesised ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *A. rugosa*. *New Phytol.* **94**: 249-262.
- Goeschl J D, Pratt HK and Bonner BA (1967).** An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. *Plant Physiol.* **42**: 1077-1080.
- Gogala N (1967).** Die Wuchsstoff des Pilzes *Boletus edulis* var. *pinicolus* Witt. und ihre Wirkung auf die Keimung der Samen der Kiefer *Pinus sylvestris* L. *Biol Vestn (Lj)* **15**: 29-39.
- Gogala N (1971).** Growth substances in mycorrhiza of the fungus *Boletus pinicola* Vitt. and the pine tree *Pinus sylvestris* L. *Razprave* **14**: 123-202.
- Gogala N (1971).** Growth substances in the mycorrhizas of the fungus *Boletus pinicolus* Vitt. *Oesterr Bot. Z.* **118**: 321-333.
- Gogala N (1991).** Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by host fungi. *Experientia* **47**: 331-340.
- Gogala N and Pohleven F (1976).** The effect of cytokinins and auxins on the growth of mycorrhizal fungus *Suillus variegatus*. *Acta BotanicaCroatia* **35**: 129-134.
- Goldstein, IJ, Hughes, RC, Monsigny, M, Osawa, T. and Sharon, N. (1980).** What should be called a lectin? *Nature* **285**: 66.
- Graham JH and Linderman RG (1980).** Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f.sp. *pini*, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir roots. *Can. J. Microbiol.* **26**: 1340-1347.
- Griffaut B, Guiltat C and Guillot J (1990).** In vitro breaking of dormancy in Jerusalem artichoke tuber buds promoted by two N-acetyl hexosamines. Effect on lectin content. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 683-689.

- Guehl JM** and Garbaye J (1990). The effects of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water-use efficiency and response to transplanting in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. *Annales des Sciences Forestières* **47**: 551-563.
- Guilfoyle T**, Hagen G, Ulmasov T and Murfett J (1998). How auxin turns on genes ? *Plant physiol.* **118** : 341-347.
- Guillot J**, Giollant M, Damez M and Dusser M (1994). Involvement of fungal lectins in recognition between mushroom and tree during the early stages of mycorrhizal formation. *Act. Bot. Gal.* **141**: 443-447.
- Hager A**, Debus G, Edel HG, Stransky H and Serano R (1991). Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* **185**: 527-537.
- Halverson LJ** and Stacey G (1985). Host recognition in the *Rhizobium*-soyabean symbiosis. Evidence for the involvement of lectin in nodulation. *Plant Physiol.* **77**: 621-625.
- Hampp R** and Wingler A (1997). The role of mycorrhiza. A molecular approach to primery metabolism in higher plants. In: C Foyer and WP Quick. Eds, Taylor & Francis, London. pp 275-292.
- Hampp R**, Ecke M, Schaeffer C, Wallenda T, Wingler A, Kottke I and Sundberg B (1996). Axenic mycorrhization of wild type and transgenic hybrid aspen expressing T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Trees* **11**: 59-64.
- Hanley KM** and Greene DW (1987). Gibberellin-like compounds from two ectomycorrhizal fungi and the GA response on Scotch pine seedlings. *Hortscience* **22**: 591-594.
- Harborne JB** (1980). Plant phenolics. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Volume 8. Secondary plant products AE Bell, BV Charlwood Eds, Springer-Verlag, Berlin. pp 329-402.
- Harley JL** and Smith SE (1983). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc, London, 483pp.
- Hasenstein KH** and Evans ML (1988). Effects of cations on hormone transport in primary root of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**: 890-894.
- Henry TA** (1949). Plant Alkaloid 4th Edn, Churchill, London, pp 386-387.
- Hilbert JL**, Costa G and Martin F (1989). Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiol.* **97** : 977-984.
- Hillis WE**, Ihikura N, Foster RC and Marks GC (1968). The extractives of the mycorrhizas and roots of *Pinus radiata* and *Pseudotsuga menziesii*. *Aust. J. Biol. Sci.* **22**: 1425-1436.

