Dialogue moléculaire au cours de l'ontogénèse ectomycorhizienne : accumulation et activité anti-auxinique de l'hypaphorine, approches physiologique et génomique

Anne Jambois

▶ **To cite this version:**

Anne Jambois. Dialogue moléculaire au cours de l'ontogénèse ectomycorhizienne : accumulation et activité anti-auxinique de l'hypaphorine, approches physiologique et génomique. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2004. Français. NNT : 2004NAN10190 . tel-01748109

HAL Id: tel-01748109
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748109

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

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

Unité de Recherche 1136
INRA-Nancy / Université Henri Poincaré
"Interactions Arbres/Micro-organismes"
Champenoux

Université Henri Poincaré- Nancy I
UFR-Sciences et Techniques Biologiques
École doctorale RP2E
Vandoeuvre les Nancy

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Henri Poincaré

Spécialité : Biologie végétale et forestière

Par **Anne Jambois**

Dialogue moléculaire au cours de l'ontogenèse ectomycorhizienne: accumulation et activité anti-auxinique de l'hypaphorine, approches physiologique et génomique

Soutenue publiquement le 18 novembre 2004 devant la commission d'examen :

Président du jury:
Michel Chalot, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy, France

Rapporteurs :
Catherine Bellini, Directrice de Recherche, INRA, Uméa, Suède
Christian Jay-Allemand, Professeur, Université Montpellier 2, Montpellier, France

Examinateurs :
Francis Martin, Directeur de Recherche, INRA, Nancy, France
Frédéric Lapeyrie, Directeur de Recherche, INRA, Nancy, France

TOME 1

Avant de m'étendre sur les ectomycorhizes, permettez moi de rajouter quelques lignes à ce manuscrit pour exprimer toute ma gratitude envers certaines personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail et qui vont le juger. C'est grâce à elles, que j'écris avec plaisir, aujourd'hui, le mot **FIN**!....

Je remercie Monsieur Michel Chalot de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse, en espérant que ce soit un aussi agréable moment que nos soirées d'étudiants il y a quelques années....

Je remercie Catherine Bellini d'avoir accepté de juger mon travail. Pouvoir discuter avec une spécialiste de l'auxine sera certainement très enrichissant pour nous tous ici.

Je remercie Monsieur Christian Jay-Allemand qui, après avoir jugé mon travail de DEA, a accepté de réitérer l'expérience avec mon travail de thèse.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Francis Martin, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de cette aventure. Son enthousiasme, son écoute, ses compétences scientifiques et ses conseils m'ont été très bénéfiques.

Enfin et surtout, je tiens à remercier chaleureusement "mon" directeur de thèse Frédéric Lapeyrie pour nos échanges fructueux, nos discussions interminables, son humanisme, sa "disponibilité" et son humour. Tel un bon guide, il a su me montrer le chemin sans jamais me l'imposer.

TOME 2

Merci à tout ceux qui ont fait de ces années de thèse, 4 merveilleuses années.

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

. **REMERCIEMENTS** 1

. **SOMMAIRE** 2

. **AVANT-PROPOS** 4

. **INTRODUCTION** 6

I. LES ECTOMYCORHIZES, GÉNÉRALITÉS. ***6***
A. DES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES UBIQUISTES ET INDISPENSABLES ? 6
1) Bénéfices apportés par le champignon 6
2) Bénéfices apportés par la plante 8
3) Bilan et conséquences 8
B. L'ECTOMYCORHIZE, ANATOMIE D'UN ORGANE CHIMÉRIQUE 8
C. ONTOGENÈSE D'UNE ECTOMYCORHIZE : DE LA RENCONTRE À LA VIE DE COUPLE 9
1) Un processus universel 9
2) Un développement séquentiel 10
II. RECONNAISSANCE ENTRE PARTENAIRES ET COORDINATION DE L'ONTOGENÈSE : LE RÔLE DES MÉDIATEURS CHIMIQUES ***13***
A. LES SIGNAUX RHIZOSPHÉRIQUES 13
1) La litière : une première sélection de champignons compatibles 14
2) Les exsudats racinaires et leurs effets sur les hyphes 15
B. LES MOLÉCULES ÉMISES PAR LE CHAMPIGNON CONTRIBUANT À RÉGULER L'INTERACTION : L'ADHÉSION DES HYPHES, LA MODULATION DE LA BALANCE HORMONALE 17
1) L'adhésion des hyphes : le rôle des lectines 18
2) Phytohormones et ectomycorhizes 19
3) L'hypaphorine 23
III. LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ AUXINIQUE CHEZ LES PLANTES ***26***
A. LA RÉGULATION DE LA CONCENTRATION EN AIA LIBRE 26
1) La régulation de la synthèse 26
2) La régulation de l'AIA libre : catabolisme de l'AIA et conjugaison 27
3) La régulation du transport 27
B. LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ AUXINIQUE : DE LA PERCEPTION À LA TRANSDUCTION DU SIGNAL 29
1) La perception de l'auxine 29
2) La régulation de la transduction 29
IV. L'ONTOGENÈSE ECTOMYCORHIZIENNE ; DE L'EXPRESSION DES GÈNES AUX CONSÉQUENCES PHYSIOLOGIQUES ***30***
A. LES MODIFICATIONS DU PROTÉOME 31
1) Un profil polypeptidique nouveau 31
2) Une modification de la biosynthèse protéique précoce 31
3) Des modifications de la biosynthèse protéique plus tardives 32
4) Une diminution sensible de la biosynthèse protéique des racines 32
5) Une augmentation de la synthèse protéique de quelques polypeptides fongiques ; caractérisation de protéines SR 33
B. LES MODIFICATIONS DU TRANSCRIPTOME 35

1) Des programmes de séquençages systématiques à l'étude des modifications de l'expression de gènes 35
2) Un programme de mycorhization commun 36
V. OBJECTIFS ET MODÈLES D'ÉTUDES 37
A. IDENTIFICATION DE « MOLÉCULES SIGNAL », DE LA RACINE VERS LE CHAMPIGNON 37
B. IDENTIFICATION DE « MOLÉCULES SIGNAL », DU CHAMPIGNON VERS LA RACINE, DES INHIBITEURS COMPÉTITIFS DE L'ACTIVITÉ AUXINIQUE 38
C. ACTIVITÉ DE L'HYPAPHORINE FONGIQUE ET DE L'AUXINE SUR L'EXPRESSION DE GÈNES D'UNE PLANTE HÔTE, LE PEUPLIER 38

. RÉSULTATS 40

I. LES JASMONATES, UN MAILLON DANS LE DIALOGUE MOLÉCULAIRE ? 40
II. L'ACTIVITÉ ANTI-AUXINIQUE DE PISOLITHUS ET DE L'HYPAPHORINE : S'AGIT-IL D'UN MODÈLE TRANSPOSABLE À D'AUTRES ESPÈCES FONGIQUES ? 51
A. ACTIVITÉ ANTI-AUXINIQUE DE CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS, RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES 51
1) Matériels et méthodes 51
2) Résultat : activité comparée de plusieurs souches 53
B. LES ALCALOÏDES INDOLIQUES, BRUCINE, YOHIMBINE, ET L'HYPAPHORINE: DES COMPÉTITEURS SPÉCIFIQUES DE L'AIA QUI N'INHIBENT PAS LE TRANSPORT AUXINIQUE 55
III. ACTIVITÉ DE L'HYPAPHORINE FONGIQUE ET DE L'AUXINE SUR L'EXPRESSION DE GÈNES D'UNE PLANTE HÔTE, LE PEUPLIER 65

. SYNTHÈSE DES CONNAISSANCES ET DISCUSSION GÉNÉRALE : RÔLE ET MODE D'ACTION DE L'HYPAPHORINE 79

. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 90

. RÉFÉRENCES 92

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

AVANT-PROPOS

Presque aucun organisme ne vit « seul » ; la plupart des animaux, des plantes, et des micro-organismes possède un **cortège symbiotique** que l'on doit absolument prendre en compte pour comprendre sa physiologie et son succès écologique. Au cours de l'évolution, certains arbres se sont associés à certains champignons et ont formé un **organe chimérique**, appelé **ectomycorhize**. Cet organe symbiotique est un lieu d'échanges d'éléments qui va conditionner l'évolution de chacun des deux partenaires.

L'ensemble des partenaires possibles pour une espèce constitue son spectre d'hôte. Certaines espèces développent une spécificité d'hôte, c'est-à-dire elles s'associent exclusivement à un genre, ou à une espèce, voire une souche, d'autres espèces sont beaucoup moins sélectives et peuvent s'associer à plusieurs espèces de genres différents.

Dans tous les cas, si l'établissement de l'ectomycorhize est rendue possible, c'est sans doute, parce qu'il y a **reconnaissance** d'un partenaire potentiellement symbiotique, et à fortiori non pathogène ou saprophyte, puis **contrôle** et **coordination** entre les deux partenaires pour la formation de l'organe chimérique. Ces mécanismes requièrent l'établissement d'un **dialogue moléculaire** entre les acteurs de la symbiose qui aboutit à la régulation de l'expression du génome de ces derniers. Le contrôle s'exerce sur les processus de reconnaissance plante hôte/champignon, la pénétration et l'infection des tissus racinaires, la transformation morphologique de la racine et des tissus fongiques ainsi que sur la réorganisation du métabolisme des symbiotes.

L'identification et la compréhension des mécanismes induisant et accompagnant l'établissement de l'ectomycorhize ont constitué les objectifs majeurs des travaux exposés dans ce manuscrit, travaux qui seront présentés sous forme de 4 grands chapitres

Le chapitre « Introduction » subdivisé en 5 grandes parties, avec une première partie "description" des ectomycorhizes, des avantages retirés par les deux partenaires, et des processus de formation de l'organe chimérique; une seconde partie détaillera les connaissances actuelles sur les médiateurs impliqués dans les phénomènes de reconnaissance entre partenaires ectomycorhiziens et de coordination de l'ontogenèse ; une troisième partie évoquera les différents points de régulation de l'activité auxinique connues à ce jour. Une quatrième partie détaillera les modifications de l'expression du génome et du protéome qui ont été observées au cours de l'ontogenèse ectomycorhizienne. Enfin, une dernière partie introduira les objectifs de ce travail ainsi que les modèles utilisés.

Le chapitre « Résultats » regroupe sous la forme de trois publications l'ensemble des résultats obtenus qui concernent:

Identification de « molécules signal », de la racine vers le champignon : *l'acide jasmonique*

Identification de « molécules signal », du champignon vers la racine : *inhibiteurs compétitifs de l'activité auxinique: les alcaloïdes indoliques*

Mise en évidence de l'activité de l'hypaphorine fongique et de l'auxine sur l'expression des gènes d'une plante hôte, le peuplier.

Le chapitre « Synthèse des connaissances et Discussion générale : rôle et mode d'action de l'hypaphorine» présenté sous forme d'article de synthèse, décrit à partir des résultats obtenus sur l'hypaphorine depuis les 10 dernières années, les hypothèses que l'on peut émettre quant au rôle et au mode d'action de cette molécule.

Enfin un dernier **chapitre « Conclusion** et **Perspectives »** conclut sur les résultats obtenus et présente la suite à donner à ces travaux pour tenter d'élucider d'une part le rôle de l'hypaphorine et des différents signaux dans l'ontogenèse ectomycorhizienne et d'autre part les mécanismes de compétition entre l'hypaphorine et l'auxine.

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

INTRODUCTION

I. Les ectomycorhizes, généralités.

A. Des associations symbiotiques ubiquistes et indispensables ?

Les arbres des régions tempérées, boréales ou montagneuses ainsi que certains arbres des régions tropicales, ont su au cours de leur évolution établir des associations avec divers **partenaires fongiques**, Ascomycète ou Basidiomycète. Cette **association durable à bénéfices réciproques**, ou symbiose, se concrétise par la formation d'un organe chimérique, appelé ectomycorhize, qui s'établit sur les racines courtes de la plante (Fig 1 et 2). C'est par cet organe, que s'effectuent les **échanges** entre les deux partenaires.

1) Bénéfices apportés par le champignon

a) *L'accès accru à une alimentation minérale et hydrique*

Alors que les radicelles de l'arbre ont un diamètre compris entre 100 et 500 µm et n'explorent que très peu de volume du sol, les **hyphes** du partenaire fongique sont beaucoup **plus fines** (2 à 5 µm de diamètre) et forment un réseau mycélien beaucoup plus étendu (jusqu'à 500 mètres de mycélium par mètre de racine (Rousseau et al. 1994). Le volume exploré et la surface d'échange entre le sol et la plante, via le champignon, sont ainsi considérablement augmentés, augmentant du même coup l'accès aux ressources minérales et hydriques dont la plante a besoin. Ceci est d'autant plus important en période de sécheresse, où l'eau est retranchée dans de petits interstices du sol inaccessibles aux racines : le champignon, grâce à la taille de ces hyphes, va explorer le sol et accéder à cet élément, **exploitant** ainsi le sol bien **au-delà des capacités racinaires** (Garbaye et Guehl 1997, Garbaye 2000).

b) *La transformation d'éléments complexes en éléments assimilables par la plante*

Si le sol d'une forêt est considéré comme pauvre en phosphore et azote au regard des besoins d'une plante, il contient en fait de nombreux détritus végétaux

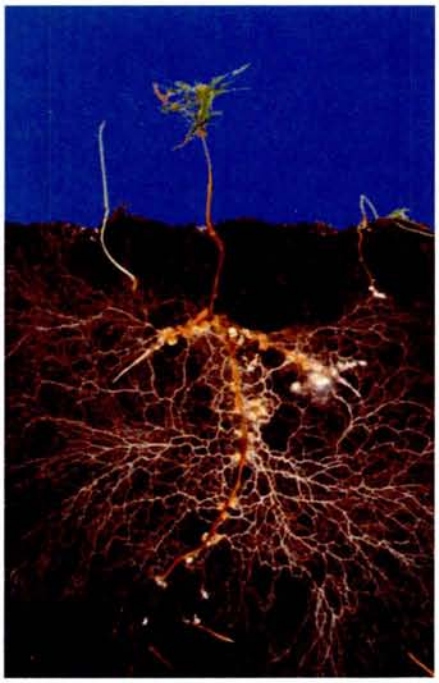


Fig 1 : Système racinaire mycorhizé de *Pinus sylvestris*. Les arbres s'associent à certains champignons et forment des ectomycorhizes. D'après Finlay dans Smith and Read, 1997.

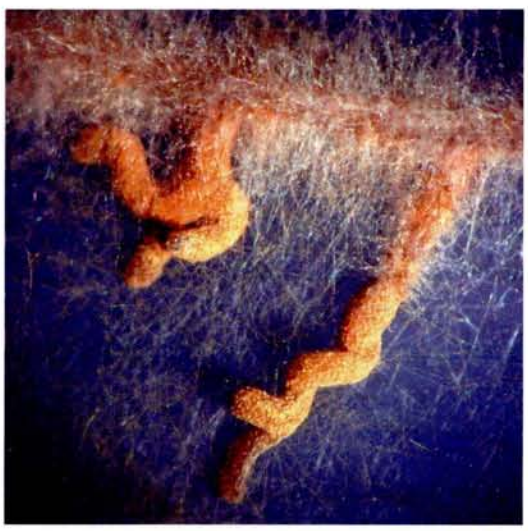


Fig 2 : Photo de mycorhizes entre *Eucalyptus globulus* et *Tomentella lateritia* (Lentang). Les hyphes sont bien plus fines que la racine. Photo A Jambois.

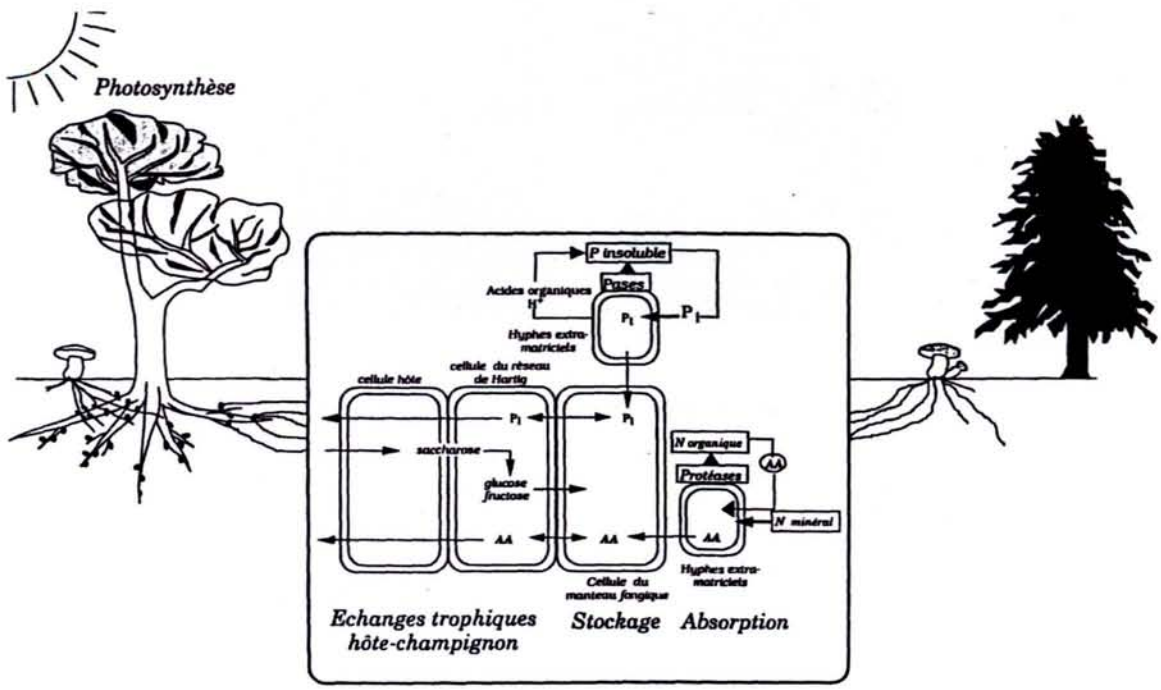


Fig 3 : Bénéfices réciproques trophiques entre l'arbre et le champignon ectomycorhizien

Le champignon exploite les formes minérales (Pi) et organiques du phosphate grâce à des phosphatases (Pases) et grâce à l'acidification du milieu par le mycélium (H+); il exploite également les formes minérales et organiques (AA : acides aminés) de l'azote grâce à des protéases et des transporteurs (Perméases). L'arbre fournit à son partenaire fongique une partie de ses assimilas. D'après Lourrillou, 1995.

Fig 4 : Cèpe de bordeaux (Bolétus sp.) (en haut), girolles (cantharellus cibarius) (en bas à gauche)et truffes (Tuber sp.) (en bas à droite). L'association avec une plante hôte semble nécessaire à la formation de ces carpophores. Photos A. Tachenon.

Fig 5 : Effets de la mycorhization contrôlée sur la croissance de plants forestiers en pépinière. Jeunes plants de *Quercus rubra* non mycorhizés (à gauche, sol stérilisé), et mycorhizés (à droite, innoculation avec *Paxillus involutus*). Photo D. Bouchard.

en voie de décomposition. Ces détritus renferment des formes complexes de **matières organiques** (protéine, lignine, acides nucléiques…) non utilisables directement par la plante, mais **piégeant une quantité importante d'azote et de phosphore**.

Grâce à l'excrétion de protéases, phosphatases, phosphodiesterases, acide oxalique ou organique, le champignon va pouvoir métaboliser ces formes complexes, solubiliser des éléments cristallisés, et rendre assimilables l'azote et le phosphore (Fig 3) dont la plante a besoin pour sa croissance (Martin et al. 1987, Abuzinadah et al. 1986, Nguyen et al. 1992, Blaudez et al. 1998, Plassard et al. 2000). Les champignons, en exploitant cette ressource, **améliorent** nettement **la nutrition** des plantes en phosphore et en azote (Landeweert et al. 2001).

c) Le stockage des excès des éléments minéraux et des métaux lourds

Les champignons ectomycorhiziens participent également à l'absorption d'éléments minéraux comme le cuivre, le fer, le zinc, le calcium ou le potassium (Le Tacon 1985, Marschner et Romheld 1994). Dans certains cas, les sols contiennent de trop fortes concentrations en calcium ou des quantités toxiques de **métaux lourds**, comme le cadmium, l'aluminium, le nickel. Le champignon est capable d'absorber et surtout **piéger** ces éléments néfastes pour la santé des plantes (Cumming et Weinstein 1990, Lapeyrie 1990). En filtrant ainsi certains éléments, le partenaire fongique va permettre à des plantules de coloniser des lieux pollués.

d) La protection phytosanitaire

En plus d'effets bénéfiques sur la nutrition, les champignons mycorhiziens assurent une **protection des racines** envers des agents pathogènes présents dans le sol. Sinclair et al. (1982) rapportent que *Laccaria laccata*, un champignon ectomycorhizien, est capable de protéger des semis de Douglas aussi efficacement qu'un traitement par un fongicide comme le Benomyl, tout en stimulant la croissance de son hôte. Le champignon mycorhizien procure en effet bien plus qu'une barrière physique. Il synthétise des **substances antibiotiques** (Marx 1973) et induit chez l'hôte une production de terpènes et autres composés phénoliques pouvant agir comme **inhibiteurs d'agents pathogènes** (Marx 1973). D'autre part, la présence "quasi-monopolistique" de champignons symbiotiques dans la rhizosphère ne va laisser aux agents pathogènes que très peu de substances carbonées exsudées.

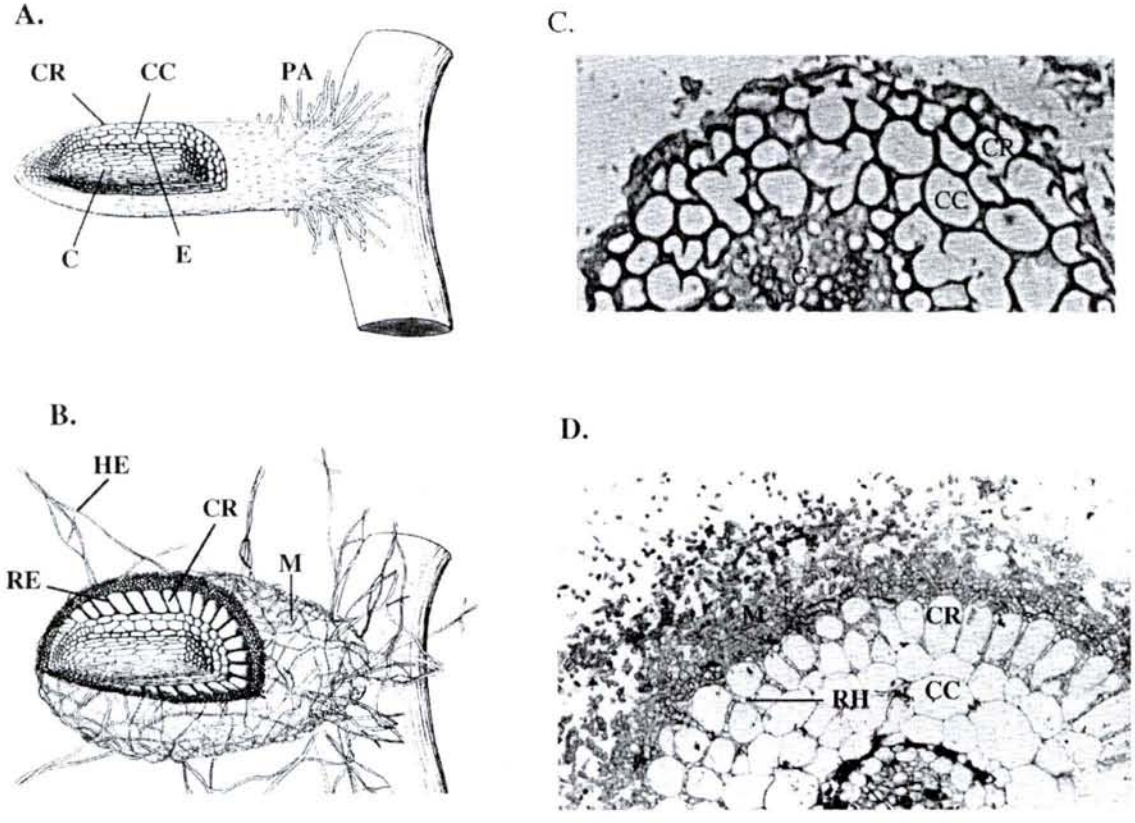


Fig 6 : Différences morphologiques entre une racines d'*Eucalyptus* non mycorhizée et une ectomycorhize d'*Eucalyptus-Pisolithus*. **A.** représentation schématique d'une racine non mycorhizée. **B.** Représentation schématique d'une ectomycorhize. **C.** Coupe transversale d'une racine d'Eucalyptus non mycorhizée. **D.** Coupe transversale d'une ectomycorhize d'*Eucalyptus/Pisolithus* observée en microscopie optique. (A et B d'après H. Lagrange, C et D d'après Carnero Diaz et al. 1996). (PA : poils absorbants, CR: cellule rhizodermiques, CC : cellule corticale, E : endoderme, C: cylindre central, RH : réseau de Hartig, HE : hyphe extramatricielle, M : manteau fongique).