- Ho I** (1987a). Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity, and phytohormone production. *Can. J. Forest Res.* **17**: 31-35.
- Ho I** (1987b). Enzyme activity and phytohormone production of a mycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*. *Can. J. Forest Res.* **17**: 855-858.
- Hofinger M**, Coumans M, Ceulemans E and Gaspar T (1976). Assigning a biological role to hypaphorine and lycine (two betaines). *Planta medica* **30**: 303-309.
- Hofinger M**, Gaspar TH and Darimont E (1970). Occurrence, titration and enzymatic degradation of 3-(3-indolyl)-acrylic acid in *lens culinaris* med. extracts. *Phytochem.* **9**: 1757-1761.
- Horan DP** (1991). The infection process in eucalyptus mycorrhizas. Ph D Thesis, Australian National University, Canberra Australia.
- Horan DP** and Chilvers GA (1990). Chemotropism - the key to ectomycorrhizal formation. *New Phytol.* **116**: 297-301.
- Hynes RO** (1992). Integrins: versality, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Iassac S** (1992). Fungal-Plant Interactions. Chapman and Hall Eds, London, 418pp.
- Ingham JL** (1973). Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectional and post-infectional resistance. *Phytopathologische Zeitschrift* **78**: 314-335.
- Jackson WT** (1960) Effect of indoleacetic acid on rate of elongation of root hairs of *Agrostis alba* L. *Physiol. Plant.* **13**: 36-45
- Jacobs PE**, Peterson RL and Massicotte HB (1989). Altered fungal morphogenesis during early stages of ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus pilularis*. *Scanning microscopy* **3**: 249-255.
- Jakobsen I** (1994). Research approaches to study the functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the field. In: Managment of Mycorrhizas in Agriculture Horticulture and Forestry, AD Robson, Abott LK and Malajczuk N Eds, Kluwer Academic Publisher, pp141-148.
- Janzen DH**, Lynn DG, Fellows LE and Hallwachs W (1982). The indole alkaloid, hypaphorine and *Pterocarpus* seed protection. *Phytochem.* **21**: 1035-1037.
- John P** (1997). Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. *Physiol. Plant.* **100**: 583-592.
- Jones AM** (1994). Auxin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 393-420.

- Kampert M** and **Strzelczyk E** (1990). Effect of amino acids on cytokinin-like substances production by mycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Agric. Ecosyst. Environ.* **28**: 219-228.
- Karabaghli-Degron C**, **Sotta B**, **Bonnet M**, **Gay G** and **Le Tacon F** (1998). The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytol.* **140**: 723-733.
- Kaska DD**, **Myllyla R** and **Cooper JB** (1999). Auxin transport inhibitors act through ethylene to regulate dichotomous branching of lateral root meristems in pine. *New Phytol.* **142**: 49-58.
- Koide RT**, **Suomi L** and **Berghage R** (1998). Tree-fungus interactions in ectomycorrhizal symbiosis. In: Recent advances in phytochemistry volume 32, Phytochemical signals and Plant-Microbe Interaction, JTRomeo, KR Downum and R Verpoorte Eds, Plenum Press, New York and London, pp 57-70.
- Kondo K**, **Ishii Y**, **Ishibahi M** and **Kobayashi J** (1994). Two new tryptophane-derived alkaloids from the Okinawan sponge *Aplysina* sp.. *J. of Nature Products* **57**: 1008-11.
- Kope HH** and **Fortin JA** (1989). Inhibition of phytopathogenic fungi in vitro by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **113**: 57-63.
- Kope HH** and **Fortin JA** (1990). Antifungal activity in culture filtrates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Bot.* **68**: 1254-1259.
- Kope HH**, **Tsantrizos YS**, **Fortin JA** and **Ogilvie KK** (1991). p-Hydroxybenzoylformic acid and (R)-(-)-p-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. *Can. J. Microbiol.* **37**: 258-264.
- Kottke I** and **Oberwinkler F** (1986). Mycorrhiza of forest trees-structure and fonction. *Trees* **1**: 1-24.
- Kottke I** and **Oberwinkler F** (1987). The cellular structure of The Hartig net: coenocytic and transfer cell-like organization. *N. J. Bot.* **7**: 85-95.
- Laurent P**, **Voiblet C**, **Tagu D**, **Carvalho D**, **Nehls U**, **De Bellis R**, **Balestrini R**, **Bauw G**, **Bonfante P** and **Martin F** (1999). A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 862-871.
- Le Tacon F**, **Lamoure D**, **Guimberteau J** and **Fiket C** (1984). The mycorrhizal symbionts of Norway spruce and Douglas fir in Limousin. *Revue Forestière Française* **36**: 325-338.

- Lee HT, Hwang PF and Tung YC (1979). Biochemical studies on precatorine. (VI). Effect of L-tryptophan and its N-methyl derivatives on the phosphoenolpyruvate carboxykinase of rot liver. *Chemical Abstracts* **92**: 40291b.
- Lei J and Dexheimer J (1988). Ultrastructural location of ATPase activity in the *Pinus sylvestris*/*Laccaria laccata* ectomycorrhizal association. *New Phytol.* **108**: 329-334.
- Lei J, Lapeyrie F, Malajczuk N and Dexheimer J (1990). Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake *in vitro*. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhizal formation. *New Phytol.* **116**: 115-122.
- Ling-Lee M, Chilvers GA and Ashford AE (1977). A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Deane and Maiden. *New Phytol.* **78**: 313-328.
- Lizada MCC and Yang SF (1979). A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* **100**: 140-145.
- Lonsane K and Kumar PKR (1991). Fungal plants regulators. In: Handbook of applied mycology volume 4. DK Arora, Elander RP and Murkerji KG Eds, Marcel Dekker INC, New York, pp 565-602.
- Lopez-Lara IM, Drift KMGM, van der. Brussel AAN, Haverkamp J, Lugtenberg BJJ, Thomas-Oates JE and Spaink HP (1995). Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Mol. Biol.* **29**: 465-477.
- Lopez-Lara IM, Orgambide G, Dazzo FB, Olivares J and Toro N (1995). Surface polysaccharide mutants of *Rhizobium* sp. (*Acacia*) strain GRH2: major requirement of lipopolysaccharide for successful invasion of *Acacia* nodules and host range determination. *Microbiology.* **141**: 573-581.
- Lürsen K, Naumann K and Schröder R (1979). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid - An intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* **Bd.92.S.285-294**.
- Malajczuk N, Lapeyrie F and Garbaye J (1990). Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *New Phytol.* **114** : 627-631.
- Malajczuk N, Molina R and Trappe JM (1982). Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytol.* **91** :467-482.

- Malajczuk N**, Molina R and Trappe JM (1984). Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus* II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New Phytol.* **96**: 43-53.
- Marklovà, E** and Hais, IM. (1992). Metabolismus kyseliny indolylacrylové. I. Hypaphorin. *Supplementum Sbornicu vědeckých prací LFUKv Hradci Kralové* **29**: 435-442.
- Marschner H** and Dell B (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**: 89-102.
- Martin F**, Lapeyrie F and Tagu D (1997) Altered gene expression during ectomycorrhiza development. In: Lemke P, Carroll G eds. *The Mycota. vol. VI. Plant relationships*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 223-242.
- Martin F**, Ramstedt M and Soderhall K (1987). Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *Biochimie* **69**: 569-581.
- Martin F**, Rubini P, Cote R and Kottke I (1994). Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: A ²⁷Al-nuclear magnetic resonance study. *Planta* **194**: 241-246.
- Marx DH** (1973). Mycorrhizae and feeder root diseases. Ectomycorrhizae, Their Ecology and Physiology. pp 351-382.
- Massicotte HB**, Melville LH and Peterson RL (1987a). Scanning electron microscopy of ectomycorrhizae, potential and limitations. *Scan. Microscop.* **1**: 1439-1454.
- Massicotte HB**, Peterson RL and Ashford AE (1987b). Ontogeny of *Eucalyptus pililuraris*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light Microscopy and scanning electron microscopy. *Can. J. Bot.* **65**: 1927-1939.
- Massicotte HB**, Peterson RL, Ackerley CA and Ashford AE (1987c). Ontogeny of *Eucalyptus pililuraris*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Can. J. Bot.* **65**: 1940-1947.
- Massicotte HB**, Peterson RL, Ackerley CA and Melville LH (1990). Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* **68**: 579-593.
- Mathesius U**, Schalman HRM, Spaink HP, Sautter C, Rolfe BG and Djordjevic MA (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoides and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* **14**: 23-34.
- Melin E** (1963). Some effects of forest tree roots on mycorrhizal fungus. *Science* **157**: 1055-1057.

- Miller DD**, De Ruijter NCA, Bisseling T and Emons AMC (1999). The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J.* **17**: 141-154.
- Minami E**, Kouchi H, Carlson RW, Cohn JR, Kolli VK, Day RB, Ogawa T and Stacey G (1996b). Cooperative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction of early nodulin, ENOD2, in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 574-583.
- Minami E**, Kouchi H, Cohn JR, Ogawa T and Stacey G (1996a). Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *Plant J.* **10**: 23-32.
- Molina R**, Massicotte H and Trappe JM (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, London, pp 357-423.
- Morris R O** (1995). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in procaryotes. In: *Plant hormones*. P.J. Davies, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 318-339.
- Mousain D** (1989). Etude la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Docteur d'Etat. Académie de Montpellier, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- Müller A**, Hillebrand H and Weiler EW (1998). Indole-3-acetic acid is synthesised from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **206**: 362-369.
- Munzenberger B**, Heilemann J, Strack D, Kottke I and Oberwinkler F (1990). Phenolics of mycorrhizas and non-mycorrhizal roots of Norway spruce. *Planta* **182**: 142-148.
- Munzenberger B**, Kottke I and Oberwinkler F (1995). Reduction of phenolics in mycorrhizas of *Larix decidua* Mill. *Tree Physiol.* **15**: 191-196.
- Nair MG**, Safir GR, and Siqueira JO (1991). Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied Envi. Microbiol.* **57**: 434-439.
- Nehls U**, Beguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F and Martin F (1998). The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta* **207**: 296-302.
- Newhall WF**, Hummon M, Jaffe MJ and Fluck RA (1975). Mode of action of 2-hydroxycyclohexyl quaternary ammonium plant regulators. *J. Agric. Food Chem.* **23**: 838-840.