2) *Bénéfices apportés par la plante*

Associé à son partenaire, un champignon ectomycorhizien bénéficie d'un **apport de sucres simples**, éléments utiles à son développement. La plante fournit en effet 20 à 40 % des produits de la photosynthèse à ses partenaires symbiotiques. Si le champignon peut parfois se propager seul dans le sol, en saprophyte, cet afflux de carbone et de métabolites non identifiés fournis par l'arbre semble indispensable à la phase de reproduction sexuée, se traduisant par la formation de carpophores. C'est ainsi que l'on ne trouve pas de Truffes (*Tuber sp.*), de Pieds de Moutons (*Hydnum repandum*), de Girolles (*Cantharellus cibarius*) ou de Cèpes (*Boletus sp.*) sans arbre (Fig 4) ; car le **cycle de vie complet** d'un champignon ectomycorhizien exige toujours la mise en place de la symbiose (Selosse et Le Tacon 1999).

3) *Bilan et conséquences*

Le manque à gagner que constitue le **flux de carbone** de l'arbre **vers le champignon**, qui pourrait être interprété comme du parasitisme, est largement contrebalancé par **l'amélioration de la gestion de l'eau et de l'absorption des nutriments. La mycorhize est l'organe de nutrition de la plante**. Des expériences de mycorhization contrôlée du sapin de Douglas par *Laccaria bicolor* (Basidiomycète) ont mené à deux observations intéressantes pour les forestiers et les pépiniéristes : 1) la mycorhization favorise la croissance du jeune arbre permettant de gagner un an sur le temps de développement des plants en pépinière ; 2) Huit ans après transplantation en forêt, les jeunes arbres développent 60% de bois en plus par rapport à des arbres témoins (Selosse et al. 2000). La formation de mycorhize semble être une **véritable parade pour la plante aux conditions difficiles**, et a certainement eu un rôle majeur dans les processus pionniers au cours de l'évolution. Aujourd'hui, de nombreux pépiniéristes vendent des arbres "pré"-mycorhizés avec des souches sélectionnées (Fig 5). De plus, l'adaptation d'arbres, sur des sols pollués par des métaux lourds, grâce à la formation de mycorhizes peut être envisagé comme une solution écologique et économique en vue de l'utilisation de ces sols.

Et bien sûr, n'oublions pas que sans arbre et ectomycorhize, il n'y aurait pas de truffes, cèpes, et girolles dont dépend la réussite de tout un secteur économique.

B. *L'ectomycorhize, anatomie d'un organe chimérique*

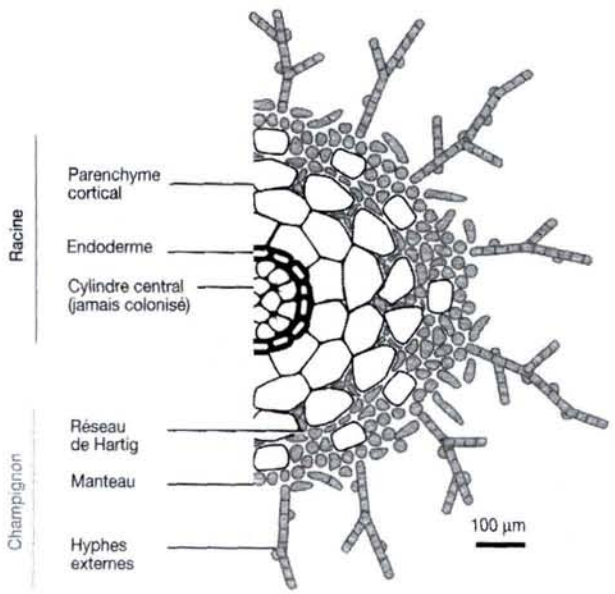


Fig 7 : L'ectomycorhize: un organe chimérique, dessin d'une coupe transversale d'une ectomycorhize. D'après H. Lagrange.

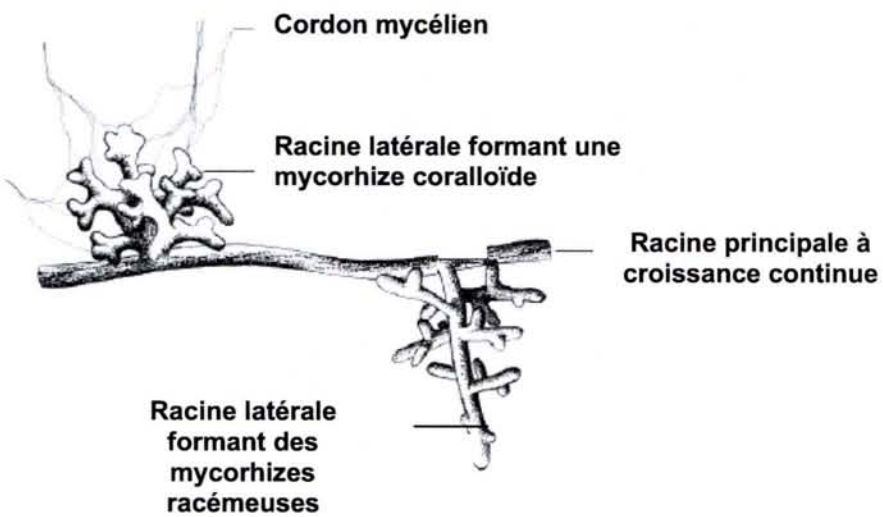


Fig 8 : Dessin de mycorhizes illustrant différents morphotypes rencontrés. D'après H. Lagrange.

L'anatomie du système racinaire est modifiée par la mise en place de la symbiose (Fig 6). L'observation d'ectomycorhizes à la loupe montre que ce sont des racines latérales modifiées, souvent anormalement ramifiées, courtes et épaissies, présentent un feutrage d'hyphes à la surface et/ou une coloration liée à la présence du champignon. Ces racines transformées sont dépourvues de poils absorbants. La présence d'hyphes sur l'organe n'est pas toujours visible, car elles peuvent être plaquées à la surface de la racine.

On distingue sur des coupes fines deux types de cellules : les plus grandes, sphériques, en assises plus ou moins concentriques, sont des cellules racinaires ; les autres, une dizaine de fois plus petites, sont les hyphes du champignon. Ces hyphes forment à l'extérieur de la racine un feutrage, qu'on appelle le **manteau**, et s'insinuent entre les cellules corticales de la racine, pénétrant une ou plusieurs assises cellulaires au niveau de la lamelle moyenne, sans jamais entrer dans les cellules. Ces hyphes constituent le **réseau de Hartig**, du nom d'un anatomiste autrichien du XIXe siècle. Enfin, le cylindre central, au-delà de l'endoderme, n'est jamais colonisé. Enfin, des hyphes partent hors de la mycorhize et explorent le sol : ils s'agglomèrent parfois en cordons visibles à l'œil nu.

L'intrication des articles fongiques au sein du tissu racinaire constitue l'**interface, lieu** privilégié **d'interactions et d'échanges** (Dexheimer et Pargney 1991). Les hyphes du manteau et du réseau de Hartig gardent un aspect juvénile tout au long de la vie de la mycorhize comme l'attestent de nombreuses études ultra-structurales (Dexheimer et Pargney 1991, Kottke et Oberwinkler 1986).

On distingue également un ciment protéo-polysaccharidique entre les parois végétales et fongiques contiguës. Bien plus qu'un simple contact entre les deux parois, ce ciment est la conséquence de remaniements importants de la composition protéique des parois des deux partenaires (Tagu et Martin 1996).

La mycorhize est donc un organe chimérique (Fig 6 et 7) dont la formation et le développement entraînent de profondes modifications des deux partenaires.

C. Ontogenèse d'une ectomycorhize : de la rencontre à la vie de couple

1) Un processus universel

Bien que dans la nature il existe de nombreuses associations possibles conduisant à des ectomycorhizes de formes (Fig 8), de tailles et de couleurs variées, tous les morphotypes ectomycorhiziens partagent la même structure anatomique de base, c'est-à-dire un réseau de Hartig et un manteau fongique.

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

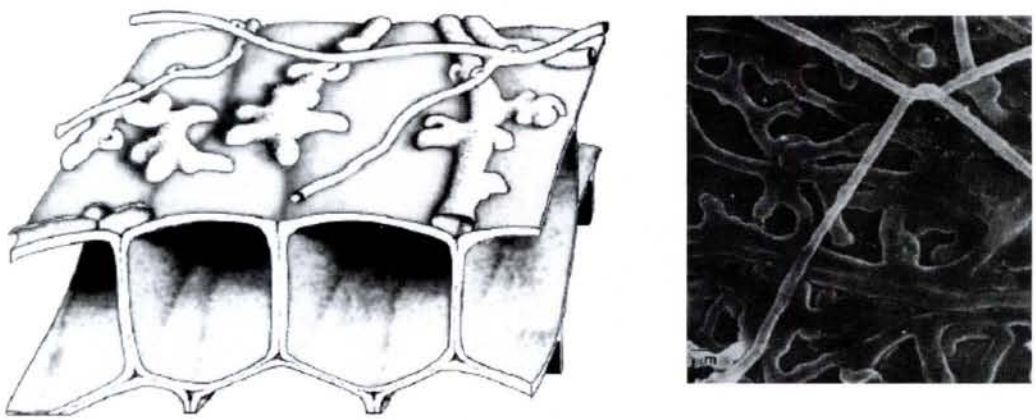


Fig 9 : Les hyphes de *Pisolithus tinctorius* se modifient au contact de la racine; elles développent des structures renflées, fréquemment ramifiées. Dessin de H. Lagrange, photo P. Jacobs

Cette similarité anatomique est d'autant plus marquante qu'elle concerne des symbiotes et des plantes hôtes appartenant à des groupes taxonomiques très divers. Les mécanismes aboutissant à la formation de cet organe chimérique doivent donc probablement répondre à un même **"patron" génétique** de base.

Il s'agit désormais de décortiquer les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'une ectomycorhize depuis la rencontre et la reconnaissance des deux organismes, jusqu'aux modifications morphologiques et physiologiques des deux partenaires aboutissant à un **organe chimérique fonctionnel**. Pour faciliter cette étude, de nombreux modèles in vitro ont été mis au point, tel que : *Betula pendula/Paxillus involutus, Pinus pinaster/Hebeloma cylindrosporum, Eucalyptus globulus/Pisolithus microcarpus* ou encore *Populus canescens/Pisolithus microcarpus.* C'est sur ces deux derniers modèles qu'ont été réalisées les études présentées dans ce manuscrit. Plusieurs phases comprenant des événements caractéristiques ont ainsi pu être décrites bien que ces phases ne sont pas toujours aussi distinctes au niveau du temps.

2) *Un développement séquentiel*

a) *De l'attraction aux premiers contacts physiques*

Comme toute association, la mise en place de l'ectomycorhize nécessite, préalablement, rencontre entre les deux partenaires.

Le sol contenant des champignons symbiotiques, pathogènes ou saprophytes, une racine en croissance doit **distinguer** parmi tous **les champignons** présents dans la rhizosphère, celui qui lui sera **bénéfique**.

Cette **reconnaissance spécifique et réciproque** des futurs partenaires s'établit grâce à la mise en place d'un dialogue moléculaire ; ce dialogue commence bien avant les premiers contacts physiques entre les partenaires. La nature, le mode de perception, et le mode d'action de **médiateurs chimiques** impliqués dans la formation d'ectomycorhizes, ayant été l'objet de cette étude, nous reviendrons plus précisément sur ce dialogue dans la partie II de cette introduction.

b) *Des premiers contacts physiques à la colonisation et l'infection*

Ayant progressé dans la rhizosphère de la plante hôte, le partenaire fongique établit un contact physique avec la surface de la racine et va initier des **points d'adhérence** sur la surface racinaire.

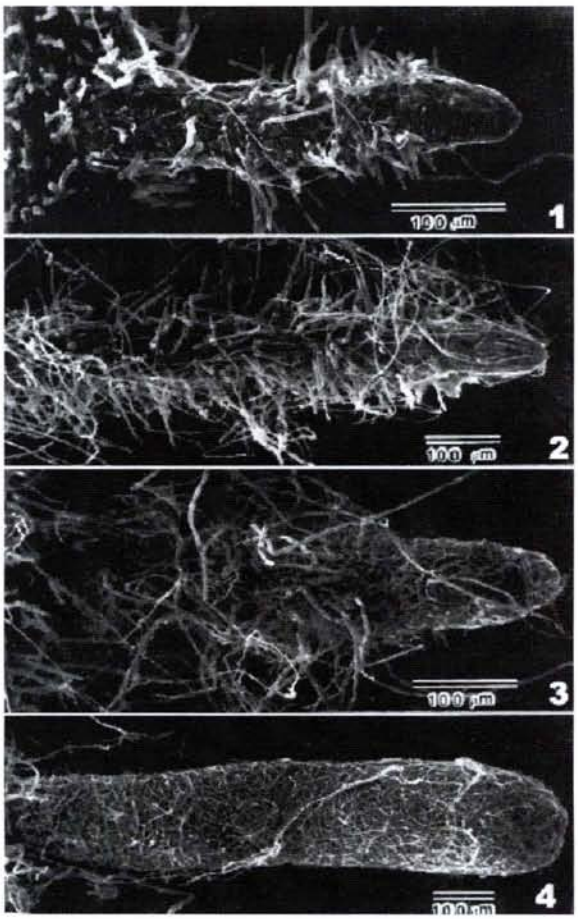


Fig 10 : Observation en microscopie électronique de différents stades de la formation de l'ectomycorhize de *Betula alleghanienis* / *Pisolithus tinctorius*. 1 et 2 : stades précoces de la formation ectomycorhizienne, on observe encore très nettement des poils absorbants, seules quelques hyphes sont présentes sur la surface racinaire. 3 : le réseau d'hyphes se densifie et forme un fin manteau. 4 : la densification se poursuit jusqu'à aboutir au manteau définitif. Photos de Massicote et al. 1990.

Le contact entre les hyphes et la surface racinaire provoque un bouleversement de la morphologie du champignon. Les apex des hyphes se gonflent puis deviennent plus larges, et forment des **palmettes** (Jacobs et al. 1989), augmentant ainsi la surface d'ancrage du mycélium sur la racine (Fig 9).

c) La différenciation des tissus symbiotiques

Une fois l'ancrage du champignon réalisé, les parois du champignon et de la racine vont présenter de profondes altérations structurales (Kottke 1997, Bonfante et al. 1998). Les hyphes vont commencer à se différencier et former trois tissus : le manteau, le réseau de Hartig et les hyphes extramatricielles (Fig 10 et 11).

(i) Formation du manteau et poils absorbants :

Dès le contact avec la racine, les hyphes s'organisent en un **manteau** constituant une gaine se densifiant autour de la racine (pseudoparenchyme). On n'observe plus, alors, de poils absorbants sur l'organe symbiotique, ils sont probablement dégénérés ou intégrés au sein du manteau (Brunner et Scheidegger 1992, Peterson et Farquhar 1996). On distingue d'une part **un manteau externe**, composé d'hyphes plus lâches entre elles, et d'autre part **un manteau interne**, fait d'hyphes extrêmement ramifiées et soudées les unes aux autres par une matrice extracellulaire (Fig 12) (Massicotte et al. 1987a, 1987b, Dexheimer et al. 1994). La fonction principale du manteau serait le **stockage** (lipides, glycogène, protéines) (Peterson et Farquhar 1994). De ce manteau partent ensuite des hyphes très différentes : **les hyphes extra-matricielles** qui explorent le milieu extérieur et **absorbent les éléments nutritifs**, et les hyphes du **réseau de Hartig** qui s'insinuent entre les cellules de la racine et qui vont être le **lieu d'échanges** avec la plante.

(ii) Formation du réseau de Hartig et modification de la cohésion des cellules racinaires :

Une double action mécanique et chimique va probablement s'opérer pour que les hyphes puissent s'insinuer entre les cellules racinaires. D'une part, le champignon va **dissocier la lamelle moyenne** qui solidarise les cellules végétales (Massicotte et al. 1986). D'autre part, outre la lamelle moyenne, les parois végétales vont être partiellement dissoutes et devenir plus molles et moins compactes, grâce à la synthèse par le champignon de cellulases et pectinases (Duddrige et Read 1984, Gay et Gea 1994, Crawford et Arst 1993). De son côté, la plante voit **l'activité chitinolytique de la racine** stimulée au cours de

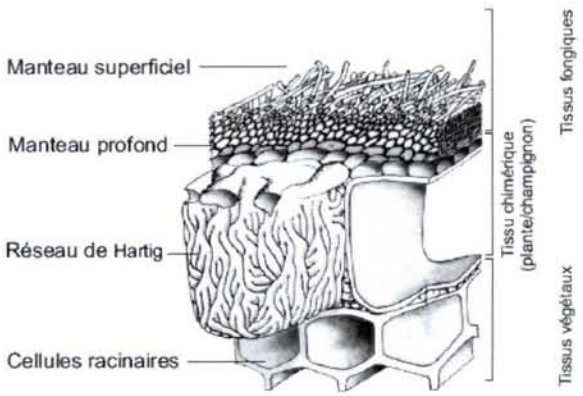


Fig 11 : Dessin représentant la structure du manteau et du réseau Hartig englobant les cellules racinaires. D'après H. Lagrange.

l'ontogenèse ectomycorhizienne (Albrecht et al. 1994), modifiant probablement la paroi fongique. Cette double modification, (celle de la paroi fongique et celle de la paroi végétale) va conduire à la **formation** d'une matrice qui va constituer **l'interface symbiotique** (Duddridge et Read 1984, Bonfante et al. 1998).

(iii) Développement des structures extra-racinaires : les faisceaux mycéliens

Les hyphes extra-matricielles, qui explorent le sol et y puisent l'eau et les éléments minéraux, vont, dans la plupart des cas, s'**organiser en faisceaux mycéliens** (Smith et Read 1987). Ces structures sont constituées de cordons mycéliens, agrégats ramifiés d'hyphes capables d'absorber les nutriments sur la quasi-totalité de leur surface. En gagnant la surface du sol, ces hyphes vont être capables d'initier la formation de primordia conduisant au développement des **carpophores** qui assureront la dissémination des spores sexuées.

(iv) Ralentissement de l'activité du méristème racinaire

Sous l'influence du champignon, de nombreuses **racines secondaires sont initiées**. Puis, quand le manteau recouvre entièrement la racine, suite à l'allongement radial des cellules corticales, la racine prend un aspect charnu et trapu, parfois ramifié. Ces modifications seraient dues à l'action **d'hormones excrétées** par le champignon et notamment l'**auxine** (Gay et Gea 1994). En revanche, sous l'effet de la colonisation fongique, les **méristèmes** de la **racine primaire** et des racines latérales **diminuent** leur activité ; le champignon "bloquerait" le fonctionnement de ces méristèmes (Clowes 1981).

d) De la symbiose fonctionnelle à la sénescence

La phase de fonctionnement ne s'accompagne plus de modifications structurales, mais est le siège de **remaniement dans le métabolisme** des cellules de la mycorhize.

Le réseau d'hyphes extra-matricielles développé, le manteau et le réseau de Hartig formés, l'organe symbiotique possède en effet, toutes les structures nécessaires et adaptées à son fonctionnement d'organe d'absorption, de stockage et de transfert. Certaines tâches vont, semble-t-il, se répartir entre la plante et le champignon pour limiter ainsi la répétition de certaines activités métaboliques. Les changements métaboliques vont surtout concerner les **flux de composés organiques et minéraux** (azote, phosphore, carbone) transitant par l'ectomycorhize, ainsi que la régulation des systèmes enzymatiques impliqués dans leur assimilation (Martin et Botton 1993, Hampp et al. 1995). Des études récentes menées par microautoradiographie ont montré que les échanges entre les

deux partenaires suivaient une loi d'échange équitable (« fair trade »). La mise à l'obscurité du peuplier hybride *Populus tremula x Populus alba* provoque une diminution de la quantité de carbone apportée au champignon ectomycorhizien *Laccaria*, induisant en retour une baisse proportionnelle de la quantité de phosphate absorbée par la plante (Bucking et al. 2001).

Cette phase de fonctionnement va s'achever par la mort de la mycorhize. L'état de sénescence se caractérise quant à lui, par des modifications morphologiques : détérioration du manteau et pénétration fongique au sein des cellules racinaires. Le champignon prend un comportement de pathogène ou de saprophyte, qui arrêterait le transfert bidirectionnel des nutriments. Selon Cairney et Alexander (1992), très peu de photosynthétats s'accumuleraient dans la mycorhize âgée. Les parois des cellules végétales développent des papilles, correspondant à des épaississements localisés de la paroi et rappelant certaines réactions de défense (Nylund et al. 1982).

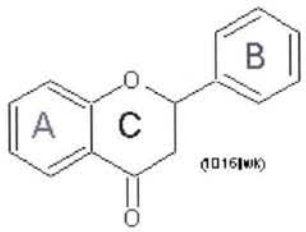
II. Reconnaissance entre partenaires et coordination de l'ontogenèse : le rôle des médiateurs chimiques

L'établissement d'une ectomycorhize fonctionnelle nécessite une **reconnaissance** d'un partenaire potentiellement symbiotique, un **contrôle** du symbiote mais également une **coordination** avec ce dernier pour former l'organe chimérique. Ces phénomènes se font vraisemblablement, via l'établissement d'un **dialogue moléculaire** entre les acteurs de la symbiose. À l'inverse d'autres interactions plantes micro-organismes, la nature, le mode de perception et le mode d'action des **médiateurs chimiques** impliqués dans la formation ectomycorhizienne, ne sont connus que de manière très fragmentaire.

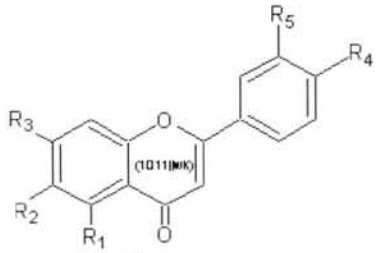
A. Les signaux rhizosphériques

À l'instar de toutes associations, l'ontogenèse ectomycorhizienne a un pré-requis : la **rencontre entre deux individus**. Pour augmenter les "chances" de rencontre, la croissance des hyphes doit pour cela, être préférentiellement orientée vers la plante hôte. Des **signaux rhizosphériques** vont s'**échanger** et d'une part, favoriser la rencontre physique, et d'autre part, préparer les deux partenaires à l'association.

A

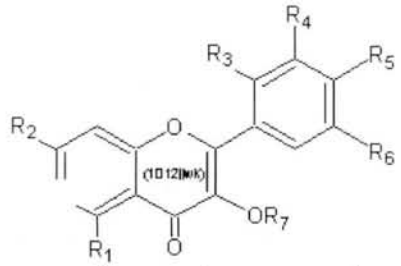


B



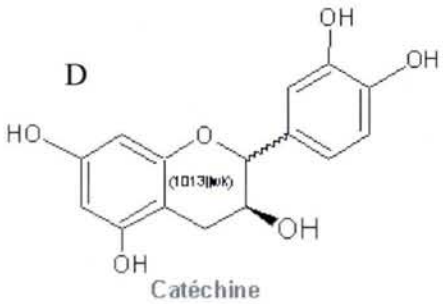
Flavonones

C



flavonols (ex : rutine, quercetine…)

D



Catéchine

E

aiguilles de Pin rouge (*Pinus résinoa*)

Fig 12 : Les flavonoïdes sont des composés phénoliques. (A) formule générique des flavonoïdes. (B) Groupe des flavonones (C) Groupe des flavonols auquel appartient la rutine. (D) La catechine (E) Aiguilles de Pin rouge dont est extrait la catéchine.

1) *La litière : une première sélection de champignons compatibles*

a) *L'activité de la litière sur le champignon*

Les litières des écosystèmes forestiers sont composées de **débris végétaux** se décomposant plus ou moins rapidement sous l'action de la microflore, qui, elle-même, est conditionnée par l'acidité, la température ou l'humidité du sol. La composition d'une litière dépend donc à la fois de la nature de la roche mère sous-jacente (influençant l'acidité du sol), du climat (conditionnant la température et l'humidité), mais aussi de la composition de la flore et de la faune colonisant le milieu. Si ces débris végétaux fournissent essentiellement de la lignine et de la cellulose, ils contiennent également une multitude de **métabolites secondaires** plus ou moins polymérisés, caractéristiques des espèces formant le couvert végétal. Ces composés seraient susceptibles de modifier le développement et le métabolisme des champignons ectomycorhiziens (Baar et al. 1994, Olsen et al. 1971, Pellissier 1993) voir d'affecter le morphotype des mycorhizes (Rose et. 1983).

b) *Les molécules impliquées*

Les métabolites impliqués identifiés sont des flavonoïdes ou des terpènes (Koïde et al. 1998). Au sens strict, les **terpènes** sont des hydrocarbures mais de nombreux dérivés (alcools, aldéhydes, cétones, acides), de structure apparentée, sont parfois considérés comme des composés terpéniques. Quant aux **flavonoïdes** (Fig 12), ce sont des composés phénoliques, qui possèdent en plus du noyau aromatique, des chaînes latérales courtes. Les flavonoïdes comprennent plusieurs groupes de substances comme les flavonols, les flavanones, les anthocyanidols. Il a déjà été montré que les flavonoïdes jouent un rôle majeur dans les interactions plantes-champignons pathogènes (Dixon et al. 1994) ou plantes-Agrobatérium (Stachel et al. 1985), mais également dans l'établissement de symbioses comme la symbiose entre légumineuses et bactéries Rhizobium (Peters et al. 1986, Phillips et Kapulnik 1995). Les flavonoïdes stimulent également la croissance des hyphes de champignons endomycorhiziens (Nair et al. 1991, Bécard et al. 1992, Poulin et al. 1993).

Les effets des terpènes et flavonoïdes sur le développement des champignons ectomycorhiziens et la germination des spores pourraient contribuer à **la spécificité d'hôtes**. Un exemple illustre ce propos: les aiguilles de *Pinus resinoa,* de même que différents composés phénoliques extraits de ces aiguilles (Fig 12-D) (catéchine, catéchine gallate et epicatéchine gallate), **stimulent la croissance** de *Suillus intermedius*, un champignon ectomycorhizien fréquemment

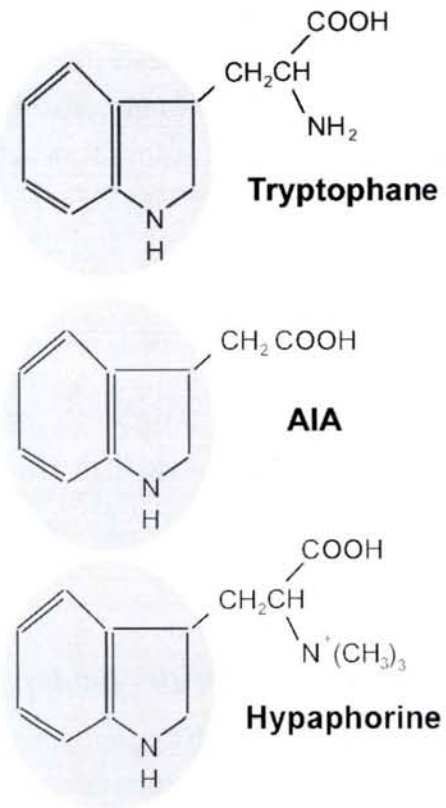


Fig 13 : Formules développées du tryptophane, de l'AIA (auxine naturelle) et de l'hypaphorine. Ces trois molécules possèdent un noyau indol.

associé à cet arbre, alors que ces mêmes aiguilles et composés inhibent la croissance d'autres champignons ectomycorhiziens peu spécifiques comme *Amanita rubescens* (Koïde et al. 1998). Ces molécules pourraient agir ainsi en structurant la population des champignons présents dans la rhizosphère (Koïde et al. 1998).

Ceci pourrait également expliquer les phénomènes de succession d'espèces fongiques au sein d'un même peuplement en fonction de son âge. La concentration et la composition en diverses substances (nutriments, phénols) d'une litière évoluant dans le temps, celle-ci participerait à la modification des cortèges fongiques (Siqueira et al. 1991).

2) *Les exsudats racinaires et leurs effets sur les hyphes*

a) L'activité des exsudats racinaires

Les **exsudats racinaires** regroupent l'ensemble des composés chimiques libérés par les racines des plantes. La composition des exsudats racinaires varie d'une espèce à une autre, mais également en fonction de l'état physiologique de la plante et des conditions environnementales.

Les racines des plantes mycorhiziennes produisent et excrètent des substances racinaires, qui **stimulent la croissance** de champignons symbiotiques ainsi que la germination des spores (Melin et Rama Das 1954, Fries et al. 1987, Fries 1988). D'autres auteurs ont également rapporté des phénomènes de chimiotactisme et d'orientation de la croissance des hyphes (Piché et al. 1983, Horan et Chilvers 1990) induits pas des composés diffusibles ou volatils émis par les racines hôtes (Koske et Gemma 1992). Le rapprochement puis le contact entre les deux partenaires seraient ainsi favorisés par ces **substances stimulatrices et attractantes**.

Les exsudats racinaires de la plante hôte *Eucalyptus globulus* induisent, chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* (renommé récemment *Pisolithus microcarpus* (Martin et al. 2002)), une stimulation de croissance et une **modification du mode de ramification des hyphes** (Lagrange et al. 2001, 2004), ainsi qu'une **accumulation d'hypaphorine**, un alcaloïde indolique, indicateur probable du **caractère juvénile** des hyphes (Fig 13 et 14) (Béguiristain et al.1995, Béguiristain et Lapeyrie 1997, Lagrange et al. 2004). Ceci suggère que les exsudats racinaires participe au maintien des hyphes dans cet état juvénile, état qui favoriserait la colonisation. L'aspect juvénile des hyphes du manteau et du réseau de Hartig a été observé en microscopie électronique (Dexheimer et Pargney 1991, Kottke et Oberwinkler 1996).

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

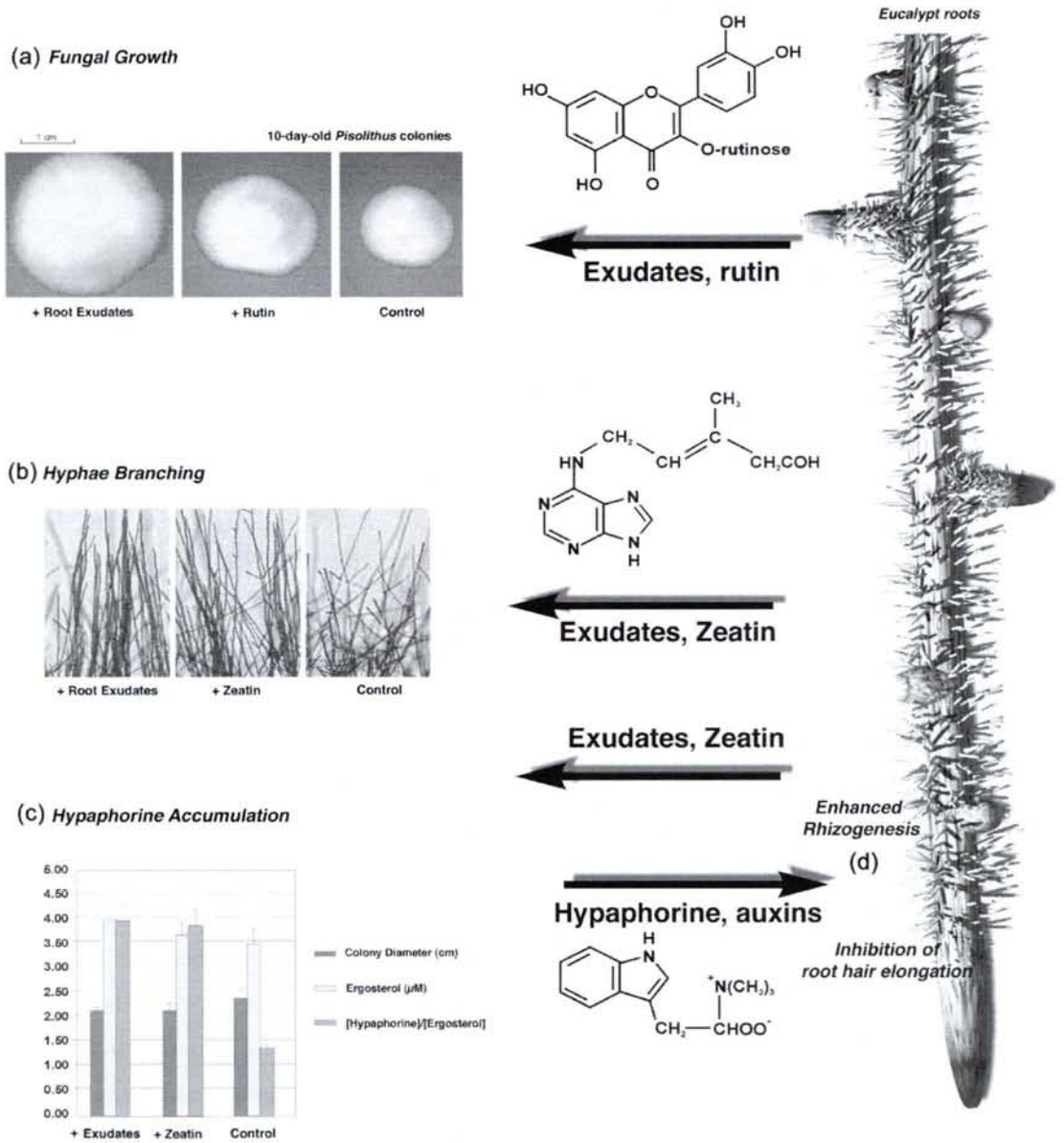


Fig 14 : Dialogue moléculaire entre *Eucalyptus globulus* et *Pisolithus microcarpus* dans la rhizosphère. Les exsudats racinaires agissent sur la morphologie du mycélium de *Pisolithus*. (a) La rutine (un flavonol) stimule la croissance du champignon (diamètre des colonies augmente). (b) La zéatine (une cytokinine) modifie l'angle de ramification des hyphes de Pisolithus, et (c) induit une accumulation d'hypaphorine, un alcaloïde indolique. (d) En retour, l'hypaphorine et l'auxine fongique induiraient des modifications chez la plante hôte (comme par exemple : arrêt de croissance des poils absorbants, stimulation de la formation de racines courtes). Schéma de Martin et al. 2000.

b) Les molécules impliquées

Divers composés extraits des exsudats racinaires ont déjà pu êtres identifiés chez différents couples symbiotiques :

(i) Les terpènes

Deux **terpènes** ont déjà montré leur activité sur les hyphes de champignons ectomycorhiziens :

L'acide abiétique active la **germination** des spores chez les champignons ectomycorhiziens du genre Suillus (Fries et al. 1987) tandis que le palmitate stimule la **croissance** de certains champignons ectomycorhiziens (Sun et Fries 1992).

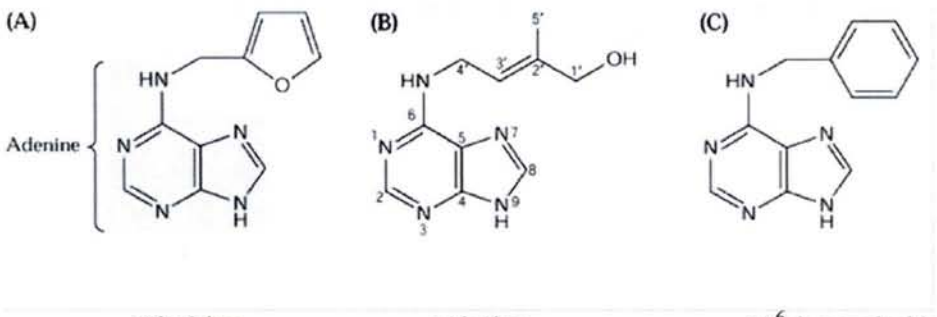
(ii) Le tryptophane

De nombreux champignons ectomycorhiziens absorbent le **L-tryptophane** (Fig 13) présent dans les exsudats racinaires de la plante hôte *Eucalyptus globulus* (Arshad et Frankenberg 1998), et en retour **secrètent de l'acide indole-acétique** (AIA) (Fig 13) dans le milieu de culture (Strzelczyk et Pokojska-Burdziej 1984, Strzelczyk et al. 1992, Arshad et Frankenberg 1998), une phytohormone possédant un rôle dans la division et l'élongation cellulaires chez les plantes. La croissance et la ramification du mycélium végétatif de champignons ectomycorhiziens peuvent également êtres modifiées par l'apport d'auxine (AIA) (Koske et Gemmma 1992). Nous reviendrons plus tard sur les effets de l'auxine dans la formation ectomycorhizienne.

(iii) Les flavonoïdes

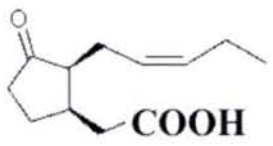
Pisolithus microcarpus voit sa croissance stimulée par la **rutine** (Fig 14) (Lagrange et al. 2001). La rutine isolée à partir d'exsudats de la plante hôte *Eucalyptus globulus ssp bicostata*, agit à des concentrations de l'ordre du picomolaire, et est le premier flavonoïde identifié comme un signal perçu par le champignon symbiotique *Pisolithus microcarpus*. Un gradient de rutine contribuerait à **l'orientation de croissance des hyphes** en direction des extrémités racinaires, favorisant ainsi l'infection mycorhizienne (Lagrange et al. 2001).

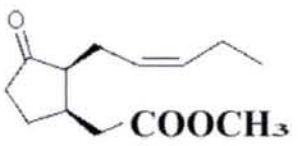
(iv) Les cytokinines



Kinétine Zéatine N^6-benzyladénine

Fig 15 : Les cytokinines ont un groupement adenine. A. La Kinétine. B. La Zéatine. C. Le Benzyladénine. Formules développées.





A. L'acide jasmonique B. Le methyl jasmonate

Fig 16 : L'acide jasmonique et le méthyljasmonate. Formules développées.

Les **cytokinines** (Fig 15) (kinétine, zéatine, zéatine-riboside, adénine…) sont une famille de phytohormones qui stimulent la croissance et la division cellulaires chez les plantes.

Il a été rapporté que des cytokinines **régulaient la croissance** de plusieurs champignons ectomycorhiziens (Pokojska et al. 1993, Sun et Fries 1992). Mais ce n'est que récemment qu'il a été démontré que les exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* contenaient de la zeatine qui mimait partiellement l'activité des exsudats sur les hyphes de *Pisolithus microcarpus*. En effet, la **zéatine contrôle l'angle de ramification des hyphes et contribue à induire une sur-accumulation d'hypaphorine** tout comme les exsudats racinaires de la plante hôte, mais dans des proportions moindres ; ce qui suggère que les exsudats racinaires sont composés d'un cocktail de **molécules capables d'induire cette accumulation** (Lagrange et al. 2004). Les autres molécules impliquées **restent à identifier.**

(v) L'acide jasmonique

L'acide jasmonique (AJ) et ses dérivés, comme le méthyl jasmonate (MeJA) (Fig 16), sont des molécules connues pour réguler divers mécanismes de développement, participer à la sénescence des feuilles et intervenir dans des mécanismes de défenses chez les plantes (Cheong et Do Choy 2003). Leur concentration augmente en fonction des stimulus externes comme une blessure, un stress, une attaque parasitaire.

Le rôle de **l'acide jasmonique** dans l'ontogenèse ectomycorhizienne a été évoqué sans que celui-ci ait été clairement défini ; un apport d'acide jasmonique **favorisant des contacts plus précoces entre les hyphes de** *Pisolithus tinctorius* ou *Laccaria laccata* et les racines de *Picea abies* (Regvar et Gogala 1996, Regvar et al. 1997).

Si des composés de la litière ou des exsudats racinaires permettent au champignon de percevoir la racine et de se préparer à l'infection, en retour, la plante devrait être capable de répondre aux signaux fongiques et de se préparer ainsi à l'invasion fongique.

B. *Les molécules émises par le champignon contribuant à réguler l'interaction : L'adhésion des hyphes, la modulation de la balance hormonale*

1) *L'adhésion des hyphes : le rôle des lectines*

Une fois que le premier contact physique a eu lieu, les hyphes vont se fixer à la racine, avant de s'insinuer entre les cellules. Lors du contact entre les cellules racinaires et un mycélium agressif, **des micro fibrilles riches en protéines et en polysaccharides** sont émises par le champignon vers la surface racinaire (Lei et al. 1990a, 1990b). La sécrétion de ces glycoprotéines contribuerait à la colonisation de la surface racinaire. Bien qu'une couche de matériel fibrillaire extracellulaire soit déjà présente dans la matrice extracellulaire du mycélium végétatif de *Laccaria bicolor* (Lei et al. 1991) et de *Pisolithus tinctorius* (Lei et al. 1990a, 1990b), il apparaît au site de contact entre les hyphes et la surface racinaire une augmentation de la sécrétion de ces fibrilles.

La présence de matériel protéique reliant les hyphes au rhizoderme racinaire rappelle le rôle des lectines dans les mécanismes de reconnaissance et de colonisation. Les **lectines** sont des protéines ou des glycoprotéines qui ont la propriété essentielle de reconnaître des résidus osidiques de manière plus ou moins réversible et de se lier à eux. 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 expliquerait l'affinité entre certains hôtes et leur symbiote (Chaboud et Lalonde 1983, Petit et al. 1983). De nombreuses études ont montré que les lectines jouaient un rôle dans les phénomènes de reconnaissance spécifique plante hôte/champignon symbiotique (Mendgen et al. 1988), dans l'adhérence du champignon à la surface racinaire (Piché et al. 1988, Lei et al. 1990, Lei et al. 1991, Tagu et Martin 1996).

Giollant (1993) et Guillot et al. (1994) ont montré que les lectines de trois lactaires : *Lactarius deliciosus*, *L. deterrimus*, et *L. salmonicolor*, respectivement et strictement inféodés aux pins (Pinus), aux épicéas (Picea) et aux sapins (Abies) possèdent une **complémentarité avec des oligosaccharides** situés sur la paroi des cellules racinaires de la plante hôte correspondante. Ceci indique que les racines de ces trois espèces forestières possèdent des sucres simples spécifiques de ces trois lectines fongiques. Ces lectines se fixent préférentiellement sur les tissus jeunes comme les poils absorbants.

Des polysaccharides accessibles aux lectines ont été caractérisés à la surface de champignons ectomycorhiziens (Lapeyrie et Mendgen 1993), mais leur rôle dans les mécanismes de reconnaissance entre les deux symbiotes n'a pas été clairement mis en évidence.

2) *Phytohormones et ectomycorhizes*

Gogola a suggéré en 1991, que l'infection mycorhizienne pouvait être régulée grâce à la **production, par les deux partenaires, de phytohormones** dont les auxines, les cytokinines, l'acide abscissique ou l'éthylène. Les phytohormones sont des molécules essentielles à la coordination de la croissance et du développement des plantes. Leur présence dans d'autres organismes, comme les champignons ectomycorhiziens, a été souvent constatée (Gogola 1991, Beyrle 1995, Arshad et Frankenberg 1998), seul l'acide abscissique n'a jamais été détectée chez un mycobiote, mais leur activité physiologique sur le champignon reste mal connue.

Le rôle de ces hormones fongiques peut être envisagé sous deux aspects : 1) **dans la formation de l'organe mycorhizien** 2) **dans la croissance de la plante, en réponse à la mycorhization** ; la différence de taille entre plants mycorhizés et plants non- mycorhizés pouvant être attribuée, au moins partiellement, aux modifications de la balance hormonale (Arshad et Frankenberger 1998).

a) Gibbérellines, cytokinines et ectomycorhizes

Bien que la synthèse de gibbérellines et de cytokinines ait été souvent observée chez des champignons ectomycorhiziens, peu de travaux ont été consacrés à l'implication de ces deux hormones dans l'ontogenèse ectomycorhizienne ; leurs effets ayant été essentiellement étudiés chez les endomycorhizes. Des cytokinines ont été également détectées dans des champignons pathogènes (Surico et al. 1975, 1985). La présence de cytokinines n'est donc pas un caractère exclusivement symbiotique. Ces hormones fongiques pourraient jouer un rôle tout comme l'auxine dans le développement tissulaire végétal aboutissant à la formation des mycorhizes.

À l'opposé des cytokinines et gibbérellines, de nombreuses données ont été obtenues sur les auxines chez les ectomycorhizes (Arshad et Frankenberg 1998, Barker et Tagu 2000). Or, l'activité auxinique dépend fortement de la concentration en auxine, mais également de la présence ou l'absence d'hormones appartenant à d'autres familles (cytokinines, gibbérellines). La **balance cytokinines/auxines** et la présence d'autres hormones comme l'éthylène joue un rôle primordial dans la **régulation du développement** cellulaire chez les plantes, et c'est donc parce que ces informations sur les hormones antagonistes ou agonistes manquent que de nombreuses interprétations restent sujettes à discussion.

b) *Ethylène et ectomycorhizes*

L'éthylène est une hormone connue pour être synthétisée par la plante dans certaines situations physiologiques critiques liées à une étape du développement (maturation des fruits, sénescence, germination) ou imposée par l'environnement (traumatisme, sécheresse, froid, anoxie, attaque parasitaire, rencontre d'un toxique). La production d'éthylène est souvent stimulée par les auxines; à tel point que certains effets des auxines peuvent parfois être attribués à l'éthylène.

Graham et Liderman (1980) ont montré que sur les 23 champignons ectomycorhiziens testés, tous possédaient la capacité de synthétiser de l'éthylène en présence de méthionine. L'**apparition d'éthylène** dans un système de culture *in vitro* de plantules de Douglas innoculées avec *Cenococcum geophylum*, *Hebeloma crustuliniforme* ou *Laccaria laccata,* coïncide avec la **formation des mycorhizes** (Graham et Liderman 1980). 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. Au contraire, le traitement des racines de plusieurs familles de pins avec de l'éthylène induit la formation de structures habituellement caractéristiques des racines mycorhizées (Rupp et Mudge 1985). L'idée selon laquelle l'éthylène serait impliquée dans la formation des ectomycorhizes, est soutenue par le fait, que l'apport d'un inhibiteur de l'activité de l'éthylène (le thiosulfate d'argent) dans le milieu de culture, inhibe fortement la formation de mycorhize par *Laccaria Laccata* (Rupp et al. 1989). Ces auteurs suggèrent que l'éthylène endogène favorise les changements morphologiques observés au niveau de la racine. D'autre part, l'apport d'un inhibiteur du transport auxinique entraînant une accumulation localisée d'auxine, stimule la synthèse d'éthylène (Kaska et al. 1999) et aboutit à la formation de structures rappelant celles des ectomycorhizes. La régulation du **couple éthylène/auxine** pourrait donc être un des facteurs du développement structural d'une mycorhize.

c) *Les auxines, des hormones clef dans la formation ectomycorhizienne ?*

Les **auxines** constituent une famille de phytohormones impliquées dans l'élongation, la prolifération et la différentiation cellulaires. La perturbation du transport auxinique provoque des anomalies du développement et intervient également dans les phénomènes de tropismes. Synthétisées dans les jeunes tissus aériens, les auxines sont responsables des phénomènes de dominance apicale et de différenciation des racines.

De nombreuses études indiquent que le changement dans la balance auxinique serait **un pré-requis à l'ontogenèse** ectomycorhizienne (Rupp et al. 1989, Gay et al. 1994, Karabaghli- Degron et al. 1998, Kaska et al. 1999).

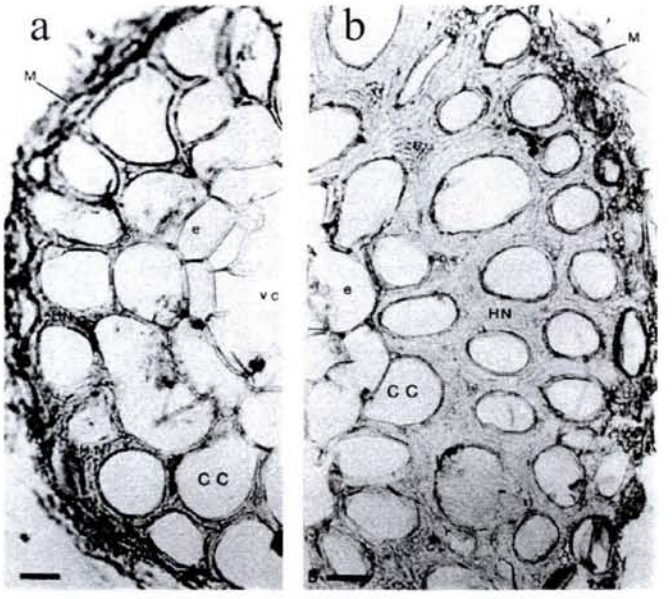


Fig 17 : Coupe transversale d'ectomycorhize de *Pinus pinaster* associée à *Hebeloma cylindrosporum*. (a) association avec la souche sauvage du champignon, le réseau de Hartig (HN) est constitué d'une seule couche de cellules. (b) association avec la souche surproductrice d'AIA d'*Hebeloma cylindrosporum*. CC : cellules corticales, M : manteau. Photo : Géa et al. 1994.