- Nylund JE (1988). The regulation of mycorrhiza formation - carbohydrate and hormone theories reviewed. *Scand. J. Forest Res.* **3**: 465-479.
- Olsen RA, Odham G and Lindenberg G (1971). Aromatic substances in leaves of *Populus remula* as inhibitors of mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* **25**: 122-129.
- Paris, F. (1994). Champignons ectomycorhiziens et phytosyllicates Thèse de Doctorat (spécialité Biologie Végétale et Forestière) de l'Université Henri Poincaré Nancy I France.
- Pellissier F (1993). Allelopathic effect of phenolic acids from humic solutions on two spruce mycorrhizal fungi: *Cenococcum graniforme* and *Laccaria laccata*. *J. Chemical Ecology.* **19**: 2105-2114.
- Peters NK, Frost JW and Long SR (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**: 977-980.
- Peterson RL and Bofante P (1994). Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant and Soil* **159**: 79-88.
- Peterson RL and Farquhar ML (1996). Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. *Bot. Rev.* **62**: 1-40.
- Peterson RL, Howarth MJ and Whittier DP (1981). Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nudum*. *Can. J. Bot.* **59**: 711-720.
- Petit P, Lallement R and Savoye D (1983). Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var. *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker in situ. *New Phytol.* **94**: 103-110.
- Phillips DA, Dakora FD, Leon-Barrios M, Sande E and Joseph CM (1992). Signals released from alfalfa (*Medicago sativa*) regulate microbial activities in the rhizosphere. New horizons in nitrogen fixation. Proceedings of the 9th International Congress on Nitrogen Fixation, Cancun, Mexico, December 6-12, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 1993. pp 197-202.
- Phillips DA, Dakora FD, Sande E, Joseph CM and Zon J (1994). Synthesis, release, and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts. *Plant and Soil* **161**: 69-80.
- Piché Y, Peterson RL, Howarth MJ and Fortin JA (1983). A structural study of the interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* roots. *Can. J. Bot.* **61**: 1185-1193.
- Pocock K and Duckett JG (1984). A comparative ultrastructural analysis of the fungal endophytes in *Cryptothallus mirabilis* Hulm. and other British thalloid hepatics. *J. Bryology.* **13**: 227-233.

- Pocock K** and Duckett JG (1985). On the occurrence of branched and swollen rhizoids in British hepatics: their relationship with the substratum and association with fungi. *New Phytol.* **99**: 281-304.
- Poulin MJ**, Bel-Rhlid R, Piche Y and Chenevert R (1993). Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of optimal CO enrichment. *J. Chem. Ecology.* **19**: 2317-2327.
- Rasanayagam S** and Jeffries P (1992). Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. *Mycological Res.* **96**: 971-976.
- Rashotte AM**, Brady SR, Reed RC, Ante SJ and Muday GK (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **122**: 481-490.
- Raverty WD** and Thomson RH (1977). Metabolites from the sponge *Pachymatisma jhonstoni*. L-6-bromo-hypaphorine a new amino acid (and its crystal structure) J.C.S. Perkin **I**: 1204-1211.
- Read DJ** (1990). Mycorrhizas in ecosystems - nature's response to the 'law of the minimum. Frontiers in mycology. Honorary and general lectures from the Fourth International Mycological Congress, Regensburg, Germany, CAB International, Wallingford, UK: 1991.
- Read DJ** (1992). The mycorrhizal fungal community with special reference to nutrient mobilization. The fungal community: its organization and role in the ecosystem. Marcel Dekker Inc, New York, pp 631-652.
- Relic B**, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Prome JC and Broughton WJ (1993). Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 764-774.
- Rhodes D** and Hanson AD (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384.
- Ridge RW** (1995). Developments in the cell and Molecular Biology of Root Hairs. *J. Plant Res.* **108**: 399-405.
- Romburgh PV** and Barger G (1911). Preparation of the betaine of tryptophane and its identity with the alkaloid hypaphorine. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 2068-2070.
- Rouillon R**, Gay G, Bernillon J, Favre-Bonvin J and Bruchet G (1986). Analysis by HPLC-mass spectrometry of the indole compounds released by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* in pure culture. *Can. J. Bot.* **64**: 1893-1897.