(i) Un plus grand nombre de sites à coloniser

Sous l'effet de la colonisation fongique, le méristème de la **racine primaire** diminue son activité de façon considérable ; le champignon "bloquerait" le **fonctionnement du méristème** (Clowes 1981). Cependant la présence du champignon sur la racine provoque en même temps la formation de nouveaux méristèmes sur la partie non mycorhizée de la racine, le champignon ectomycorhizien augmentant ainsi la **prolifération de racines latérales courtes** (Carnero Diaz et al. 1996) réceptives à l'infection. Ces observations peuvent faire penser à un effet des auxines qui, à forte concentration, inhiberaient la croissance des racines et qui, à faible concentration, stimuleraient la rhizogenèse.

Chez les conifères, l'application externe d'exsudats fongiques, d'extraits, ou d'auxines de synthèse mime partiellement l'effet du mycélium en induisant une prolifération racinaire qui se traduit principalement par un développement de racines latérales dichotomiques morphologiquement similaires à des ectomycorhizes (Slankis 1971, 1973, Smith et Read 1997). Wong et Fortin (1990) ont suggéré que l'AIA fongique stimulerait la ramification latérale et fournirait ainsi au champignon un nombre plus élevé de sites à coloniser. D'ailleurs Rudawska et Kiesliszewska-Rokicka (1997) ont 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 micro-organisme. Niemi et al. (2002) montrent cependant que la concentration en AIA fongique n'est pas toujours corrélée avec la formation de racine : la stimulation de la prolifération racinaire est plus importante avec *Paxillus involutus* qu'avec *Pisolithus tinctorius* alors que ce dernier produit plus d'AIA. D'autre composés fongiques auraient donc un rôle dans la formation racinaire (Niemi et al. 2002).

(ii) Un réseau de Hartig hypertrophié

Pinus pinaster inoculé avec un mutant d'*Hebeloma cylindrosporum* **surproducteur d'AIA** génère un plus grand nombre de racines mycorhizées qu'avec la souche sauvage (Gay et al. 1994). Ces mycorhizes présentent, de plus, un **réseau de Hartig plurisérié** (Fig 17) (Gea et al. 1994, Laurans et al. 2001, Tranvan et al. 2000). Dans le couple *Picea abies/ Laccaria bicolor* S238N, l'apport d'un inhibiteur du transport de l'AIA, le TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid), peut empêcher la formation du manteau et du réseau de Hartig, (Karabaghli-Degron et al. 1998, Rincon et al. 2003). De plus, le TIBA inhibe totalement l'effet stimulateur de *Laccaria bicolor* sur la formation des racines latérales (Ricon et al. 2003).

L'existence d'un réseau de Hartig plurisérié avec un partenaire fongique surproducteur d'AIA, de même que l'absence du réseau de Hartig en présence de TIBA, laissent à penser que l'AIA fongique pourrait être impliqué dans la **déstabilisation des parois** de l'hôte pour permettre la formation du réseau de Hartig.

(iii) Un changement de forme des cellules du rhizoderme et du cortex

Alors que les cellules du rhizoderme et du cortex s'allongent longitudinalement dans des racines non infectées, elles entament une **élongation radiale** dans les mycorhizes. Ce changement d'orientation de croissance est probablement corrélé à une **modification du cytosquelette** impliquant les **microtubules** (Carnero-Diaz et al. 1996, Niini et al. 1996), **et l'actine** (Niini et al. 1996, Tarkka et al. 2000). L'élongation radiale conduit à l'augmentation du diamètre des racines infectées. Il a été montré par ailleurs que l'auxine agissait sur les faisceaux de filaments d'actine dans les cellules épidermiques du riz et du coléoptile de maïs (Wang et Nick 1998, Waller et al. 2002) ; l'auxine modifierait ainsi le flux et l'exocytose de vésicules de Golgi nécessaires à la croissance cellulaire.

Des mesures cytométriques indiquent que la présence du mutant d'*Hebeloma cylindrosporum* surproducteur d'auxine, amplifie davantage les changements de forme des cellules corticales, en induisant une diminution de la longueur axiale ainsi qu'une augmentation de la longueur radiale des cellules du cortex de la plante hôte *Pinus pinaster* (Laurans et al. 2001). Cette **modification de la croissance** des cellules du cortex pourrait être une conséquence directe de l'activité auxinique ou indirecte via la stimulation de la synthèse de l'éthylène.

(iv) AIA et ectomycorhization, une activité régulée

Tous ces résultats laissent à penser que certaines étapes morphogénétiques, contrôlant le développement de l'ectomycorhize, seraient régulées par l'AIA fongique (aussi bien lors de la colonisation de la surface racinaire que dans la mise en place du réseau de Hartig). L'auxine, étant impliquée dans le **relâchement pariétal et l'élongation cellulaire** (Cleland 1995), elle agirait dans la mycorhize, en augmentant la **plasticité des parois végétales**, ce qui faciliterait ainsi la pénétration du champignon dans les tissus végétaux.

Cependant cette théorie hormonale a été contestée par de nombreux auteurs (Nylund 1988, Horan 1991, Wallander et al. 1992, 1994). L'action des auxines n'explique pas à elle seule la structure des mycorhizes, et induit même, dans certains cas, l'apparition de caractères qui ne sont pas retrouvés dans les mycorhizes, comme la stimulation de l'initiation des poils absorbants ou la

multiplication des assises cellulaires (Harley et Smith 1983, Nylund 1988, Wallander et al. 1992, 1994). À l'opposé les auxines sont même **incapables de générer seules** certains caractères typiques des ectomycorhizes comme l'élongation radiale des cellules du rhizoderme.

Le rôle exact de l'AIA fongique dans les différents tissus de la racine au cours de l'établissement de la symbiose reste donc toujours à préciser. Son **activité** est vraisemblablement **régulée par le partenaire fongique et par le partenaire végétal**, à la fois, **dans le temps**, au cours des différentes étapes de colonisation, **et dans l'espace**, au sein des différents tissus de la plante.

Le rôle d'autres molécules produites par le champignon pourrait également être pris en compte. La mise en place des tissus symbiotiques pourrait dépendre d'un **équilibre** entre la **quantité d'auxine fongique délivrée** dans les racines, son activité, et l'activité de nombreux **autres composés fongiques** comme d'autres régulateurs de croissance tels les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène ou des composés **comme l'hypaphorine**, un alcaloïde indolique accumulé par le champignon ectomycorhizien *Pisolithus microcarpus* (Béguiristain et al. 1995).

3) *L'hypaphorine*

a) *Un maillon dans le dialogue moléculaire*

L'hypaphorine est la betaïne du tryptophane, c'est-à-dire que cette molécule contient un noyau indol (tout comme l'AIA ou le tryptophane (fig 13)) et un groupement betaïne (groupement amine primaire transformé en ammonium quaternaire). Ce petit **alcaloïde indolique** (MM : 246 $g.mol^{-1}$) est un acide faible possédant une fonction carboxylique d'un pKa de 1,79. Il a été détecté dans de nombreuses plantes dont *Erythrina hypaphorus* et récemment dans les parties aériennes d'*Eucalyptus globulus* (Lagrange 2001). Cet alcaloïde indolique déjà présent dans les hyphes de *Pisolithus microcarpus* en culture pure, est accumulé en plus grande quantité dans les tissus fongiques au cours des interactions précoces avec la plante hôte *Eucalyptus globulus* (Béguiristain et Lapeyrie 1997). **L'accumulation d'hypaphorine (dont la concentration cytosolique peut atteindre 6 mM),** n'est inductible que **par la présence de la plante hôte ou de ses exsudats racinaires** (Lagrange et al. 2004) ; elle ne peut être induite par des plantes non-hôtes comme la tomate, le cresson ou le trèfle qui ne forment que des endomycorhizes (Béguiristain et Lapeyrie 1997). La **zeatine**, une cytokinine présente dans les exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* induit des modifications d'angle de ramification des hyphes de *Pisolithus microcarpus* (paragraphe III-A-2), et une suraccumulation d'hypaphorine (Lagrange et al. 2004).

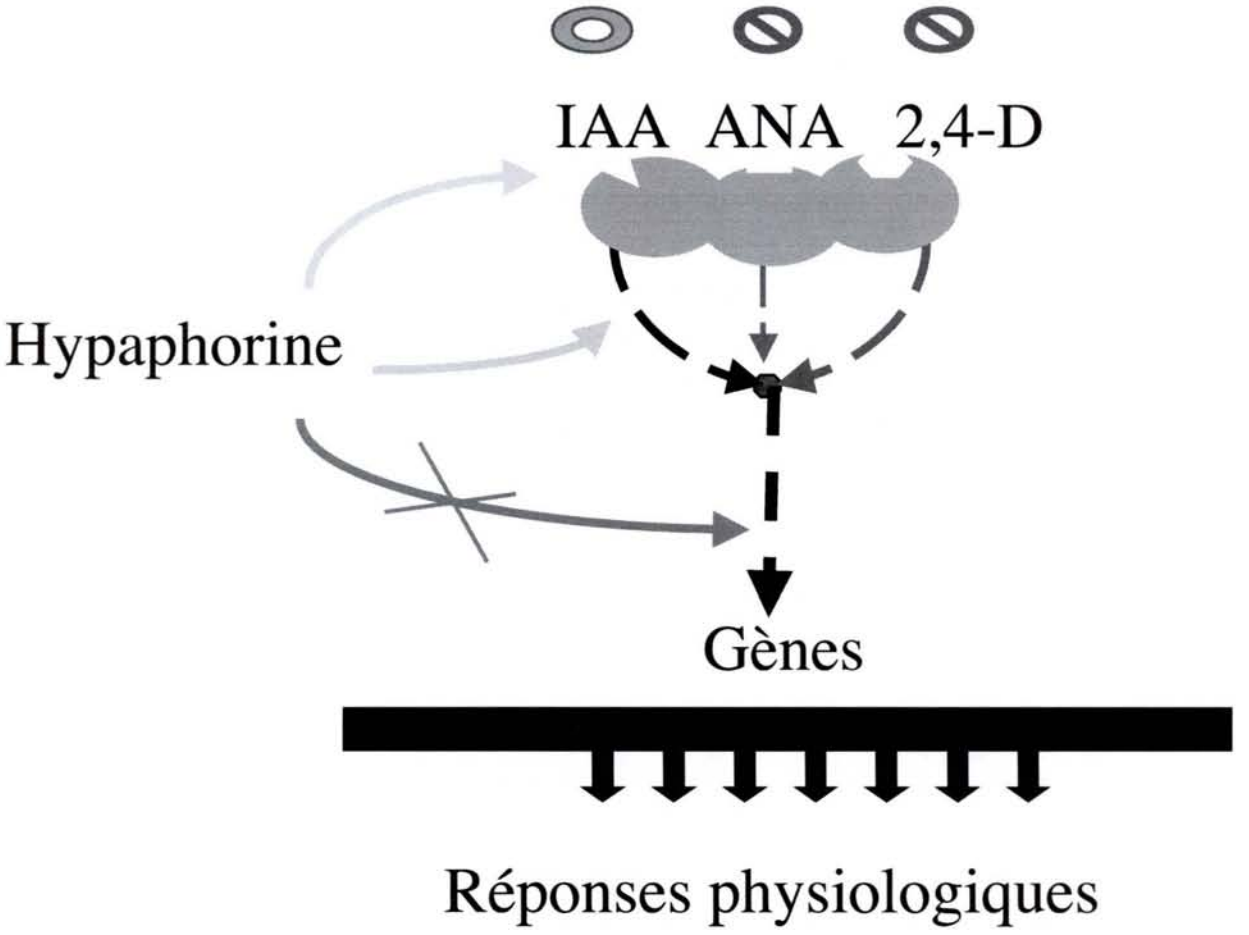


Fig 18 : Représentation schématique du mode d'action hypothétique de l'hypaphorine. L'AIA et l'hypaphorine interagiraient très tôt, lors de la perception ou lors des premières étapes de la transduction du signal auxinique. D'après Ditengou, 2000.

La forte concentration d'hypaphorine est maintenue dans les mycorhizes fonctionnelles, même âgées de plusieurs mois (Béguiristain et Lapeyrie 1997). En culture pure, des concentrations équivalentes à celles des mycorhizes, uniquement dans les hyphes situées en bordure des colonies (c'est-à-dire dans la partie la plus jeune des hyphes) ; la teneur en hypaphorine est alors dix fois plus importante que dans les hyphes du centre de la colonie (la partie la plus âgée). Ceci pourrait indiquer que les hyphes au contact de la racine sont maintenues dans un **état juvénile** et métaboliquement actif ; état de juvénilité observé en microscopie dans les hyphes constituant les mycorhizes (manteau et réseau de Hartig). À ce jour, aucun effet morphogène de l'hypaphorine n'a été observé sur les hyphes du champignon.

Récemment, Lagrange (2001) a montré que l'hypaphorine, ajoutée au milieu, était très rapidement **absorbée** par les racines et **transportée dans les parties aériennes** de la plante où elle s'accumule. Les parties aériennes des plantules dont les racines sont colonisées par les hyphes de *P. microcarpus* contiennent deux fois plus d'hypaphorine que celles de plantules cultivées en son absence (Lagrange 2001).

b) Activité de type auxinique ou activité anti-auxinique ?

La présence d'un noyau indole a suggéré que l'hypaphorine pourrait posséder une activité de type auxinique. Les premiers résultats obtenus ont confirmé cette hypothèse : tout **comme l'AIA** et le 2,4-D (acide 2,4 dichlorophenoxyacétique, une auxine de synthèse), **l'hypaphorine stimule l'expression du gène EgHypar**. Ce gène est également surexprimé lors de la mise en place de l'ectomycorhize (Nehls et al. 1998) et code pour une protéine possédant une activité Gluthatione-S-transférase (Tagu et al. 2003).

Ditengou a ensuite montré que l'hypaphorine possédait **une activité antagoniste de l'AIA**. En effet, un apport d'hypaphorine restaure la croissance du pivot d'*Eucalyptus globulus* inhibée par de fortes concentrations en AIA (Ditengou et Lapeyrie 2000). Par contre, l'hypaphorine ne régule pas les activités des analogues de synthèse de l'AIA (l'ANA ou le 2,4-D) (Ditengou et Lapeyrie 2000). Ditengou a alors suggéré que l'AIA et l'hypaphorine interagissaient très tôt, lors de la perception ou lors des premières étapes de la transduction du signal auxinique (Fig 18). Notons qu'ici l'activité de l'hypaphorine est dans une certaine mesure spécifique, elle ne peut être mimée par un apport de tryptophane.

(i) Activité anti-auxinique de l'hypaphorine : la croissance des poils absorbants

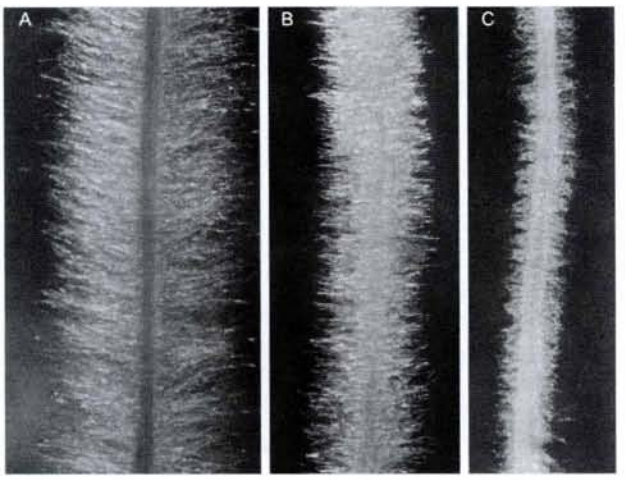


Fig 19 : Développement des poils absorbants d'*E. globulus* âgés de 6 - 7 jours sur un milieu contenant (A) 0 µM, (B) 100 µM et (C) 1000 µM d'hypaphorine. D'après Béguiristain et Lapeyrie 1997.

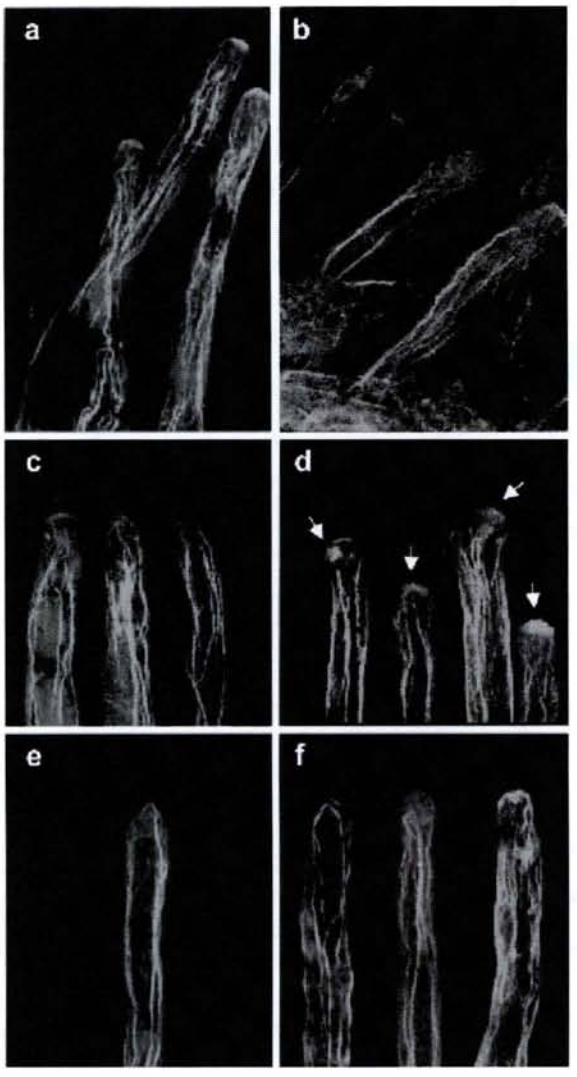


Fig 20 : Microscopie confocale du cytosquelette d'actine de poils absorbants *d'Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* marqués avec de la rhodamine–phalloïdine.
(a) Poils témoins en croissance. (b, c) Poils traités avec 250 μM d'hypaphorine pendant 15 mn (b) et 45 mn (c). Une coiffe d'actine à l'apex comparable à celle des poils témoins en croissance (a) est rarement visible. (d) Poils en croissances traités avec 250 μM d'hypaphorine durant 45 mn (comme en c) puis incubé pendant 15 mn dans 1μM d'AIA. Le traitement à l'AIA initie la restauration de la coiffe d'actine à l'apex (flèches). (e) Poil ayant arrêté sa croissance. (f) Poils ayant arrêtés leurs croissances traités avec 250 μM d'hypaphorine durant 45 mn. D'après Ditengou et al. 2003.

Chez la plante, la seule activité morphogène rapportée de l'hypaphorine est une forte **réduction de la taille des poils absorbants** (Fig 19) (Béguiristain et Lapeyrie 1997), que **l'on pourrait rapprocher avec l'absence de poils absorbants** des racines mycorhizées. Ditengou a montré que l'hypaphorine contrôlait la vitesse de croissance des poils absorbants. En effet, à une concentration de 100 µM, l'hypaphorine induit rapidement un ralentissement de la vitesse de croissance des poils et une déformation transitoire de l'apex de ceux-ci. À des concentrations plus élevées (500 µM et plus), un apport d'hypaphorine arrête la croissance des poils absorbants 15 minutes seulement après introduction dans le milieu de culture. Par contre, l'initiation de nouveaux poils absorbants à partir des trichoblastes n'est pas affectée, et cela, même à des concentrations très élevées d'hypaphorine (1mM) (Ditengou et al. 2000).

D'autre part, alors que l'AIA n'a pas d'activité sur l'élongation des poils absorbants d'*Eucalyptus globulus*, **un apport d'AIA restaure la croissance des poils préalablement inhibée par l'hypaphorine** (Ditengou et al. 2000).

(ii) Activité anti-auxinique de l'hypaphorine : le cytosquelette des poils absorbants

Ditengou et al. (2003) ont observé une **agrégation** des faisceaux de filaments d'**actine** ainsi que des agrégations localisées de **microtubule**s dans les poils absorbants d'*Eucalyptus globulus* cultivés en présence d'hypaphorine. Ces altérations de la structure du cytosquelette peuvent être reversées **par un apport d'AIA** (Fig 20) (Ditengou et al. 2003).

c) Hypaphorine et ontogenèse ectomycorhizienne

Quel serait le rôle de l'hypaphorine dans l'ontogenèse mycorhizienne?

Les différentes observations énoncées ci-dessus ont conduit aux hypothèses suivantes :

* L'hypaphorine pourrait agir tout comme l'AIA, sur le **cytosquelette** des cellules rhizodermiques, et conduire aux changements de forme observés, notamment à l'élongation radiale des cellules.

* **L'absence des poils absorbants** à la surface des racines mycorhizées pourrait être due en partie à une libération par le champignon de molécules inhibitrices de l'élongation, comme l'hypaphorine.

* L'hypaphorine pourrait par ailleurs **moduler** dans le temps et dans l'espace, dans différents tissus, **l'activité auxinique** au cours de la mycorhization, le mode d'action exact de l'hypaphorine tout comme celui de l'AIA, restant à identifier.

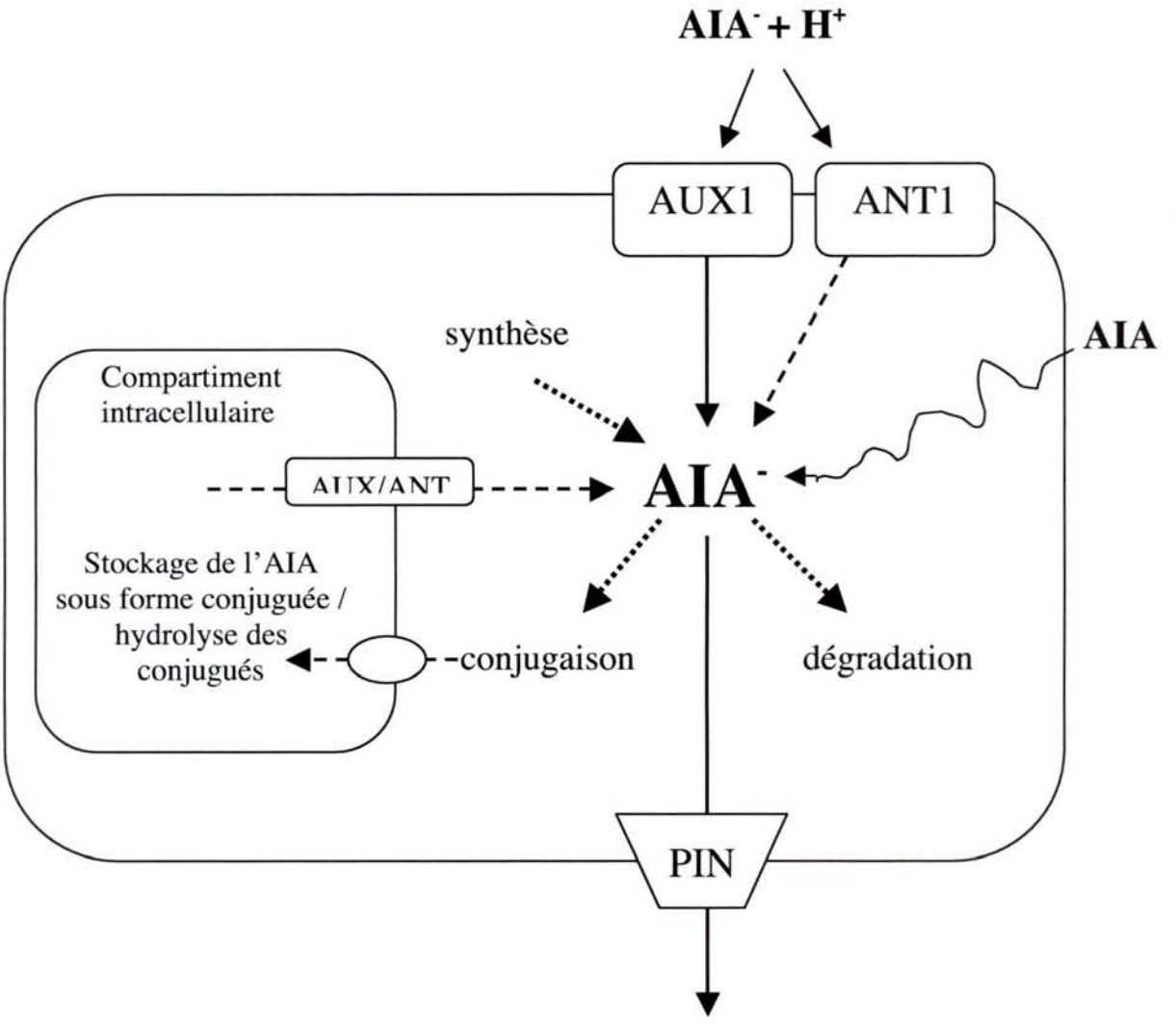


Fig 21 : Schéma simplifié des voies de régulation de la concentration en AIA. L'AIA peut pénétrer dans la cellule par simple diffusion (flèche en zig zag) ou à l'aide de transporteurs (flux actif : flèches pleines). AUX1 ANT1 et PIN sont des protéines qui pourraient être impliquées dans le transport de l'AIA. Divers processus métaboliques peuvent également intervenir pour réguler la concentration (flèches en pointillé). Schéma modifié d'après Zazimalova et Napier 2003.