- Rousseau JVD, Sylvia DM and Fox AJ (1994). Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol.* **128**: 639-644.
- Rudawska M (1983). The effect of nitrogen and phosphorus on auxin and cytokinin production by mycorrhizal fungi. *Arboretum Kornickie.* **28**: 219-236.
- Rudawska ML and Kieliszewska-Rokicka B (1997). Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* strains in relation to their IAA-synthesizing activity. *New Phytol.* **137**: 509-517.
- Rupp LA and Mudge KW (1985). Ethephon and auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ cultures of mugo pine. *Physiol. Plant.* **64**: 316-322.
- Rupp LA, DeVries HE II and Mudge KW (1989b). Effect of aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine on ethylene production by ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* **67**: 483-485.
- Rupp LA, Mudge KW and Negm FB (1989a). Involvement of ethylene in ectomycorrhiza formation and dichotomous branching of roots of mugo pine seedlings. *Can. J. Bot.* **67**: 477-482.
- Sanjuan J, Carlson RW, Spaink HP, Bhat UR, Barbour WM, Glushka J and Stacey G (1992). A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**: 8789-8793.
- Scales PF and Peterson RL (1991). Structure and development of *Pinus banksiana* - *Wilcoxina* ectendomycorrhizae. *Can. J. Bot.* **69**: 2135-2148.
- Schultze M, Quiclet-Sire B, Kondorosi E, Virelizier H, Glushka JN, Endre G, Gero SD and Kondorosi A (1992). *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**: 192-196.
- Shinshi H, Mohen D and Meins F (1987). Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 89-93.
- Shrestha T and Bisset NG (1991). Quaternary nitrogen compounds from South American Moraceae. *Phytochem.* **30**: 3285-3287.
- Slankis V (1971). Formation of ectomycorrhizae of forest trees in relation to light, carbohydrates and auxins. Proceedings of the 1st North American Conference on Mycorrhizae, University of Illinois, 1969. Miscellaneous Publication, US Department of Agriculture, Forest Service **1189**: 151-167.

- Slankis V** (1973). Hormonal relationship in mycorrhizal development. In: Ectomycorrhiza; Their Ecology and Physiology, GC Marks and Kozlowski TT Eds, Academic Press, New York, pp 231-298.
- Smalle J** and **Van Der Straeten D** (1997). Ethylene and vegetative development. *Physiol. Plant.* **100**: 593-605.
- Smith SE** and **Read JR** (1997). Mycorrhizal Symbiosis (2nd Edition). Academic Press, Harcourt Brace and company, publishers. 239 pp.
- Spaink HP**, **Geiger O**, **Sheeley DM**, **Brussel AAN van**, **York WS**, **Reinhold VN**, **Lugtenberg, BJJ** and **Kennedy EP** (1991). The biochemical function of the Rhizobium leguminosarum proteins involved in the production of host specific signal molecules. Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 142-149.
- Stachel SE**, **Messens E**, **Van Montagu M** and **Zambryski P.** (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**: 624-629.
- Strange RN** and **Mayer JR** (1974). The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiol. Plant Pathology* **4**: 277-290.
- Strange RN** and **smith H** (1971). Specificity of choline and betaine as stimulants of *Fusarium graminearum*. *Transactions of the British Mycology Society* **70**: 187-192.
- Strzelczyk E** and **Kampert M** (1987). Effect of B-group vitamins on cytokinin-like substances production by ectomycorrhizal-fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Symbiosis* **3**: 135-145.
- Strzelczyk E** and **Pokojska A** (1990). Effect of B-group vitamins on auxin-like substances production by ectomycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Agric. Ecosyst. Environ.* **28**: 483-491.
- Strzelczyk E** and **Pokojska-Burdziej A** (1984). Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant and Soil* **81**: 185-194.
- Strzelczyk E**, **Sitek J** and **Kowalski S** (1975). Production of gibberellin-like substances by fungi isolated from mycorrhizae of Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Acta Microbiologica Polonica, B.* **7**: 145-153.

- Sylvia DM** (1983). Role of *Laccaria laccata* in protecting primary roots of Douglas-fir from root rot. Tree root systems and their mycorrhizas. *Nijhoff/Junk, The Hague, Netherlands*, pp 299-302.
- Sylvia DM and Sinclair WA** (1983). Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopath.* **73**: 390-397.
- Tagu D and Martin F** (1996). Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. *New Phytol.* **133**: 73-85.
- Tagu D, Lapeyrie F, Ditengou F, Lagrange H, Laurent P, Missoum N, Nehls U and Martin F** (2000). Molecular aspects of ectomycorrhiza development. In: Current Advances in Mycorrhizae Research. GP Podila, and DD Douds Jr, St Paul, Minnesota, APS PRESS, pp 69-89.
- Taylor TN, Remy W, Hass H and Kerp H** (1995). Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia* **87**: 560-573.
- Thimann KV, Reese K and Nachmias VT** (1992). Actin and the elongation of plant cells. *Protoplasma* **171**: 153-166.
- Timonen S, Soderstrom B and Rausaskoski M** (1994). Changes in the amounts of cytoskeletal proteins in pine roots and fungi during the development of ectomycorrhiza. In: Fourth European Symposium on Mycorrhizas, Grenade, Espagne.
- Tonkin CM, Malajczuk N and McComb JA.** (1989). Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. *New Phytol.* **111**: 209-214.
- Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, De Billy F, Pröme JC and Denarié J.** (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.
- Tsai SM and Phillips DA** (1991). Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1485-1488.
- Tsantrizos YS, Kope HH, Fortin JA and Ogilvie KK** (1991). Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochem.* **30**: 1113-1118.
- Tung YC and Lee HT** (1976). T'a-wan I Hseuh Hui Tsa Chin. *Chemical Abstract* **88**: 319-47.
- Ulrich JM** (1960). Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* **13**: 429-444.

- Walker** LM and **Sack** FD (1995). Microfilament distribution in protenema of the moss *Ceratodon*. *Protoplasma* **189**: 229-237.
- Wallander** H, **Nylund** JE and **Sundberg** B (1992). Ectomycorrhiza and nitrogen effects on root IAA: results contrary to current theory. *Mycorrhiza* **1**: 91-92.
- Wallander** H, **Nylund** JE and **Sundberg** B (1994). The influence of IAA, carbohydrate and mineral concentration in host tissue on ectomycorrhizal development on *Pinus sylvestris* L. in relation to nutrient supply. *New Phytol.* **127**: 521-528.
- Wessels**, JGH. (1997). Hydrophobins: protein that change the nature of the fungal surface. *Adv. in Microbial Physiol.* **38**: 1-45.
- Wong** KKY and **Fortin** JA (1990). Root colonisation and intraspecific variation in ectomycorrhiza. *Symbiosis* **8**: 197-231.
- Yamamoto** M and **Yamamoto** KT (1998). Differential effects of 1-Naphtaleneacetic acid, Idole-3-acetic acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol.* **39**: 660-664.
- Young** LM, **Evans** ML and **Hertel** R (1990). Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **92**: 792-796.
- Yu** Y-B and **Yang** SF (1979). Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* **64**: 1074-1077.
- Zak** B (1973). Classification of ectomycorrhizae. In: *Ectomycorrhizae*, GC Marks and TT Kozlowski. Academic Press, New York. pp 43-78.

ANNEXES

Tableau 1 : Champignons mycorhiziens capables de produire des auxines libres ou des substances de type auxinique (d'après Beyrle, 1995)

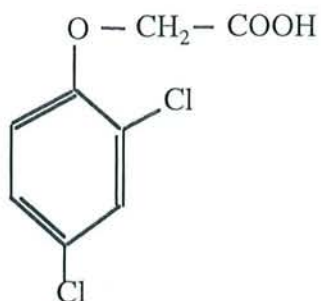
Champignon	Type de mycorhize	Phytohormone	Référence
<i>Amanita ceasaria</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
<i>Amanita frostiana</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
<i>Amanita muscaria</i>	Ectomycorhize	AIA	Ek <i>et al.</i> , 1983)
		Auxine	Ulrich (1960) Rudawska (1980, 1982) Strzelczyk et Pokojaska-Burdziej (1981) Strzelczyk et Pokojaska (1989)
<i>Amanita rubescens</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
<i>Boletus badius</i>	Ectomycorhize	AIA	Ek <i>et al.</i> , 1983) Ulrich (1960)
<i>Boletus bovinus</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
<i>Boletus felleus</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
<i>Boletus granulatus</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
<i>Boletus variegatus</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
<i>Cenococcum graniforme</i>	Ectomycorhize	AIA	Ek <i>et al.</i> , 1983) Rudawska (1980)
<i>Cephalosporum acremonium</i>	Ectomycorhize	Auxine	Strzelczyk <i>et al.</i> (1977)
<i>Cephalosporum glutineum</i>	Ectomycorhize	Auxine	Strzelczyk <i>et al.</i> (1977)
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Ectomycorhize	AIA	Gay et Debaud (1987) Gay <i>et al.</i> (1990) Durand <i>et al.</i> (1982)
<i>Hebeloma</i>	Ectomycorhize	AIA	Ek <i>et al.</i> (1983)