Si l'hypaphorine fongique semble pouvoir jouer un rôle lors de l'établissement de l'ectomycorhize, il n'en reste pas moins qu'à ce jour, il n'a pas été détecté d'hypaphorine dans les hyphes de champignons ectomycorhiziens autre que *Pisolithus microcarpus* (Béguiristain et al. 1995). Il pourrait cependant exister chez les champignons ectomycorhiziens, non producteurs d'hypaphorine, d'autres molécules possédant une activité semblable à celle de l'hypaphorine, c'est-à-dire régulant également l'activité auxinique et jouant un rôle identique dans l'ontogenèse ectomycorhizienne. **Les molécules concernées pourraient appartenir, tout comme l'hypaphorine, au groupe des alcaloïdes indoliques.**

III. La régulation de l'activité auxinique chez les plantes

A. La régulation de la concentration en AIA libre

Le premier moyen de réguler l'activité auxinique est sans doute de réguler la concentration en **AIA libre** en un point donné, l'AIA libre (c'est-à-dire non liée à une autre molécule) étant la **forme active** de cette molécule. La plante fait appel à plusieurs systèmes de régulation (Fig 21).

1) La régulation de la synthèse

Deux grandes voies de synthèse de l'AIA ont été identifiées chez des plantes.

* **La voie tryptophane-dépendante**, qui comme son nom l'indique, a pour précurseur le tryptophane. Cette voie peut ensuite se subdiviser en 3 et passer par 3 intermédiaires pouvant mener à la synthèse de l'AIA: l'acide indole-pyruvique et la tryptamine (Cooney and Nonhebel 1991), ou l'indole-acétamide (Hull et al. 2000).

* La **voie tryptophane-indépendante**, qui a été découverte chez des mutants de maïs incapables de produire du tryptophane, mais capables d'accumuler pourtant une quantité importante d'AIA. Cette voie aurait pour précurseur l'indole-3glycérol phosphate (Sztein et al. 2000).

De nombreux auteurs pensent que la voie de biosynthèse tryptophane-indépendante maintiendrait une concentration basale d'AIA, alors que la voie tryptophane-dépendante serait engagée lorsqu'une concentration supérieure d'AIA serait requise, comme au cours de l'embryogenèse (Bartel et al. 2001). Mais à ce jour, les mécanismes permettant la stimulation de la biosynthèse sont mal connus (Zazimalova et Napier 2003). De plus, il a été montré que la surexpression de

gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de l'AIA ou l'application d'AIA exogène entraînaient une rapide accumulation d'AIA sous forme conjuguée inactive et une oxydation accrue de l'auxine, la plante essayant de récupérer une certaine homéostasie (Zazimalova et Napier 2003).

2) *La régulation de l'AIA libre : catabolisme de l'AIA et conjugaison*

Deux voies principales, l'oxydation et la conjugaison, sont empruntées pour diminuer la concentration en AIA libre (Chamarro et al. 2001, Kowalczyck et Sandberg 2001).

L'oxydation de l'AIA en acide 2-oxindole-3 acetic est un phénomène irréversible, qui commence par une oxydation à partir du dioxygène et implique la participation d'un système enzymatique constitué d'une ou plusieurs oxydases ou oxygénases.

La **conjugaison** aboutit à une forme de stockage et/ou de transport de l'AIA, mais des formes conjuguées de l'AIA comme l'acide 3-indole-acétyl-N-aspartic peuvent également être dégradées. L'AIA peut se conjuguer sous diverses formes : avec des protéines, des peptides, des sucres, des acides aminés. Il semblerait que ce soit par la conjugaison que se fasse essentiellement la régulation de la concentration en AIA libre. S'il existe désormais de nombreuses descriptions de l'évolution du pool d'AIA chez *Arabidopsis* (Ljung et al. 2001a), *Pinus sylvestris* (Ljung et al. 2001b) ou *Citrus sinensis* (Chamarro et al. 2001), les mécanismes de régulation sont encore mal connus. Peu de gènes et d'enzymes impliqués dans ces voies de régulation ont été identifiés et caractérisés à ce jour. Il semblerait toutefois que de nombreux "AIA-conjugués" soient stockés dans la vacuole ou dans le réticulum endoplasmique.

3) *La régulation du transport*

Synthétisée dans les apex et les entre-noeuds des tiges et des rameaux, l'AIA est distribuée dans tous les tissus, y compris les racines, où elle s'accumule.

L'auxine est susceptible de migrer de cellule à cellule à partir du lieu de synthèse par **diffusion simple**, mais également grace à des transporteurs; le transport de l'auxine est un **transport** dit **polarisé** : grâce à la distribution asymétrique au niveau de la membrane plasmique de transporteurs spécifiques, il s'effectue de cellule à cellule, généralement de l'apex vers la base.

Ceci a des **conséquences sur l'organogenèse** : il y a différenciation de racines à la base et de bourgeons à l'apex, un rapport auxine/cytokinine élevé

stimulant la synthèse de racines et un rapport auxine/cytokinine faible stimulant la différenciation des bourgeons.

D'autre part, le transport polarisé de l'auxine permet de comprendre les **tropismes,** tels que le gravitropisme ou le phototropisme. Par exemple, dans le contexte du phototropisme, la lumière provoque (par un mécanisme que l'on ignore) une migration d'auxine depuis la face éclairée vers la face sombre, engendrant ainsi un allongement de la face sombre lié à l'effet de l'auxine sur l'élongation cellulaire.

En dehors de la synthèse, de la dégradation et de la conjugaison, le transport auxinique est probablement un moyen tout aussi important de contrôler la concentration en AIA libre dans une partie de la plante. L'importance du transport de l'auxine dans le développement des racines latérales a d'ailleurs été clairement établie (Rashotte et al. 2001, Marchant et al. 2002).
Plusieurs protéines impliquées dans l'efflux et l'influx cellulaire d'AIA ont été caractérisées chez *Arabidopsis*, parmi lesquelles, les protéines **AUX** (Bennet et al. 1996) **ou ANT** (Chen et al. 2001), régulatrices de l'influx, et les protéines **PINs** (Chen et al. 1998, Gälweiler et al. 1998; Luschnig et al. 1998), régulatrices de l'efflux. Les PINs sont situées principalement dans la partie basale des cellules (Palme et Gälweiler 1999, Frimln et Palme 2002), et les protéines AUXs principalement dans la partie apicale (Swarup et al. 2001). D'autres protéines régulées notamment par le NPA (un inhibiteur du transport auxinique) semblent intervenir et formeraient un complexe d'efflux avec les protéines PINs. Il est vraisemblable que la flexibilité de ce système de transport est liée à un **recyclage** constant de ces protéines au niveau de la membrane (Geldner et al. 2001, Baluska et al. 2003, Muday et al. 2003), ce qui permet, par conséquent, de piloter la direction de l'exportation en jouant sur le site d'insertion de ces protéines dans la cellule émettrice.

Bien que de nombreuses protéines impliquées dans le transport auxinique aient été identifiées, on connaît encore très mal les mécanismes de régulation du transport. Il semblerait que l'activité du complexe d'efflux soit régulée par un système de phosphorylation/déphosphorylation (Delbarre et al.1998). Des mutants d'Arabidopsis pour une phosphatase (mutant rcn1) sont plus sensibles au NPA (Garbers et al. 1996, Deruere et al. 1999) ; et une protéine kinase PINOID augmente le transport polarisé de l'auxine (Benjamins et al. 2001). En dehors des inhibiteurs synthétiques du transport auxinique comme le NPA ou le TIBA, seuls les flavonoïdes ont été identifiés comme des régulateurs endogènes (Brown et al. 2001).

B. La régulation de l'activité auxinique : de la perception à la transduction du signal

1) La perception de l'auxine

Si de nombreuses protéines (**ABP** : Auxin Binding Protein) sont capables de se lier à l'auxine de façon spécifique, seules ABP1 et ABP_{57} possèdent les fonctions d'un **récepteur**, c'est-à-dire que ces deux ABP se lient avec une haute affinité et une grande spécificité à l'auxine et transmettent une réponse dépendant de l'auxine (Vénis et Napier 1995, Napier et al. 2002, Kim et al. 2001). Toutefois ABP_{57} a été très peu étudiée et de nombreux auteurs considèrent que seule ABP1 possède les caractéristiques de récepteur auxinique (Zazimalova et Napier 2003).

ABP_{57} a été détectée dans le riz. Cette protéine soluble de 57 kDa interagit avec une pompe à protons membranaire et créerait, ainsi, un circuit court entraînant directement une acidification de la paroi (Kim et al. 2001).

ABP1 est une glycoprotéine homodimérique de 163 aminoacides qui reste essentiellement retenue dans le réticulum mais sa forme fonctionnelle se situe en surface au niveau de la membrane plasmique (Luschni et Fink 1999). La structure d'ABP1 et son site liant l'auxine ont été bien caractérisés (Woo et al. 2002).

La surexpression ou la suppression antisens d'ABP1 a prouvé l'implication d'ABP1 dans de nombreuses fonctions comme l'organisation cellulaire au cours de l'embryogenèse (Chen et al. 2001) ou la sensibilité à l'auxine des cellules de gardes des stomates (Bauly et al. 2000). L'inactivation totale par "knock-out" du gène codant pour ABP1, entraîne une mort très précoce de l'embryon, ce qui empêche les études aux stades ultérieurs (Chen et al. 2001). Ces travaux ont montré qu'ABP1 était un régulateur essentiel dans de nombreuses réponses à l'auxine, toutefois ABP1 ne semble pas intervenir dans toutes les réponses auxine-dépendantes. Il existe vraisemblablement plusieurs récepteurs différents, dont des récepteurs intracellulaires autre qu'ABP1, ABP_{57} serait l'un d'entre eux.

À ce jour, aucune molécule n'a été identifiée comme régulant spécifiquement l'activité auxinique sur ce récepteur.

2) La régulation de la transduction

Le signal auxinique est perçu par les cellules puis rapidement transduit et traduit par des phénomènes de croissance et de développement. Certaines réponses à l'auxine, comme l'hyperpolarisation de la membrane (Rück et al. 1993) peuvent être observées dans les secondes qui suivent l'addition d'auxine.

S'il reste encore beaucoup d'incertitudes sur les modes de perception et de régulation de la concentration en AIA libre, en revanche la transduction du signal auxinique semble mieux connue (Leyser 2001).

De nombreuses protéines impliquées dans les voies de transduction ont été caractérisées grâce à l'utilisation de mutants, montrant ainsi la complexité du système. Mais de nombreux "trous" persistent encore dans la chaîne de transmission du signal. Les gènes **Aux/IAA** induits par l'auxine, codant pour de petites protéines nucléaires, interagissent avec des **ARFs** (Auxin Response Factors), une famille de facteurs de transcription, pour former un complexe qui régule l'expression de gènes (par activation ou répression). Des mutants impliquant les gènes Aux/IAAs ou ARFs ont montré une sensibilité altérée à l'auxine prouvant leur implication dans la régulation du signal auxinique. Les ARFs se lient aux régions régulatrices des gènes répondant à l'auxine, les **AREs** (Auxin Response Elements) (Guilfoyle et Hagen 2001). Les ARFs et Aux/IAA seraient dépendant de mécanismes d'ubiquitinisation (Guilfoyle et Hagen 2001, Ward et Estelle 2001). La régulation des voies de transduction se ferait par dissociation des complexes, et ferait intervenir des phénomènes de phosphorylation (Colon-Carmona et al. 2000). En cas de forte concentration en auxine, on aurait une dissociation des complexes, et en cas de faible concentration, ces complexes seraient formés.

Quant à l'activation des pompes H^+-ATPases, elle se ferait par l'intermédiaire de Phospholipase A2 (Scherer et al. 2000).

En conclusion, il existe de nombreux modes de régulation potentiels de l'activité auxinique, mais la connaissance des mécanismes impliqués est encore très partielle. Très peu de molécules ont été identifiées comme régulatrices de l'activité auxinique.

IV. L'ontogenèse ectomycorhizienne ; de l'expression des gènes aux conséquences physiologiques

L'établissement de la symbiose requiert des **échanges de signaux** s'accompagnant de modifications morphogénétiques importantes chez les deux partenaires.

Ces changements sont associés à des **modifications dans la synthèse protéique** et dans l'expression de gènes, des cellules fongiques et racinaires, impliquées dans la synthèse et le fonctionnement des nouveaux tissus (Barker et al. 1998). Dans un premier temps, de nombreuses études ont porté sur

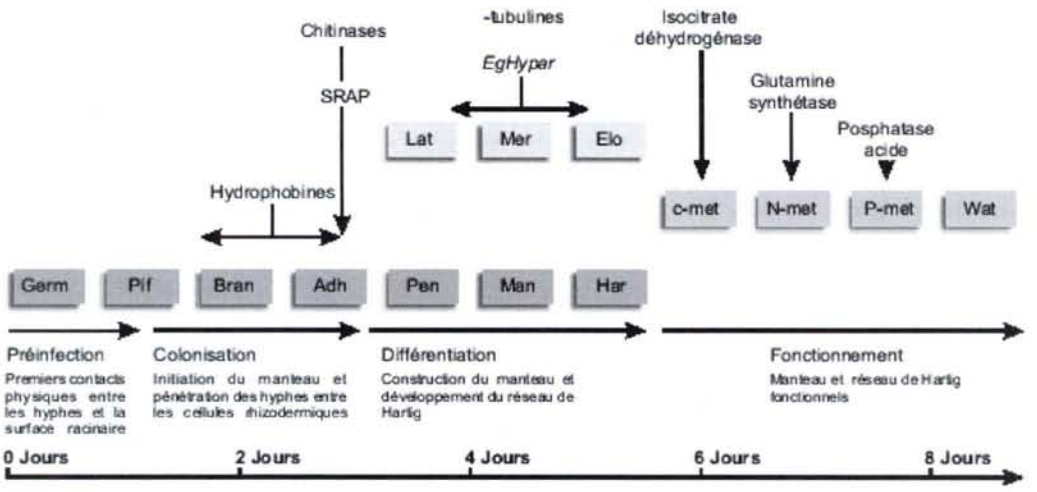


Fig 22 : Principales protéines et gènes SR accompagnant le développement de l'ectomycorhize *Eucalyptus-Pisolithus* in vitro. La différenciation *in vitro* de l'ectomycorhize peu se subdiviser en quatre phases principales : préinfection, colonisation, différenciation et fonctionnement (Germ : germination des spores, Pif : Préinfection et croissance des hyphes, Bran : ramification des hyphes au contact de la racine, Adh : adhésion des hyphes à la surface de la racine, Pen : pénétration des hyphes entre les cellules rhizodermiques, Man : formation du manteau, Har : formation du réseau de Hartig, Lat : formation des racines latérales, Mer : arrêt de l'activité du méristème racinaire, Elon : allongement des cellules rhizodermiques, C-met : métabolisme du carbone, N-met : métabolisme de l'azote, P-met : métabolisme du posphore et Wat : statut hydrique). D'après Martin et al. 1997.

l'identification de protéines spécifiques ou préférentiellement accumulées (Hilbert et al. 1991, Burgess et al. 1995). Plus récemment, de nouvelles techniques de biologie moléculaire ont permis de suivre l'expression d'un grand nombre de gènes au cours de la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne (Voiblet et al. 2001, Johansson et al. 2004, Duplessis et al. 2004).

A. Les modifications du protéome

La formation d'ectomycorhizes implique la modification de l'accumulation et de la synthèse de protéines chez les deux partenaires (Hilbert et al. 1991, Tarkka et al. 1998).

1) Un profil polypeptidique nouveau

Les travaux pionniers de Séviour et Chilvers (1972) et Séviour et al. (1974) ont permis d'émettre l'hypothèse d'une perturbation de la biosynthèse protéique lors de la mycorhization. Pour mettre en évidence d'une "reprogrammation" génétique lors de l'ontogenèse mycorhizienne, les premières études menées par Hilbert et Martin (1988) se sont d'abord attachées aux protéines accumulées. Les auteurs ont analysé les polypeptides accumulés dans les racines latérales ectomycorhizées d'*Eucalyptus globulus – Pisolithus microcarpus* obtenues in vitro. La carte polypeptidique, obtenus par électrophorèse bidirectionnelle, se rapportant aux mycorhizes a été comparée avec celles réalisées à partir des protéines totales des deux partenaires cultivés indépendamment. Le profil protéique des mycorhizes ne correspond pas à la simple superposition des patrons protéiques des partenaires pris séparément. Ainsi le protéome d'une ectomycorhize présente des caractéristiques qui lui sont propres.

Il a été observé une diminution de la concentration d'un grand nombre de polypeptide principalement racinaires, mais également une forte accumulation de certaines protéines fongiques et racinaires. Une dizaine de polypeptides spécifiques des tissus ectomycorhiziens, appelés **ectomycorhizines** (environ 1 à 2 % des protéines totales) a été identifiée (Fig 22).

2) Une modification de la biosynthèse protéique précoce

La plupart des protéines fortement accumulées dans l'ectomycorhize proviennent d'une **synthèse *de novo*** (Hilbert et al. 1991). Ceci montre que la formation de la mycorhize provoque une "**reprogrammation**" génétique. Ces modifications dans la biosynthèse protéique apparaissent très tôt lors de la phase de contact et avant l'apparition de modifications morphologiques. Duchesne (1989) avait montré dans le couple *Pinus-Paxillus* que les premières modifications de la biosynthèse protéique avaient lieu avant tout contact physique entre les deux partenaires (ceux-ci étaient séparés par une membrane de cellophane). Ceci suggère l'existence **d'ectomycorhizines précoces** jouant un rôle dans la structuration de l'organe symbiotique plutôt que dans son fonctionnement. Enfin, lorsque les racines d'*Eucalyptus* sont mises en contact avec du mycélium d'un isolat de *Pisolithus microcarpus* non agressif, certaines modifications observées en présence d'une souche aggréssive, n'apparaissent pas, montrant le caractère spécifique de certaines de ces réponses.

3) *Des modifications de la biosynthèse protéique plus tardives*

À partir des mycorhizes prélevées sur des *Eucalyptus* cultivés en serre âgées de 3 mois, plusieurs ectomycorhizines ont été identifiées (Burgess et al. 1995, Laurent 1995). Leurs pI et leurs masses moléculaires diffèrent de ceux des **ectomycorhizines** obtenues à partir de mycorhizes plus jeunes cultivées *in vitro*. Ceci indiquerait l'existence de polypeptides **spécifiques de la symbiose mature**, ayant probablement un rôle dans les modifications des métabolismes des deux partenaires.

4) *Une diminution sensible de la biosynthèse protéique des racines*

Les processus responsables de la **disparition de nombreux polypeptides** de la racine ne sont pas encore totalement expliqués. Deux phénomènes pourraient intervenir. Tout d'abord, lors de la formation des ectomycorhizes, les racines colonisées ne développent pas de **poils absorbants** (Béguiristain et Lapeyrie 1997, Ditengou et al. 2000). Une partie des polypeptides disparus pourrait donc provenir des poils absorbants. Ensuite, la colonisation de la racine par le champignon entraîne un fort ralentissement de l'activité méristèmatique de la racine. Le **méristème** étant la partie de la racine la plus riche en protéines, le **ralentissement** ou l'arrêt de son fonctionnement pourrait entraîner une forte

réduction de la concentration de certains polypeptides impliqués dans la division cellulaire (Burgess et al. 1996).

Bien que l'apparition d'ectomycorhizines n'ait pas toujours été observée, notamment chez les Gymnospermes (Guttenberger et Hampp 1992), la reprogrammation de la biosynthèse des protéines lors de la formation des mycorhizes a été démontrée avec d'autres modèles ectomycorhiziens : *Betula pendula - Paxillus involutus* (Simoneau et al. 1993), *E. grandis - P. microcarpus* (Burgess et al. 1996, Laurent et al. 1999), *P. sylvestris - Suillus bovinus* (Tarkka et al. 1998).

5) *Une augmentation de la synthèse protéique de quelques polypeptides fongiques ; caractérisation de protéines SR*

Seules quelques protéines régulées par la symbiose ont été bien caractérisées (Martin et al. 1999).

a) Les SRAPs

Les SRAPs (Symbiosis-Regulated Acidic Polypeptides) appartiennent à un groupe d'une douzaine de polypeptides présentant des caractéristiques physico-chimiques proches. Il existe différentes isoformes de ces protéines qui sont reconnues par le même anticorps (Laurent et al. 1999). Certaines de ces protéines sont accumulées de façon constitutive dans le mycélium fongique alors que d'autres sont préférentiellement synthétisées dans la mycorhize. Des fractionnements cellulaires ont permis de montrer que les SRAPs présentaient une localisation cytoplasmique, membranaire, pariétale ou étaient sécrétées (Burgess et al. 1996, Laurent et al. 1999). L'analyse des séquences des SRAPs met en évidence un **motif RGD** (Arg-Gly-Asp) caractéristique des **adhésines** fongiques et des protéines de la matrice cellulaire des cellules animales (vitronectine, fibronectine). Ainsi, certaines SRAPs, de par leur localisation pariétale, pourraient jouer un rôle dans la structure de l'organe symbiotique ou dans la reconnaissance entre symbiotes. D'autres SRAPs, une fois sécrétées, pourraient entrer dans la composition de l'interface créée entre les deux partenaires lors de l'établissement de la mycorhize.

b) Les mannoprotéines

Une des modifications majeures du protéome **pariétal** engendrée par l'élaboration d'une ectomycorhize, est la diminution de la synthèse et de la concentration d'un polypeptide acide pariétal fongique de 95kDa. Cette

glycoprotéine à mannose dénommée **gp95**, existe sous plusieurs isoformes. Cette protéine pariétale qui représente 4 % des protéines totales extraites du champignon *P. microcarpus* en culture pure (Tagu et Martin 1996), voit sa concentration diminuer de 90 % lors de la différenciation ectomycorhizienne (Hilbert et Martin 1988). Lorsque le réseau de Hartig est élaboré (7 jours après contact), sa teneur, tout comme celle de gp 72, une autre mannoprotéine, est en dessous du seuil de détection. La protéine gp95 à été localisée par immunocytolocalisation dans les couches superficielles de la paroi du champignon. La disparition massive de ces protéines lors des premières étapes de la symbiose modifierait la composition en glucanes exposés à la surface de l'hyphe colonisant la racine. La transformation de la paroi fongique pourrait, par suppression de certains sucres pariétaux de surface, limiter les réactions de défense de la plante (Salzer et al. 1997).

c) Les hydrophobines

D'autres protéines pariétales telles que des hydrophobines de *Pisolithus microcarpus* (hydPt-1, hydPt-2 et hydPt-3), sont également différentiellement exprimés au cours de la formation de l'ectomycorhize (Tagu et al. 1996, Martin et al. 1999, Duplessis et al. 2001). Les hydrophobines sont de petites protéines morphogénétiques fongiques modérément hydrophobes et riches en cystéines (Wessels 1996, Wösten et al. 1997). Bien que les séquences primaires de ces protéines soient peu conservées, elles possèdent toutes un motif de 8 cystéines, permettant de les classer en deux catégories selon l'espacement existant entre ces cystéines (Kershaw et Talbot 1998). Ces cystéines sont impliquées dans la formation de ponts disulfures. Ces protéines sont capables de "s'auto-assembler" à l'interface entre l'eau et l'air ou l'eau et un milieu hydrophobe, pour former des complexes particulièrement insolubles (Wösten et al. 1993). "L'auto-assemblage" de ces protéines, au sein de la paroi fongique, contribuerait à l'émergence des hyphes aériennes (Wösten et al. 1997). Certaines hydrophobines seraient impliquées dans l'agrégation de structures aériennes comme les carpophores (Wösten et al. 1997). Le rôle exact de ces protéines lors de la formation de l'organe ectomycorhizien n'est pas encore clairement défini. Toutefois, il est probable que ces hydrophobines interviennent lors de **l'accrochage des hyphes** fongiques à la surface de la racine, lors de la pénétration des hyphes entre les cellules corticales de la racine et lors de l'agrégation des hyphes entre elles au cours de la formation du manteau, chacune des trois hydrophobines (HydPt-1, HydPt-2, HydPt-3) ayant probablement une fonction propre. L'immunolocalisation de HydPt-1 a permis de confirmer la localisation pariétale de cette protéine (Martin et al. 1999), mais son rôle n'a pu être mis en évidence par transformation génétique du basidiomycète ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* avec hydPt-1 (Tagu et al. 2002). Les hydrophobines pourraient