<i>crustiliniforme</i>			
<i>Hebeloma hiemale</i>	Ectomycorrhize	AIA	Gay <i>et al.</i> (1990) Rouillon <i>et al.</i> (1986) Tomaszewski et Wojciechowska (1973)
<i>Laccaria laccata</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ek <i>et al.</i> (1983) Ho (1987b)
<i>Laccaria rufus</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ek <i>et al.</i> (1983)
<i>Laccaria rufus</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ek <i>et al.</i> (1983)
<i>Paxillus involutus</i>	Ectomycorrhize	Auxine	Strzelczyk et Pokojska-Burdziej (1984)
<i>Pezizella ericae</i>	Ericoïde	AIA Auxine	Gay et Debaud (1986) Berta <i>et al.</i> (1988)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ho (1987a) Frankenberger et Poth (1987)
<i>Rhizopogon colossus</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ho et Trappe (1987)
<i>Rhizopogon ellenae</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ho et Trappe (1987)
<i>Rhizopogon luteolus</i>	Ectomycorrhize	Auxin	Rudawska (1980, 1983)
<i>Rhizopogon occidentalis</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ho et Trappe (1987)
<i>Rhizopogon subcaerulescens</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ho et Trappe (1987)
<i>Rhizopogon vinicolor</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ho et Trappe (1987)
<i>Rhizopogon vulgaris</i>	Ectomycorrhize	AIA	Ho et Trappe (1987)
<i>Suillus bovinus</i>	Ectomycorrhize	AIA Auxine	Ek <i>et al.</i> (1983) Rudawska (1980, 1983) ; Strzelczyk et Pokojska-Burdziej (1984) ; Strzelczyk et

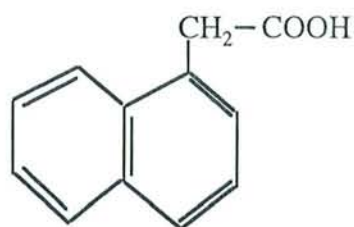
			Pokojska (1989)
<i>Suillus granulatus</i>	Ectomycorhize	AIA	Ek <i>et al.</i> (1983) ; Ulrich (1960)
<i>Suillus luteus</i>	Ectomycorhize Ectomycorhize Ectomycorhize	AIA AIA AIA	Ulrich (1960) Ek <i>et al.</i> (1983) Rudawska (1980, 1982, 1983) ; Strzelczyk et Pokojska-Burdziej (1984)
<i>Suillus variegatus</i>	Ectomycorhize	AIA	Ulrich (1960)
Endophyte de <i>Ophrys lutea</i>	Orchidoïde	AIA	Barroso <i>et al.</i> (1986)
24 endophyte de plantes ericoïdes	Ericoïdes	AIA	Gay et Debaud (1986)

Tableau 2 : Milieu de culture gélosé de Pachlewski,
(A) pour le repiquage du mycélium végétatif du *Pisolithus tinctorius*
(B) modifié pour la germination des graines d'*Eucalyptus globulus*

Composition du milieu	A : concentration finale	B : concentration finale
Di-ammonium tartrate	2.72 mM	-
KH ₂ PO ₄	7.35 mM	-
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2.03 mM	-
D-maltose	14 mM	0
D-glucose	100 mM	0
Agar	2% (p/v)	-
Thiamine-HCl	3% (p/v)	-
Solution de Kanieltra *	0,1% (v/v)	-

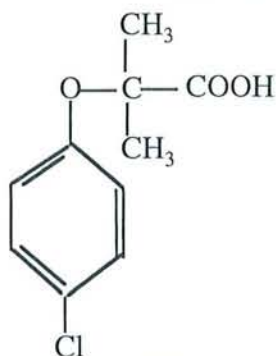


Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4 D)



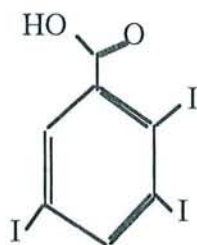
Acide α -naphtalene acétique (α -NAA)