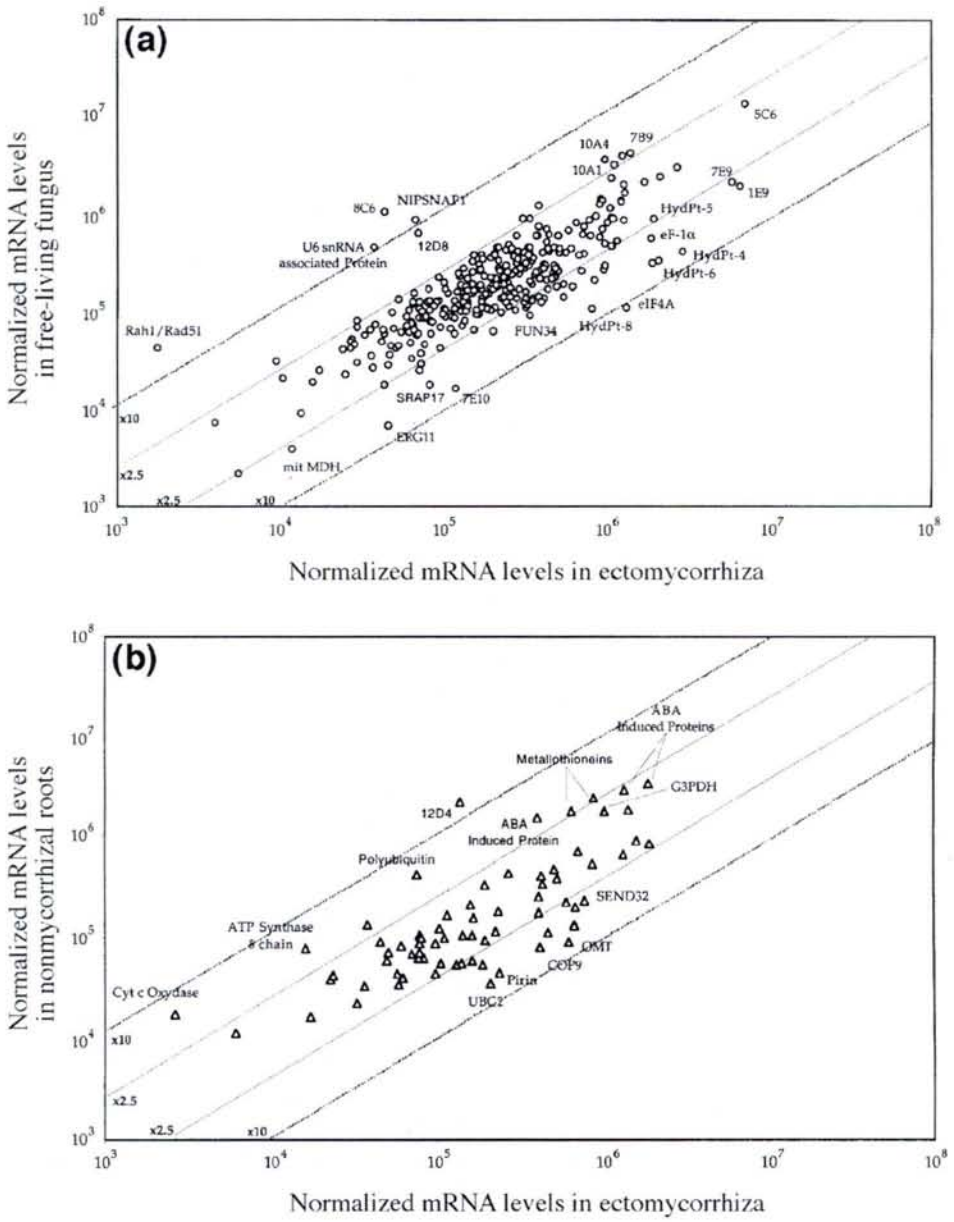


Fig 23 : Profils d'expression de 400 gènes de *Pisolithus microcarpus* ou d'*Eucalyptus globulus* non mycorhizée; comparaison des taux de transcrits entre la mycorhize agée de 4 jours (axe des abscisses) et le mycélium végétatif de *Pisolithus* (a) ou les racines d'*Eucalyptus* non mycorhizées (b) (axe des ordonnées). D'après Voiblet et al. 2001.

être impliquées dans **l'hyper-hydrophobicité des racines mycorhizées et réduire la perméabilité du manteau ectomycorhizien** (Bucking et al. 2002).

Pour conclure, l'étude du protéome de l'ectomycorhize a permis d'identifier des protéines dont l'accumulation est modulée par l'établissement de l'association symbiotique. La caractérisation plus précise de quelques protéines SR montre clairement que la **composition protéique des parois fongiques** est très affectée par le processus de développement. Cette altération a lieu dans les **phases précoces** du développement correspondant au contact et à la fixation des hyphes à la surface racinaire. On peut alors émettre l'hypothèse que ces protéines SR sont impliquées dans la formation de la structure pariétale fongique nécessaire à la colonisation de la racine et dans la formation de l'interface symbiotique entre les cellules des deux partenaires.

B. Les modifications du transcriptome

1) Des programmes de séquençages systématiques à l'étude des modifications de l'expression de gènes

En dehors des changements morphologiques et physiologiques déjà évoqués précédemment, l'interaction entre champignons ectomycorhiziens et plantes hôtes induit une cascade de **changements dans l'expression des gènes des deux partenaires** (Voiblet et al. 2001, Polidori et al. 2002, Johansson et al. 2004). La connaissance détaillée de ces processus moléculaires est essentielle pour comprendre le développement des tissus symbiotiques (Martin et al. 2001, Wiemken and Boller 2002). Afin, d'avoir une vision globale des gènes régulés et exprimés au cours de la formation d'une ectomycorhize, on a développé des programmes de **séquençage systématique d'ADNc** (EST : expressed séquence tags) issus de différentes banques d'ectomycorhizes de *d'Eucalyptus globulus / Pisolithus microcarpus* (Voiblet et al. 2001) ou de *Betula pendula/ Paxillus involutus/* (Johansson et al. 2004), de racines de peuplier (Kohler et al. 2003), de mycélium de *Pisolithus microcarpus* ou *Laccaria biccolor* (Peter et al. 2003). La comparaison des séquences, puis l'étude par filtres à ADNc, de l'expression des gènes correspondant a permis d'identifier de nombreux gènes régulés par la symbiose chez le partenaire fongique et chez le partenaire végétal (gènes SR).

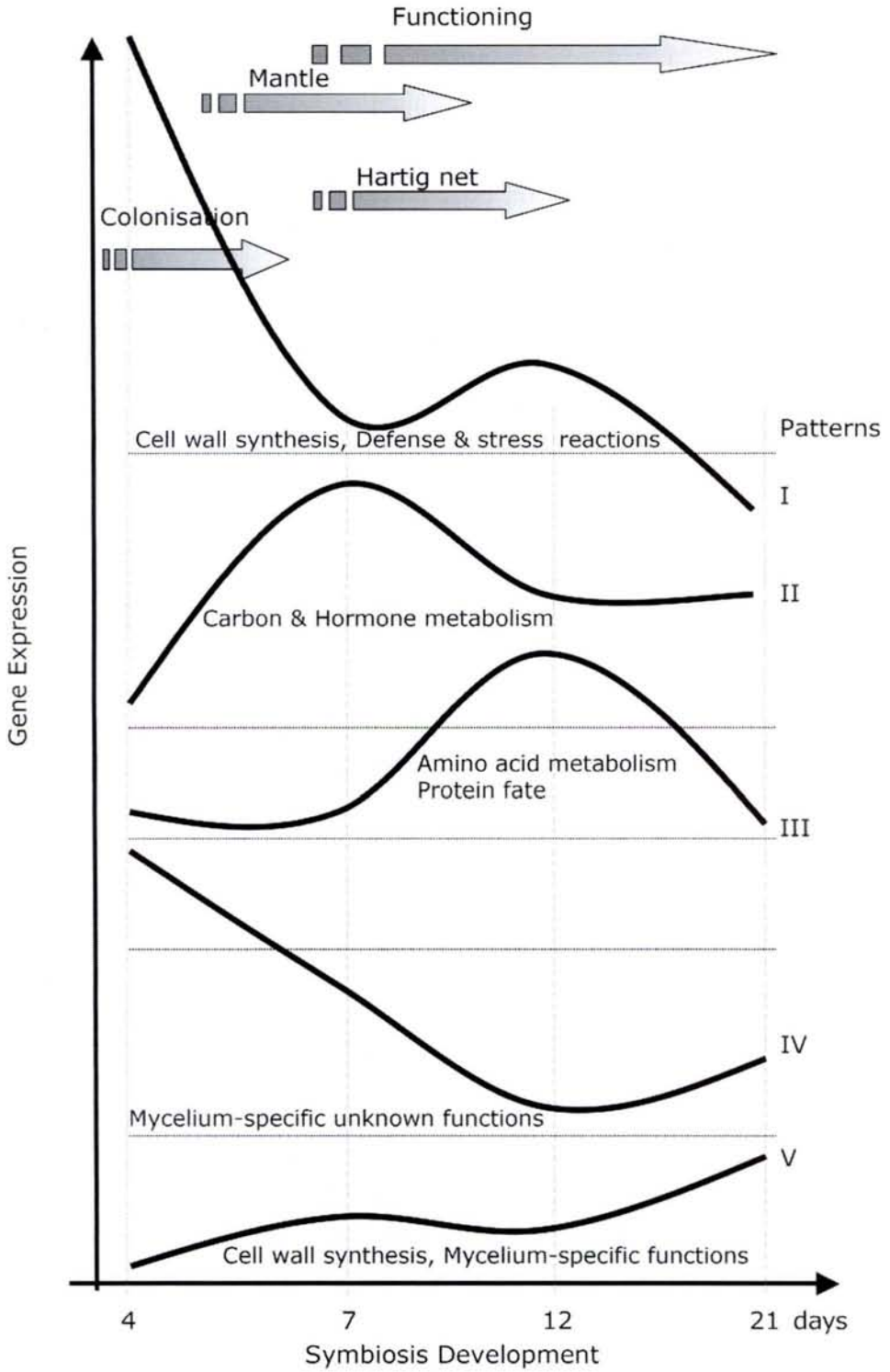


Fig 24 : Schéma décrivant les 5 groupes de gènes de champignons et de plantes ayant un profil d'expression commun au cours de l'ontogenèse ectomycorhizienne entre Eucalyptus et Pisolithus. D'après Duplessis et al. 2004.

2) *Un programme de mycorhization commun*

Une première étude réalisée par Voiblet et al. (2001) (Fig 23) portant sur 508 EST, a montré que 81% des transcrits présent dans l'ectomycorhize *d'Eucalyptus globulus / Pisolithus microcarpus* étaient **d'origine fongique**. Cette étude a permis de mettre en évidence 96 gènes régulés par la symbiose durant le développement du manteau ; un grand nombre de ces gènes correspond à des protéines pariétales fongiques (hydrophobines, SRAP32). Mais, aucun gène spécifique de la symbiose n'a été détecté.

L'étude du profil d'expression de 3555 gènes issus d'une banque d'ectomycorhize de *Paxillus involutus* / *Betula pendula* a montré que la symbiose modifiait l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme carboné et lipidique (Johansson et al. 2004). Malgré leur importance (en nombre), peu de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques ont montré une expression différentielle dans les tissus mycorhiziens. Par contre, plusieurs gènes connus pour intervenir dans la régulation de la croissance et du développement des racines et des hyphes, comme des facteurs de transcription et des Rho-like GTPases, semblent êtres régulés par la symbiose (Johansson et al. 2004).

Plus récemment, une cinétique d'expression des gènes durant la formation de l'ectomycorhize *Pisolithus microcarpus / Eucalyptus globulus* a confirmé l'existence de "groupes fonctionnels" impliqués dans le développement de la symbiose (Fig 24) (Duplessis et al. 2004). Les gènes issus de **familles multigéniques** comme les hydrophobines, les mannoprotéines SRAP 32 montrent un **profil d'expression similaire**: ces gènes sont stimulés 4 jours après contact entre les deux partenaires, lorsque l'apex racinaire est colonisé et que le manteau commence à se former, confirmant les études précédentes du profil d'expression des protéines et l'analyse d'EST de *Pisolithus* (Tagu et al. 1996, Laurent et al. 1999, Martin et al. 1999, Peter et al. 2003). Leur expression diminue ensuite et atteint un niveau « constitutif » durant la maturation de la mycorhize (Duplessis et al. 2004). Une analyse plus globale de l'expression de gènes au cours de la formation ectomycorhizienne *Eucalyptus/Pisolithus* montre que les changements d'expression ont lieu à plusieurs niveaux. D'une part, on observe une stimulation générale de la synthèse protéique fongique probablement nécessaire à l'intense division/ prolifération cellulaire qui a lieu au cours de l'ontogenèse ectomycorhizienne. D'autre part, on remarque une augmentation de l'accumulation de transcrits codant des protéines exprimées à la surface des cellules du champignon (hydrophobines, SRAP 32), probablement nécessaire à la formation du manteau et de l'interface symbiotique. Enfin, on assiste à une stimulation des réactions de défense et du métabolisme hormonal dans les racines colonisées (Duplessis et al. 2004).

En conclusion, quel que soit le stade ou le couple symbiotique étudié, **aucun gène spécifique** de la symbiose n'a été détecté (Voiblet et al. 2001, Johansson et al. 2004, Duplessis et al. 2004). Les différentes études réalisées sur différents couples symbiotiques (*Pisolithus / Eucalyptus* ; *Paxillus / Betula*) conduisent aux mêmes gènes régulés par la symbiose, d'où l'hypothèse de l'existence d'un **programme commun de régulation des différents systèmes ectomycorhiziens**. Ces changements d'expression, observés dans ces systèmes mycorhiziens (Voiblet et al. 2001, Johansson et al. 2004, Duplessis et al. 2004), ont lieu bien avant le stade "mycorhize fonctionnelle", et probablement même avant les premiers contacts physiques entre les deux partenaires. Ces changements sont certainement nécessaires à la **coordination entre les partenaires**. Il reste à **identifier des gènes impliqués** dans les stades très précoces avant les premiers contacts physiques entre les deux partenaires, lors des phases de reconnaissance, d'attraction et de préparation à l'adhésion. Ensuite les cascades d'évènements depuis l'émission de **signaux responsables** jusqu'aux conséquences physiologiques qu'ils induisent, devront êtres analysées.

V. Objectifs et modèles d'études

A. Identification de « molécules signal », de la racine vers le champignon

Hubert Lagrange, au cours de ses travaux de thèse, a montré que les exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus* induisent, comme en présence de la plante hôte, une sur-accumulation d'hypaphorine dans les hyphes de *Pisolithus microcarpus*. Il a extrait des exsudats et identifiée une molécule, la zéatine, qui ajoutée au milieu de culture mime partiellement l'activité des exsudats et induit une sur-accumulation d'hypaphorine, mais dans des proportions moindres que les exsudats. La zéatine ne serait donc pas la seule molécule exsudée par la plante possédant cette activité. Les exsudats racinaires seraient composés **d'un cocktail de molécules capables d'induire une telle accumulation d'hypaphorine dans les hyphes de *Pisolithus microcarpus*** (Lagrange et al. 2004). D'autres molécules **restaient à identifier.** Notre premier objectif a été d'identifier une ou plusieurs molécules capables d'induire une accumulation d'hypaphorine chez le Basidiomycète *Pisolithus microcarpus*.

Fig 25 : Boutures de *Populus tremula x Populus alba*, clone 717-1-B4 mycorhizées avec *Pisolithus microcarpus* - culture *in vitro*. Photo A. Jambois.

B. Identification de « molécules signal », du champignon vers la racine, des inhibiteurs compétitifs de l'activité auxinique

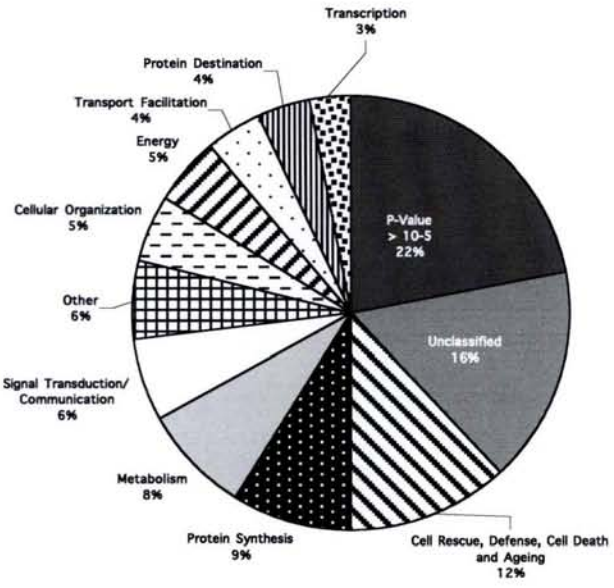
Comme nous l'avons vu au cours des paragraphes précédents, l'hypaphorine fongique semble jouer un rôle lors de l'établissement de l'ectomycorhize, notamment en modulant l'activité auxinique de la plante.

Si l'auxine fongique semble nécessaire à l'ontogenèse ectomycorhizienne, son activité doit probablement être régulée dans le temps et dans l'espace. À ce jour, s'il a été montré que l'AIA était synthétisé par de nombreux champignons ectomycorhiziens (Beyrle 1995), l'hypaphorine, quant à elle, n'a été détectée que dans les hyphes de *Pisolithus microcarpus* (Béguiristain et al. 1995). Il pourrait donc exister chez d'autres champignons ectomycorhiziens, non producteurs d'hypaphorine, des molécules possédant une activité semblable à celle de l'hypaphorine, c'est-à-dire des molécules qui réguleraient également l'activité auxinique et pourraient jouer un rôle dans l'ontogenèse ectomycorhizienne. **Les molécules recherchées pourraient appartenir, tout comme l'hypaphorine, au groupe des alcaloïdes indoliques.** Notre second objectif a été de vérifier cette hypothèse tout en explorant le ou les mécanismes qui permettent à l'hypaphorine de réguler l'activité auxinique. Pour cela, nous avons utilisé la plante modèle *Eucalyptus globulus,* avec laquelle la majorité des travaux sur l'hypaphorine ont été réalisée. L'*Eucalyptus* est un genre d'arbre originaire d'Australie, de la famille des Myrtacées, dont les diverses espèces sont adaptées aux climats équatorial, tropical et méditerranéen, ce qui en fait une des essences forestières de reboisement les plus courantes dans le monde. Son bois est très utilisé en papeterie. Sa manipulation "in vitro" est bien maîtrisée, et il possède une croissance rapide. Il peut contracter des endomycorhizes ou des ectomycorhizes. Par contre, la manipulation génétique de cet arbre n'a pas encore été rendue possible, et le séquençage de son génome n'est que très partiel.

C. Activité de l'hypaphorine fongique et de l'auxine sur l'expression de gènes d'une plante hôte, le peuplier

Les différentes cinétiques (Voiblet et al. 2001, Johansson et al. 2004, Duplessis et al. 2004) réalisées sur différents couples symbiotiques

A



B

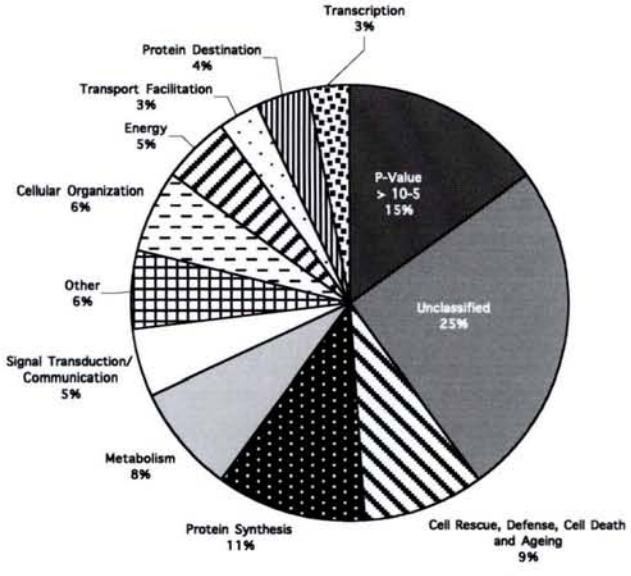


Fig 26 : Répartition des transcrits racinaires de *Populus trichocarpa x deltoïdes* par catégorie fonctionnelle. (A) 5943 ESTs de racines primaires et latérales et (B) 1070 ESTs de racines ayant subies un stress hydrique constituent la banque "peuplier" du laboratoire Interaction arbre/ micro-organismes. D'après Kohler et al. 2003.

(*Pisolithus/Eucalyptus* ; *Paxillus/Betula*) ont montré que des changements dans l'expression de gènes avaient lieu bien avant le stade "mycorhize fonctionnelle" ; les auteurs ont suggéré que ces changements pourraient avoir lieu avant les premiers contacts physiques entre les deux partenaires et que ces changements seraient nécessaires à la **coordination entre les partenaires**.

Si l'hypaphorine et l'auxine jouent un rôle au cours de l'ontogenèse, ils doivent induire des modifications du profil d'expression nécessaires à l'ontogenèse ectomycorhizienne. Notre objectif était d'**identifier des gènes régulés par la présence d'hypaphorine et / ou d'auxine,** de vérifier leur activité agoniste ou antagoniste et de tenter de comprendre les mécanismes aboutissant aux phénotypes observés chez la plante. Pour cela, nous avons utilisé des boutures de peuplier hybride "*Populus tremula x Populus alba*", clone 717-1-B4. Le peuplier est une espèce d'un grand intérêt économique et scientifique. La France est le premier producteur et exportateur de bois de peuplier en Europe. Le peuplier est un arbre de la famille des Salicacées, qui peut contracter des endomycorhizes et des ectomycorhizes (Fig 25) avec une faible spécificité d'hôte. Cet arbre possède de nombreux avantages : une propagation végétative aisée, une croissance rapide pour une espèce ligneuse (rotation de 15 ans pour certaines plantations de peuplier), un génome de petite taille qui vient d'être entièrement séquencé, et une transformation maîtrisée (notamment pour le clone que nous avons utilisé). Ces deux derniers avantages font de lui une espèce modèle en biologie forestière et plus particulièrement en biologie moléculaire ; d'autant qu'une banque de plus de 4000 EST (unigène) a été séquencée et est à notre disposition au sein du laboratoire "Interactions arbres/Micro-organismes" (Fig 26).

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

RÉSULTATS

I. Les jasmonates, un maillon dans le dialogue moléculaire ?

Résumé de l'article ci-joint : **Jasmonates, together with zeatin, control hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*.** (Article soumis pour publication)

La zéatine, une cytokinine contenue dans les exsudats racinaire de plantules d'eucalyptus stimule la production d'hypaphorine dans les hyphes de *Pisolithus microcarpus* (autrefois nommé *Pisolithus tinctorius* (Martin et al 2002)), mais dans une proportion moindre qu'en présence des exsudats racinaires. Une recherche bibliographique, nous a amené à nous intéresser aux Jasmonates. En effet, l'acide jasmonique tout comme la zéatine stimule la synthèse d'alcaloïde indolique (l'ajmalicine ou la serpentine) chez la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) (Rijhwani and Shanks 1998, Menke et al. 1999).

L'activité des jasmonates sur la synthèse d'hypaphorine dans les hyphes de *Pisolithus microcarpus* a été suivie, en présence ou non de zéatine. **L'acide jasmonique, tout comme le methyl jasmonate, stimule la production d'hypaphorine. Cette stimulation s'additionne avec celle induite par la présence de zéatine.**

L'acide jasmonique pourrait donc contribuer avec la zéatine, certaines étapes du dialogue moléculaire qui contrôlent le développement des ectomycorhizes. Le fait que la synthèse de jasmonates est induite au cours de la formation d'endomycorhizes entre *Glomus intraradices* et des racines d'orge (Hause et al. 2002) conforte cette hypothèse

Il a été rapporté par ailleurs qu'un apport d'acide jasmonique **favoriserait les premiers contacts entre les hyphes** *Pisolithus tinctorius* ou *Laccaria laccata* et les racines de *Picea abies* (Regvar et Gogala 1996, Regvar et al. 1997).

Les jasmonates et la zéatine contribueraient à maintenir les hyphes symbiotiques dans un état juvénile caractérisé, entre autre, par une teneur élevée en hypaphorine.

Anne Jambois . Frédéric Lapeyrie

Jasmonates, together with zeatin, control hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*

A. Jambois . F. Lapeyrie (✉)
Unité Mixte de Recherche INRA-UHP Interactions Arbres/Micro-organismes, Institut National de la Recherche Agronomique, F-54280 Champenoux, France
Tel: +33 3 83 39 40 78
Fax: +33 3 83 39 40 69
E-mail: lapeyrie@nancy.inra.fr

Summary

We have demonstrated that jasmonic acid and methyl jasmonate applications result in increased hypaphorine concentration in *Pisolithus microcarpus* hyphae. Both molecules, jasmonic acid and zeatin, appear to contribute additively to hypaphorine accumulation. Jasmonates have been reported to stimulate accumulation of indole alkaloids in plant cells as well, suggesting that common regulation pathways may be shared by plants and fungi. Jasmonates together with zeatin, identified in root exudates, transferred from roots to hyphae must contribute to induce hypaphorine over-accumulation in symbiotic hyphae. In return, fungal hypaphorine accumulating under zeatin and jasmonic acid control, was shown earlier to regulate auxin activity in host plant tissues during early stages of ectomycorrhiza ontogenesis. Jasmonates and zeatin may therefore contribute to some steps of molecular dialogue, which modulates the development of functional ectomycorrhizae. Both plant signals might contribute to maintain symbiotic hyphae in a characteristic juvenile stage.

Key words: jasmonic acid, cytokinin, hypaphorine, mycorrhiza, IAA.

Introduction

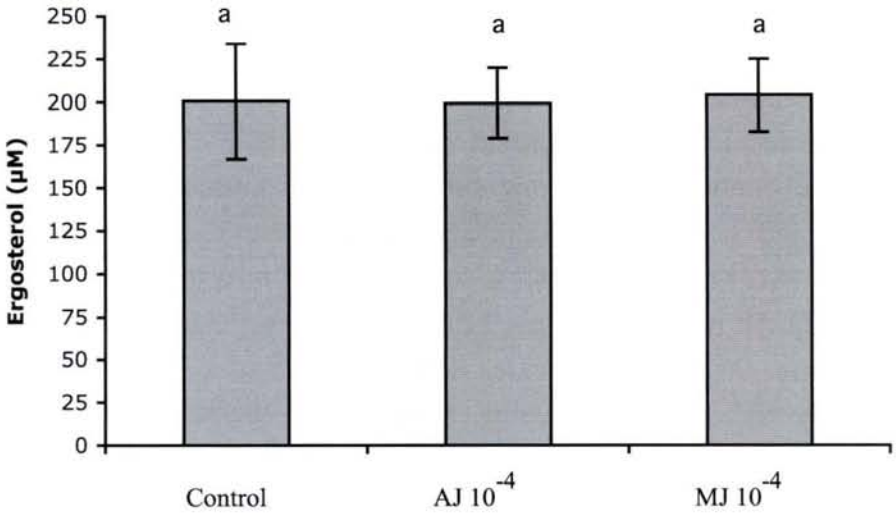
The establishment of ectomycorrhizal associations implies substantial reorganisation of root tissues, and modification of the hyphal growth pattern. This must require mutual recognition and dialogue between both symbiotic partners. Signalling molecules are exchanged at very early stages of the interaction, prior to any physical contact between symbionts. There is much evidence of spore germination and hyphal growth stimulation by host plant root exudates (Melin and Rama Das 1954; Fries et al. 1987; Fries 1988), and a case of chemotropism has been reported (Horan and Chilvers 1990). In forest soil, such activity on hyphal growth by root diffusible molecules could promote root fungus encounter and consequently mycorrhizal formation. Some active compounds are excreted by roots such as rutin (Lagrange et al. 2001) while others, such as cathechin (Koide et al. 1998), could be released by litter from the host tree. Active concentrations of these signalling compounds can be as low as nanomolar or even picomolar for rutin (Lagrange et al. 2001). We recently reported that zeatin, a cytokinin, present in *E. globulus* root exudates, mimicked root exudates activity on hyphal branching as well as on hyphal hypaphorine accumulation (Lagrange et al. 2004).

Hypaphorine is an indole alkaloid, accumulated by *Pisolithus microcarpus* hyphae in response to root contact (Béguiristain and Lapeyrie 1997) that subsequently regulates root hair elongation and auxin activity in host plant tissues (Ditengou and Lapeyrie 2000; Ditengou et al. 2000; Kawano et al. 2002; Ditengou et al. 2003; Jambois et al. 2004). Hypaphorine is the first-identified fungal molecule regulating expression of symbiosis-related genes in host plant roots (Nehls et al. 1998; Tagu et al. 2003).

Considering, (i) that fungal hypaphorine accumulation is under zeatin control, (ii) that together with zeatin, jasmonic acid was reported to enhance indole alkaloid accumulation by periwinkle (*Catharanthus roseus)* hairy root culture or suspension-cultured cells (Rijhwani and Shanks 1998, Menke et al. 1999), here we investigated the activity of jasmonates on hypaphorine accumulation by fungal hyphae looking for synergy between jasmonates and zeatin.

Jasmonates (JAs), including jasmonic acid (JA) and methyl jasmonate (MeJA) act as plant hormones by regulating developmental processes and responses to environmental cues. These include root growth, pollen development, abscission, senescence, or responses to wounding and UV irradiation (Creelman and Mullet 1995, 1997; Farmer 1994; Reymond and Farmer 1998). Since jasmonates induce plant defence responses against pathogens (Reymond and Farmer 1998) or

A



B

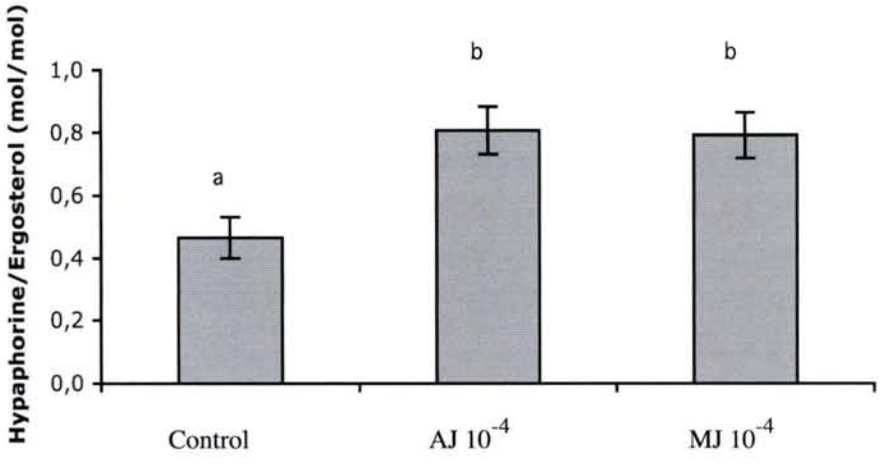


Fig. 2 Activities of jasmonic acid and methyl jasmonate 100 μM on *Pisolithus microcarpus* in pure culture. (A) Biomass of colonies in pure culture evaluated by ergosterol concentration in extracts. (B) Hypaphorine concentration in hyphae related to ergosterol content (mol.mol^{-1} ergosterol). Means of 7 replicates ± SD, compared by the t-test (P = 0.05); different letters above columns indicate significantly different means.

herbivorous insects (Creelman et al. 1992), and since methyl jasmonate is a strong candidate molecule for airborne signals that mediate interplant communication in response to aggressions (Farmer and Ryan 1990), here, we assumed that jasmonates might contribute as well to the molecular dialogue between host plant and fungus regulating ectomycorrhiza ontogenesis.

Materials and Methods

Biological material and growth conditions

The strain 441 of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*, was isolated from a sporocarp collected under *Eucalyptus citriodora* in Brazil (at Sao Paulo, by M. Ivory). Glass flasks were filled with 10 ml of low-sugar modified Pachlewski liquid medium (KH_2PO_4, 7.3 mM; ammonium tartrate, 2.7 mM; $MgSO_4.7H_2O$, 7.3 mM; glucose, 100 mM; bacteriological malt extract Difco, 3 g l^{-1}; thiamine-HCl, 9 mM; trace element stock solution (Kanieltra Co.), 0.1 ml l^{-1}) possibly supplemented by jasmonic acid or methyl jasmonate (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}M, final concentration), or zeatin (10^{-6} M, final concentration) solutions sterilised by filtration, and inoculated with *Pisolithus microcarpus* agar plugs (one plug per flask). After 2 weeks, colony ergosterol content and hypaphorine concentration were assessed. Seven replicate colonies were analysed per treatment.

Hypaphorine and ergosterol quantification in fungal colonies

Each colony was collected, quickly dried on absorbent paper and homogenised in methanol (400 µl) in an Eppendorf tube. Following sonication (10 min) and centrifugation (10 min, 10 000 rpm), supernatants were analysed by HPLC. To quantify simultaneously hypaphorine and ergosterol, a protocol was developed combining previously reported methods for ergosterol (Martin et al. 1990) or hypaphorine (Béguiristain et al. 1995) purification. HPLC analyses were performed with a Beckmans System Gold including a binary pump and a Thermo Quest automatic injector (20 µl). The instrument was equipped with a UV detector, a data processing station, and fitted with a 250x4 mm C18 end-capped ODS AQ YMC 5 µm column (Interchim). Hypaphorine (retention time: 11 min) and ergosterol (retention time: 25 min) were eluted (flow rate: 1ml min^{-1}) by a gradient of two solvents, A (H_2O 100%) and B (methanol 100 %). The initial conditions were 85 % A + 15 % B, the next step (30 % A + 70 % B) was reached in 11min, the last step (100 % B) was reached in 4 min and maintained for 13 min. Compounds were identified and quantified by comparison with standards. Ergosterol was purchased from Sigma and hypaphorine chemically synthesized according to Romburgh and Barger (1911).

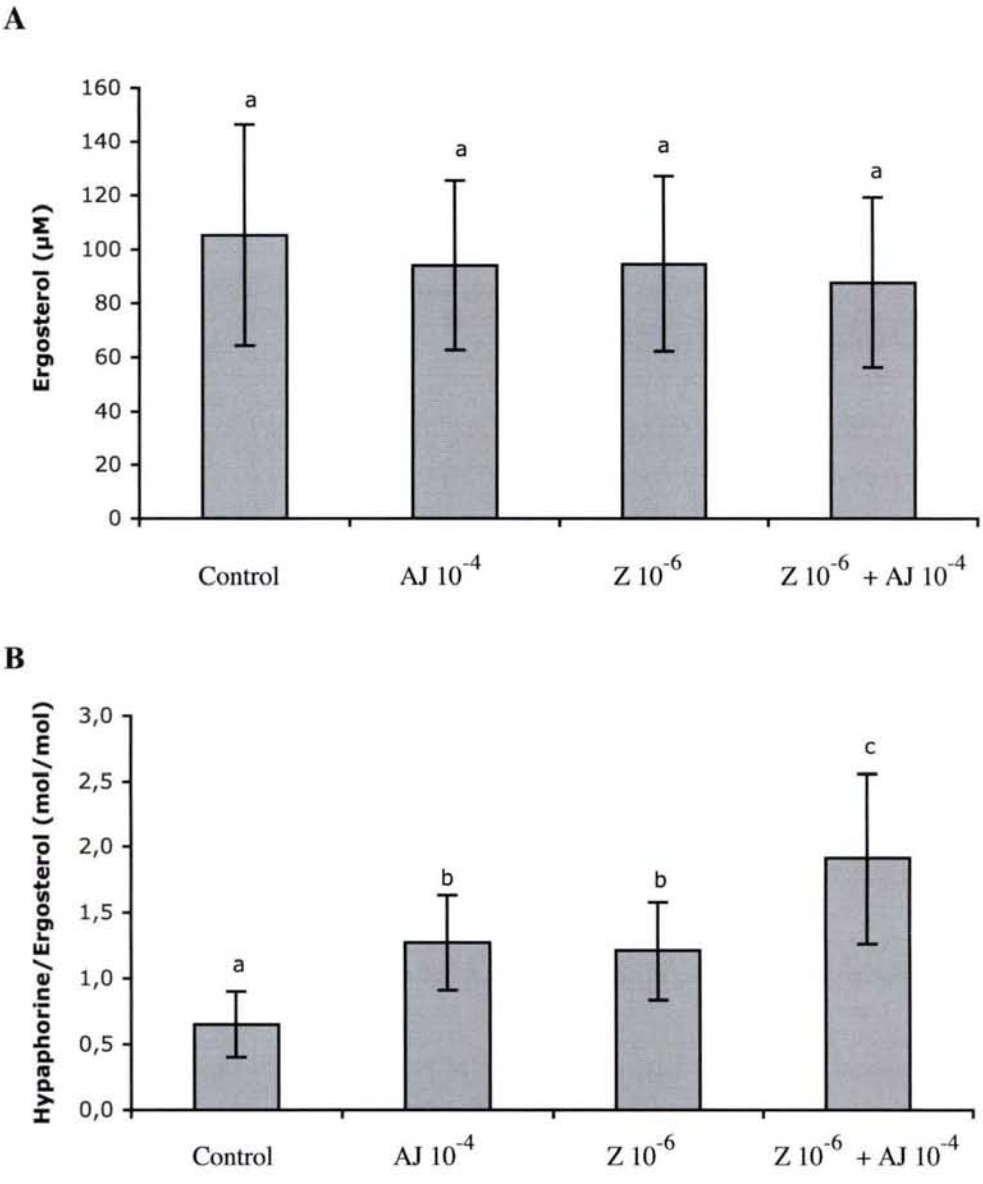


Fig. 3 Activities of jasmonic acid (100 μM) and zeatin (1 μM) on *Pisolithus microcarpus* in pure culture. (A) Biomass of colonies in pure culture evaluated by ergosterol concentration in extracts. (B) Hypaphorine concentration in hyphae related to ergosterol content (mol.mol^{-1} ergosterol). Means of 7 replicates ± SD, compared by the t-test (P = 0.05); different letters above columns indicate significantly different means.

Results

Fungal hypaphorine accumulation in response to jasmonic acid and methyl jasmonate

Jasmonic acid (10^{-7}-10^{-4} M) did not significantly affect *Pisolithus microcarpus* hyphal growth (assessed by ergosterol accumulation) on malt enriched nutrient medium (Fig. 1a). However, jasmonic acid 10^{-4} M induced a strong increase (2 fold) of hypaphorine concentration in hyphae (mol of hypaphorine per mol of ergosterol) (Fig. 1b). Comparison of jasmonic acid and methyl jasmonate activities showed that they were identical at the same optimal concentration tested, 10^{-4} M (Fig. 2).

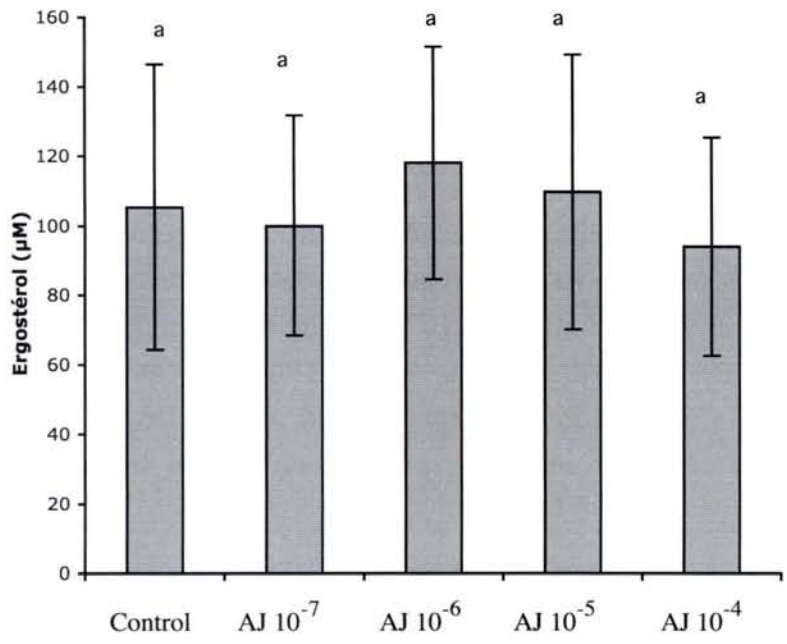
Additivity of zeatin and jasmonic acid activities

Neither zeatin (10^{-6} M, the optimal concentration previously reported by Lagrange et al. 2004) nor a combination of zeatin (10^{-6} M) and jasmonic acid (10^{-4} M) significantly affected *Pisolithus microcarpus* hyphal growth (Fig. 3a). In agreement with earlier results (Lagrange et al. 2004); zeatin (10^{-6} M) stimulated hypaphorine accumulation by 2 fold as for jasmonic acid (10^{-4} M) (Fig 3b). When zeatin (10^{-6} M) and jasmonic acid (10^{-4} M) were supplied simultaneously, hypaphorine accumulation was stimulated by 3 fold (Fig. 3b).

Discussion

The role of jasmonates during plant responses to woundings and pathogen attacks is well established (Wasternack and Hause 2002). While molecular signalling during mycorrhizal interactions is poorly understood, the involvement of jasmonic acid has been suggested. Jasmonic acid treatment accelerated the fastening of *Pisolithus tinctorius* or *Laccaria laccata* hyphae to *Picea abies* roots (Regvar and Gogala 1996; Regvar et al. 1997). The accumulation of secondary metabolites can be induced in non-mycorrhizal barley roots by jasmonate treatments as well as during arbuscular mycorrhizal colonisation (Peipp et al. 1997). The biosynthesis of jasmonate in mycorrhizal barley roots is induced by *Glomus intraradices* (Hause et al. 2002). The present data provide further evidence. Jasmonates, just as *Eucalyptus globulus* root exudates or zeatin, a cytokinin present in root exudates of that host plant (Lagrange et al. 2004), stimulate hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*.

A



B

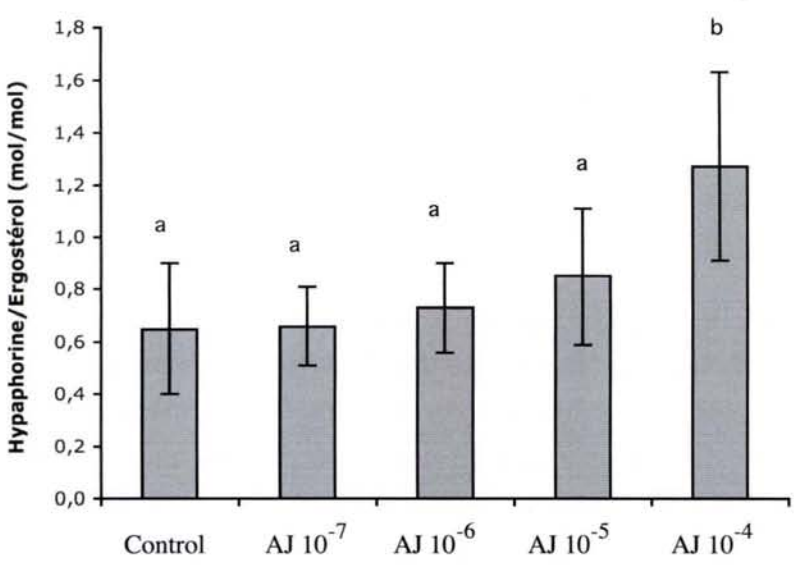


Fig. 1 Activity of jasmonic acid (0,1-100 μM) on *Pisolithus microcarpus* in pure culture. (A) Biomass of colonies in pure culture estimated by ergosterol concentration in extracts. (B) Hypaphorine concentration in hyphae related to ergosterol content (mol.mol^{-1} ergosterol). Means of 7 replicates ± SD, compared by t-test (P = 0.05); different letters above columns indicate significantly different means.

The activities of jasmonic acid and zeatin on accumulation of indole alkaloids, ajmalicine and serpentine, in periwinkle hairy root or cell cultures were reported earlier (Decendit et al. 1992; Garnier et al. 1996; Rijhwani and Shanks 1998; Menke et al. 1999), suggesting that common regulation pathways might be involved in some plants and fungi.

Since zeatin mimics the activity of *E. globulus* ssp *bicostata* roots (Béguiristain and Lapeyrie 1997) and root exudates on *Pisolithus microcarpus* hyphae hypaphorine accumulation (Lagrange et al. 2004). It has been proposed that zeatin from root exudates contributes to some steps of functional ectomycorrhiza development. However, the amount of zeatin provided as root exudates was not sufficient to induce the full response observed over agar supplemented with root exudates (Lagrange et al. 2004). This suggested then that root exudates may be regarded as a cocktail of active molecules. Considering the activity of jasmonates on hypaphorine accumulation and the additivity of zeatin and jasmonate activities we assume that jasmonates could be a component of that active molecule cocktail.

While jasmonic acid and zeatin transferred from roots to colonizing hyphae might contribute to induce hypaphorine accumulation in hyphae, in return, fungal hypaphorine should regulate auxin activity in plant tissues during early stages of ectomycorrhiza ontogenesis (Nehls et al. 1998; Ditengou and Lapeyrie 2000; Ditengou et al. 2000; Kawano et al. 2002; Ditengou et al. 2003). As for previously described elicitor/chitinase interactions (Salzer et al. 1997), these jasmonate-zeatin/hypaphorine steps might be regarded as elements of the molecular dialogue between plant and ectomycorrhizal fungus. The fluxes of jasmonate and hypaphorine between symbionts still remain to be quantified.

Pisolithus microcarpus growth (estimated as ergosterol content) what not affected by jasmonic acid, methyl jasmonate or zeatin. Hypaphorine accumulation in hyphae could be regarded as a juvenility character since high hypaphorine concentrations have been detected (i) in hyphal tips (the outer 2 mm of the colony) (Béguiristain and Lapeyrie 1997), (ii) as well as in root colonizing hyphae whose juvenile stage has been repetitively attested by ultrastructural investigations (Dexheimer and Pargney 1991; Kottke and Oberwinkler 1986). Thus, root diffusible molecules, such as zeatin and jasmonates, might maintain the juvenility of symbiotic hyphae, characterized by high hypaphorine concentration.

Acknowledgements

The authors are grateful to Pr Claude Selve, Dr Christine Gerardin and Joëlle Gérard (Université Henri Poincaré, France) for helping to synthesize hypaphorine, and to Sophie Kotowski for helpful technical contribution.