Auxines de synthèse non indoliques

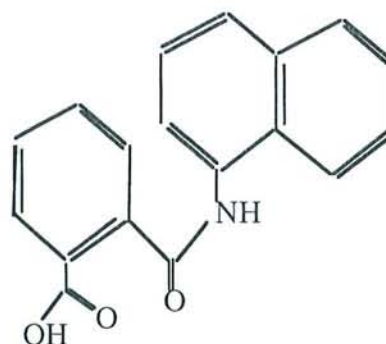


Acide chlolibrique (PCIB)

Anti-auxine



Acide 1-N-naphtylphthalamique (NPA)



Acide 2,3,5-triiodobenzoïque (TIBA)

Inhibiteurs du transport de l'AIA

Figure 1 : Structure de la molécule de 2,4 D et d'ANA (auxines de synthèse), de PCIB (anti-auxine), de TIBA et de NPA (inhibiteurs du transport des auxines)

Monsieur DITENGOU Franck Anicet

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I

en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 17 juillet 2000

Le Président de l'Université



~~~~~

## RESUME

La mise en place de la symbiose mycorhizienne implique l'établissement d'un dialogue entre deux partenaires, une plante et un champignon. Cette communication se fait par l'intermédiaire de molécules signal. La synthèse et l'accumulation d'hypaphorine (un alcaloïde indolique) dans les hyphes de *Pisolithus tinctorius* colonisant les racines d'*Eucalyptus globulus* a été précédemment rapportée. Bien que de structure moléculaire très proche de l'auxine naturelle (l'acide 3-indole acétique ou AIA), l'hypaphorine ne possède aucune activité auxinique sur le développement racinaire ou l'élongation des poils absorbants. Au contraire, l'hypaphorine se comporte comme un antagoniste de l'AIA. En effet, alors que les auxines (AIA et 2,4 D) stimulent faiblement l'allongement des poils absorbants, l'hypaphorine l'inhibe. La croissance apicale des poils inhibés par l'hypaphorine peut être restaurée en présence d'AIA. Cette inhibition s'accompagne de déformations à l'apex des poils, et d'une réorganisation du cytosquelette. L'activité de l'hypaphorine pourrait impliquer une modification des flux calciques à l'apex des poils.

Par ailleurs, deux résultats expérimentaux confirment l'antagonisme hypaphorine / AIA. Nous avons montré que l'hypaphorine restaure l'allongement de pivots d'*Eucalyptus* inhibés par de fortes concentrations d'AIA. De même l'hypaphorine synthétisée et accumulée par le champignon *Pisolithus tinctorius* au cours du développement de l'ectomycorhize, possède une activité anti-auxinique ; elle induit le redressement des hypocotyles d'*Eucalyptus* cultivés en présence d'ACC (un précurseur de la synthèse d'éthylène). Il s'agit là de la première démonstration faisant état d'une réduction de l'activité de l'AIA dans les tissus de la plante hôte, par un microorganisme.

Ainsi, certaines étapes critiques au cours de l'ontogenèse mycorhizienne, nécessiterait un subtil équilibre entre des molécules actives comme l'AIA et des molécules régulatrices comme l'hypaphorine.

## ABSTRACT

Very little is known about the molecules regulating the interaction between plants and ectomycorrhizal fungi during root colonisation. The role of fungal auxin in ectomycorrhiza has repeatedly been suggested and questioned, suggesting that if fungal auxin controls some steps of colonised root development, its activity might be tightly controlled in time and in space by plant and/or fungal regulatory mechanisms. Hypaphorine, the major indolic compound isolated from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, controls root hair elongation rate. At inhibitory concentrations, hypaphorine induces a transitory root hair tip swelling associated with root hairs cytoskeleton reorganisation. While IAA had no activity on root hair elongation, IAA was able to restore root hair polar growth following inhibition by hypaphorine. Hypaphorine activity could imply calcium flux modifications at the root hair tip.

Furthermore, two experimental results confirm hypaphorine / IAA antagonism. We have demonstrated that hypaphorine counteracts the inhibiting activity of IAA on *Eucalyptus* taproot elongation. Likewise, while seedling treatment with ACC, the precursor of ethylene, results in formation of an hypocotyle apical hook, hypaphorine application as well as root colonisation by *Pisolithus tinctorius*, stimulated hook opening. Hypaphorine counteraction with ACC is likely a consequence of hypaphorine interaction with IAA.

In most plant microbe interactions studied, the interactions result in increased auxin synthesis or auxin accumulation in plant tissues. The *P. tinctorius* / *Eucalyptus* interaction is intriguing because here, the microbe down regulates the auxin activity in the host plant. Hypaphorine might be the first specific IAA antagonist identified.