References

Béguiristain T, Coté R, Rubini P, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (1995) Hypaphorine accumulation in the hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry 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

Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 89: 4938-4941

Creelman RA, Mullet JE (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4114-4119

Creelman RA, Mullet JE (1997) Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 355-381

Decendit A, Liu D, Ouelhazi L, Doireau P, Merillon JM, Rideau M (1992) Cytokinin-enhanced accumulation of indole in *Catharanthus roseus* cell cultures - the factors affecting the cytokinin response. Plant Cell Rep 11: 400-403

Dexheimer J, Pargney JC (1991) Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. Experientia 47: 312-321

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 Microb Interact 13: 151-158

Ditengou FA, Beguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211: 722-728

Ditengou FA, Raudaskoski M, Lapeyrie F (2003) Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp bicostata root hairs. Planta 218: 217-225

Farmer EE, Ryan CA (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7713-7716

Farmer EE (1994) Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. Plant Mol Biol 26: 1423-37

Fries N, Serck-Hanssen K, Dimberg LH, Theander O (1987) Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). Exp Mycol 11: 360-363

Fries N (1988) Specific effects of diterpene resin acids on spore germination of ectomycorrhizal basidiomycetes. Experientia 44: 1027-1030

Garnier F, Carpin S, Label P, Creche J, Rideau M, Hamdi S (1996) Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light-inducible *ipt* gene. Plant Sc 120: 47-55

Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. Plant Physiol 130: 1213-1220

Horan DP, Chilvers GA (1990) Chemotropism: the key to ectomycorrhizal formation? New Phytol 116: 451-458

Jambois A, Ditengou FA, Kawano T, Delbarre A, Lapeyrie F (2004) The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid-specific competitors which do not alter auxin transport. Physiol Plantarum 120: 501–508

Kawano T, Kawano N, Lapeyrie F (2002) A fungal auxin antagonist, hypaphorine prevents the indole-3-acetic acid-dependent irreversible inactivation of horseradish peroxidase: inhibition of Compound III-mediated formation of P-670. Biochem and Biophys Res Com 294: 553-559

Koide R T, Suomi L, Stevens C M, McCormick L (1998) Interactions between needles of *Pinus resinosa* and ectomycorrhizal fungi. New Phytol 140: 539-547

Kottke I, Oberwinkler F (1986) Mycorrhiza of forest trees, structure and function. Trees 1: 1-24

Lagrange H, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. New Phytol 149: 349-355

Lagrange H, Jambois A, Lapeyrie F (2004) Zeatin, a cytokinin from *Eucalyptus* seedling root exudates, controls hyphal branching and hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. Submitted

Martin F, Delaruelle C, Hilbert JL (1990) An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. Mycol Res 94: 1059-1064

Melin E, Rama Das VS (1954) Influence of root-metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. Physiol Plantarum 7: 851-858

Menke FL, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, and Memelink J (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid byosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. Plant Physiol 119: 1289-1296

Nehls U, Béguiristain T, Ditengou FA, 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

Peipp H, Maier W, Schmidt J, Wray V, Strack D (1997). Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. Phytochemistry 44: 581-587

Regvar M, Gogala N (1996) Changes in root growth patterns of (*Picea abies*) spruce roots by inoculation with an ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and jasmonic acid treatment. Trees 10: 410-414

Regvar M, Gogala N, Znidarsac N (1997) Jasmonic acid affects mycorrhization of spruce seedlings with *Laccaria laccata*. Trees 11: 511-514

Reymond P, Farmer EE (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. Curr Opin Plant Biol 1: 404-411

Rijhwani SK, Shanks JV (1998) Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. Biotechnol Prog 3: 442-449

Romburgh PV, Barger G (1911) Preparation of the betaine of tryptophane and its identity with the alkaloid hypaphorine. J Chem Soc 99: 2068-2070

Salzer P, Hebe G, Hager A (1997) Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K+ and Cl- release, extracellular alkalinization and H_2O_2 synthesis of *Picea abies* cells. Planta 203: 470-479

Tagu D, Palin B, Balestrini R, Gelhaye E, Lapeyrie F, Jacquot JP, Sautière P, Bonfante P, Martin F (2003) Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-*S*-transferase from *Eucalyptus globulus* roots. Plant Physiol Biochem 41: 611–618

Wasternack C, Hause B (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 72: 165-221

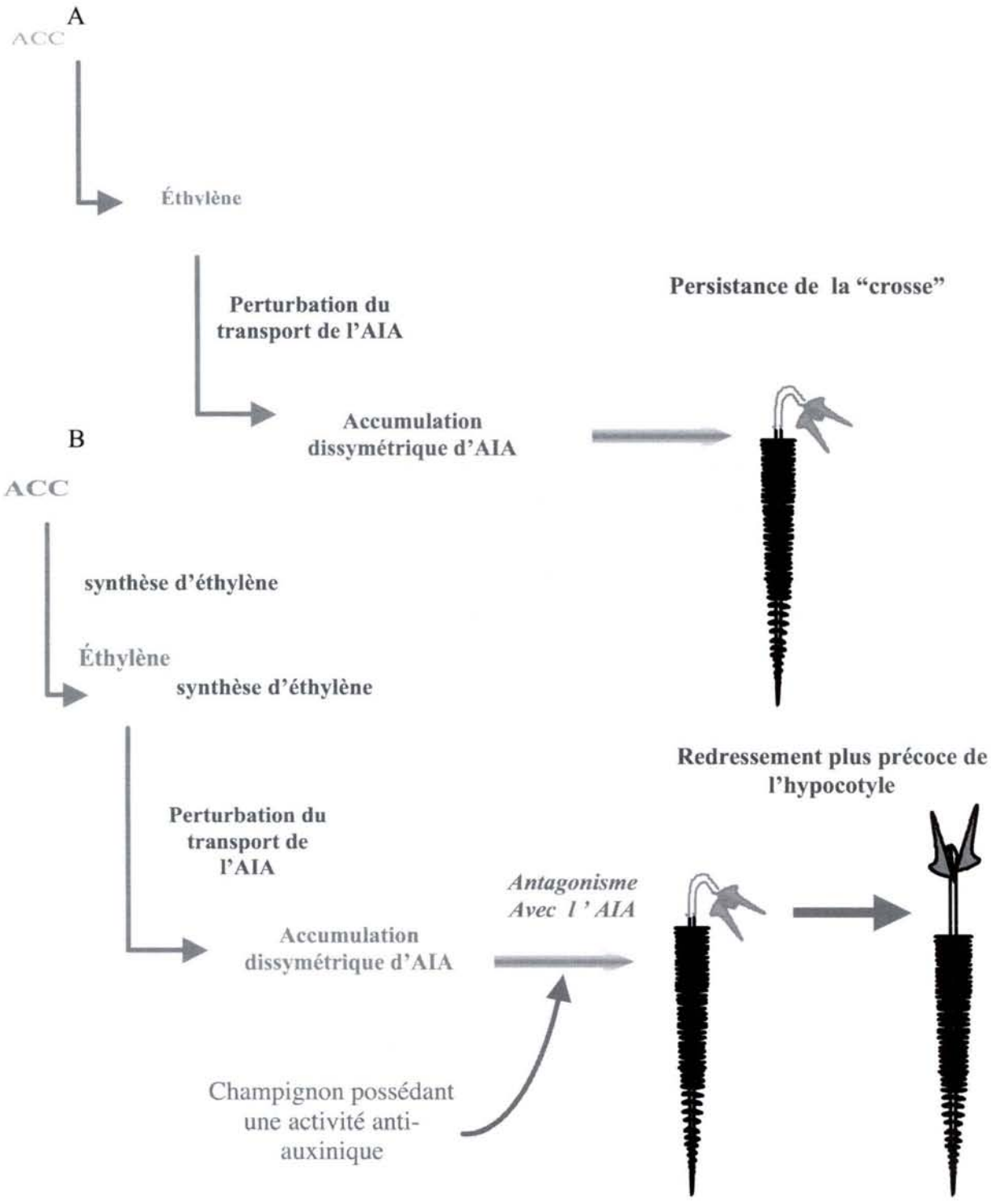


Fig 1 : Principe du "test ACC". Le champignon qui possède une activité anti-auxinique va permettre un redressement plus rapide des hypocotyles d'*Eucalyptus globulus* cultivés en présence d'ACC (précurseur de l'éthylène)

II. L'activité anti-auxinique de Pisolithus et de l'hypaphorine : s'agit-il d'un modèle transposable à d'autres espèces fongiques ?

Les travaux de Ditengou ont montré que l'hypaphorine fongique pouvait jouer un rôle lors de l'établissement de l'ectomycorhize, en régulant l'activité de l'AIA endogène ou exogène dans les tissus de la plante, notamment dans les poils absorbants. Cependant, à ce jour il n'a pas été détecté d'hypaphorine dans les hyphes de champignons ectomycorhiziens autre que *Pisolithus microcarpus* (Béguiristain et al. 1995). Nous avons donc, émis l'hypothèse, qu'il existait d'autres molécules, synthétisées par les champignons ectomycorhiziens, non producteurs d'hypaphorine, ayant une activité semblable à celle de l'hypaphorine et pouvant donc jouer un rôle identique lors de l'établissement de l'ectomycorhize. Les molécules recherchées pourraient appartenir, tout comme l'hypaphorine, au groupe des **alcaloïdes indoliques**.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que d'autres champignons ectomycorhiziens, non producteur d'hypaphorine possédaient une activité anti-auxinique comparable à celle de *Pisolithus microcarpus*.

A. Activité anti-auxinique de champignons ectomycorhiziens, résultats préliminaires

1) Matériels et méthodes

Afin de tester l'activité anti-auxinique de différentes souches de champignons ectomycorhiziens ou des extraits acellulaires préparés à partir de celles-ci, nous avons utilisé la propriété que possède l'éthylène, fourni sous forme d'ACC (acide carboxylique 1-aminocyclopropane, un précurseur de la synthèse d'éthylène dans les plantes), de perturber le transport basipète de l'AIA endogène. En perturbant le transport auxinique, l'éthylène maintient ainsi une accumulation dissymétrique d'AIA dans l'hypocotyle (Goeschl et al. 1967, Smalle et Van Der Straeten 1997). Il en résulte une croissance différentielle des cellules, provoquant la formation d'une "crosse" caractéristique. Cette crosse se maintiendra plusieurs jours, avant que l'hypocotyle s'allonge à la lumière.

Nous avons donc suivi le redressement des hypocotyles de plantules d'*Eucalyptus globulus* cultivées en présence d'ACC (0, 10 µM) et de

Tab 1 : Activité de différentes souches de champignons ectomycorhiziens sur le redressement des hypocotyles d'*Eucalyptus globulus ssp bicostata* en présence d'ACC. (observations qualitatives).

souches fongiques	capacité à redresser les hypocotyles en présence d'ACC
Cennococum geophylum	++
Paxillus involutus Boux	++
Paxillus involutus Cou	++++
Pisolithus tinctorius 2144	+++
Suillus bovinus	+
Suillus luteus	-

Le nombre de "+" est proportionnel au nombre d'hypocotyles redressés, 7 jours après mise en germination des graines

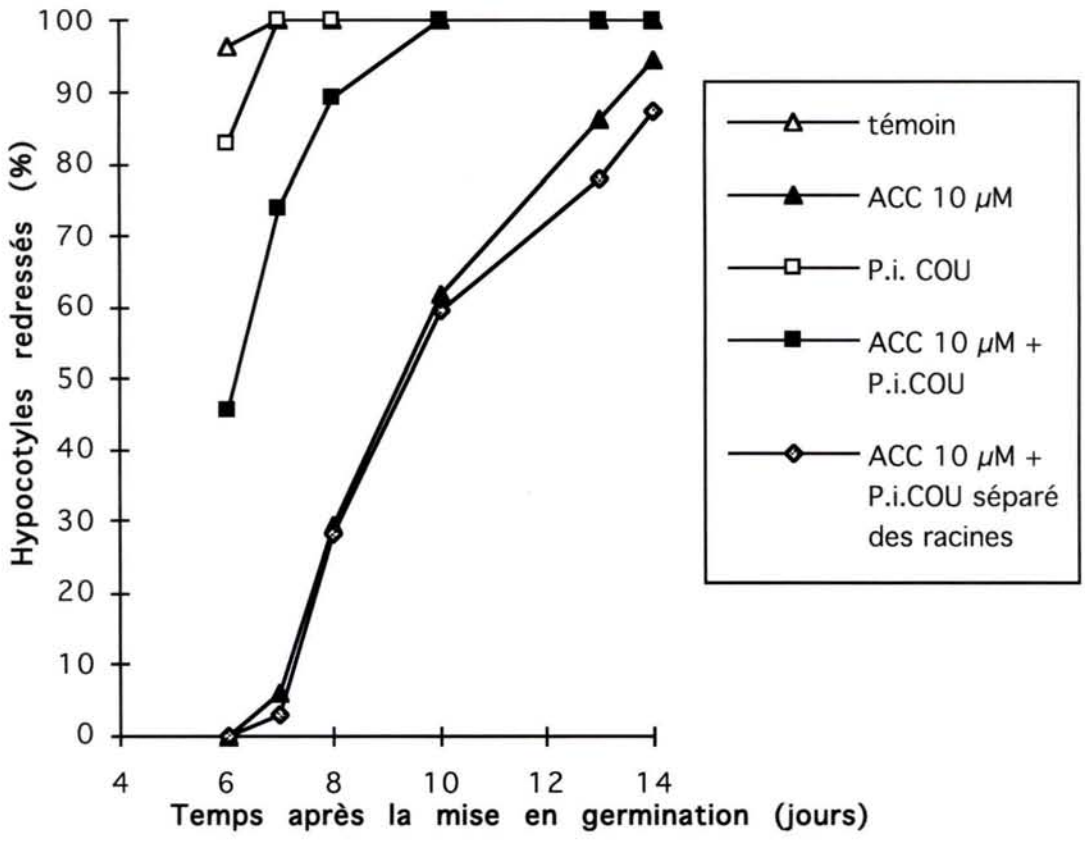


Fig 2 : Activité de *Paxillus involutus* Cou sur le redressement des hypocotyles d'*Eucalyptus globulus ssp bicostata* cultivés en présence d'ACC. (% d'hypocotyles redréssés, $n \geq 30$).

souches de champignons ectomycorhiziens non producteur d'hypaphorine. Six souches conservées dans la mycothèque du laboratoire ont été utilisées : *Cenoccocum geophillum* souche Nancy, *Suillus bovinus* souche LED 1, *Suillus luteus* souche SL 001, *Paxillus involutus* souche BOUX, *Paxillus involutus* souche COU, *Pisolithus microcarpus* souche 2144. Seules deux de ces souches, deux basidiomycètes, ont été isolées à partir de carpophores récoltés sous *Eucalyptus* : *P. involutus* COU et *P. microcarpus* souche 2144, respectivement en France et en Australie.

Le protocole utilisé est identique à celui utilisé pour déterminer l'activité anti-auxinique de *Pisolithus microcarpus* décrit par Ditengou et Lapeyrie (2000). En bref, pour chaque souche testée, 4 implants fongiques ont été déposés dans la partie basale des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé éventuellement enrichi en ACC (10 µM). Les colonies, séparées du milieu gélosé par une membrane de cellophane traitée à l'EDTA (0,37g/l) ont été incubées à 25°C dans l'obscurité. Lorsque les colonies ont atteint une taille d'environ 3 cm de diamètre, les graines d'eucalyptus ont été déposées comme précédemment sur une ligne médiane de façon à ce que les racines entrent rapidement en contact avec le mycélium (dès le troisième jour après la mise en germination). Les plantes témoins sont cultivées de la même manière en l'absence de champignon. De plus, afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le champignon pourrait avoir une activité anti-éthylène par l'intermédiaire d'une substance volatile telle que le CO_2, les colonies fongiques d'un second traitement témoin, ont été séparées des plantes par une tranchée dans l'agar, évitant ainsi tout contact entre les hyphes et les racines.

L'activité anti-auxinique d'extraits acellulaires fongiques de *Paxillus involutus* Cou a été appréciée. Ces extraits ont été préparés à partir de colonies de *Paxillus involutus* Cou cultivées pendant 3 semaines à 25°C en milieu liquide (Pachlewski modifié) dans un pilulier contenant 20 ml de milieu autoclavé. Environ 100 mg PF de mycélium ont été broyés dans un mortier, en présence d'azote liquide et repris dans de l'eau ultra-pure (Millipore®) (200 µl pour 30 mg). Après homogénéisation par sonication puis centrifugation (12 000 rpm pendant 5 minutes), le surnageant a été récupéré, utilisé extemporanément ou conservé à -20°C. Lors du traitement, les extraits fongiques ont été stérilisés par filtration (0,2 µM) et déposés directement à la surface du milieu gélosé enrichi en ACC. Afin de diminuer la quantité d'extrait fongique nécessaire, le volume du milieu gélosé a été réduit ; en éliminant, après solidification, l'agar dans la moitié supérieure de la boîte. L'extrait, produit à partir de 300 mg de mycélium âgé de 3 semaines a été appliqué sur chaque demi-disque de milieu gélosé restant (25 ml) contenant de l'ACC (10 µM) avant dépôt des graines. Un volume identique d'eau distillée stérile a été déposé à la surface des milieux témoins.

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

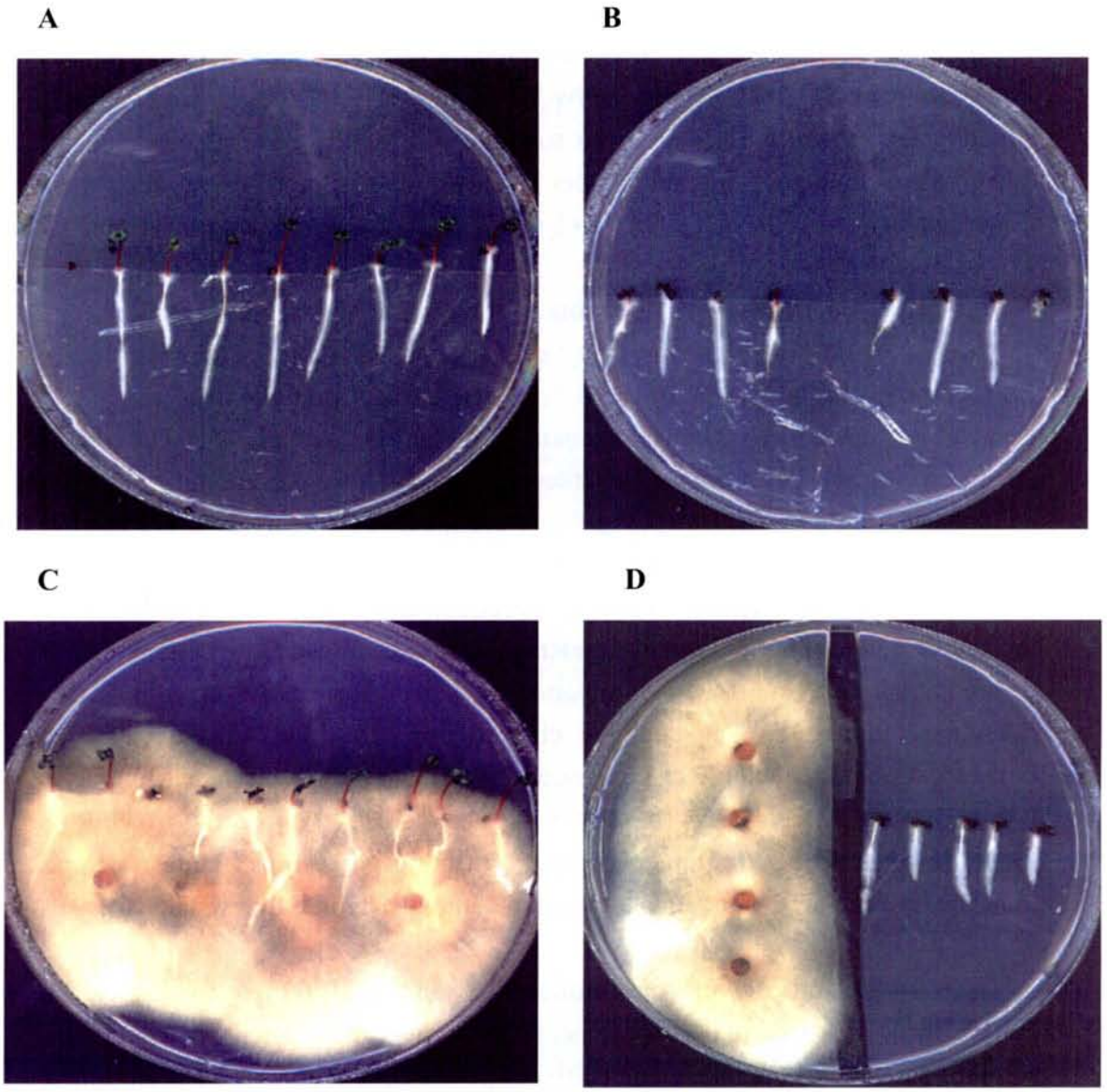


Fig 3 : Activité de *Paxillus involutus* Cou (*P.i.* COU) sur le redressement des hypocotyles d'*Eucalyptus globulus ssp bicostata* cultivés en présence d'ACC.(A) plants cultivés sur milieu témoin, (B) en présence d'ACC, (C) en présence d'ACC et de *P.i.*COU au contact des racines, (D) en présence d'ACC et de *P.i.*COU séparé des racines par une tranche dans l'Agar.

2) *Résultat : activité comparée de plusieurs souches*

Au cours d'une étude préliminaire, six souches appartenant à 5 espèces ont été comparées. En présence d'ACC dans le milieu de culture, le redressement des hypocotyles de jeunes plantes dont la racine est au contact des colonies fongiques, a été suivi au cours du temps. Une première expérience, réalisée une seule fois, indique que cinq souches sur les six souches testées permettent un redressement plus rapide des hypocotyles en présence d'ACC (Tab. 1). Toutes les souches testées ne semblent pas posséder la même activité, *Paxillus involutus* COU (Pi COU) semble être la plus active. Cette souche a donc été retenue pour la suite de notre étude.

a) *Activité de Paxillus involutus COU*

Les hypocotyles des plants d'eucalyptus cultivés sur milieu témoin dépourvu d'ACC, sont tous (100 %) redressés 7 jours après mise en germination des graines (Fig. 2, 3 A). Il en va de même lorsque les plantes sont cultivées en présence de colonies de *P. involutus* COU sur ce même milieu témoin (Fig.2).

Un apport d'ACC 10 µM dans le milieu de culture retarde le redressement des hypocotyles, après 7 jours seuls 6 % des hypocotyles sont redressés (Fig. 2, 3 B). Par contre la présence de colonies de *P. involutus* COU au contact des racines sur un milieu nutritif contenant 10 µM d'ACC induit un redressement plus précoce des hypocotyles, 74 % des hypocotyles sont redressés après 7 jours (Fig. 2, 3 C). Alors que les racines sont colonisées par les hyphes aucune mycorhize n'a été observée dans les conditions expérimentales présentes. Ce redressement précoce n'est pas dû à la libération par le champignon d'un gaz dans l'atmosphère confinée de la boîte de Pétri. En effet, lorsque le champignon est séparé des plantes par une tranchée dans l'Agar et que les racines ne sont donc plus en contact avec les hyphes de *P. involutus* COU, 7 jours après mise en germination, seuls 3 % des hypocotyles sont redressés (Fig. 2, 3 D).

b) *Activité de l'extrait acellulaire de* Paxillus involutus *COU*

En vue d'identifier la ou les molécules actives, l'activité de l'extrait acellulaire de *P. involutus* COU en présence d'ACC a été vérifié. L'extrait acellulaire est appliqué à la surface de l'agar avant la mise en germination des graines.

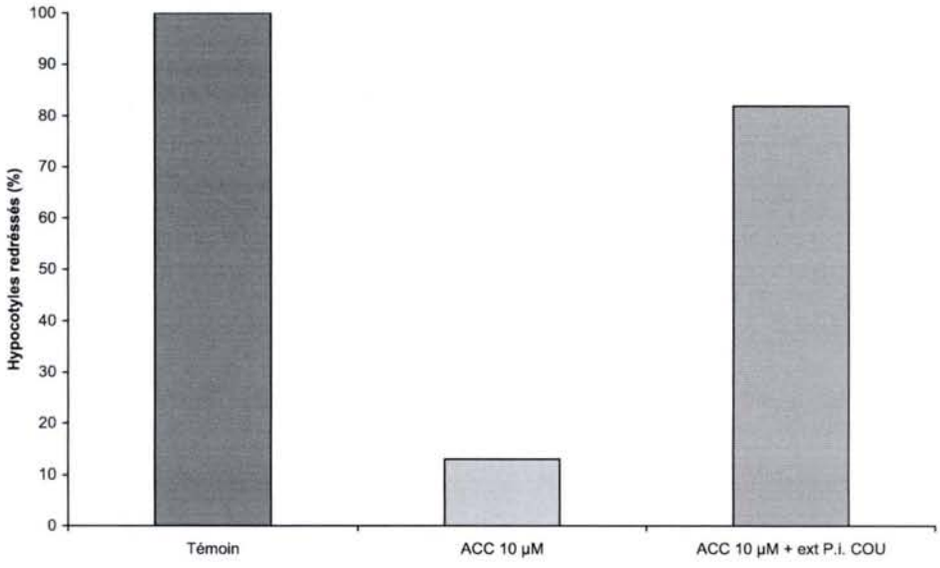


Fig 4 : Activité de l'extrait acellulaire de*Paxillus involutus* COU sur le redressement des hypocotyles d'*Eucalyptus globulus ssp bicostata* en présence d'ACC, 7 jours après la mise en germination. (%, $n \geq 37$).

Sept jours après mise en germination des graines d'eucalyptus, 100 % des hypocotyles sont redressés dans les boîtes témoins (Fig. 4). Seulement 13 % le sont en présence d'ACC 10 µM. L'apport de l'extrait acellulaire de *P. involutus* COU sur le milieu contenant de l'ACC permet le redressement plus précoce des hypocotyles. Après 7 jours 82 % des hypocotyles sont redressés (Fig. 4).

L'extrait acellulaire de *P. involutus* COU possédant une activité en présence d'ACC, la purification de molécules actives a été entreprises mais s'est révélée infructueuse. Ne parvenant pas à purifier de molécules actives, nous avons orienté notre recherche en direction d'alcaloïdes indoliques connus.

B. Les alcaloïdes indoliques, brucine, yohimbine, et l'hypaphorine: des compétiteurs spécifiques de l'AIA qui n'inhibent pas le transport auxinique

Résumé de l'article ci-joint: **The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid specific competitors which do not alter auxin transport.** (Physiologia Plantarum 120: 501–508. 2004)

L'activité anti-auxinique de deux autres alcaloïdes indoliques, la brucine et la yohimbine a été étudiée, avec les mêmes biotests que ceux utilisés par Ditengou et Lapeyrie (2000) pour démontrer l'activité anti-auxinique de l'hypaphorine. Le mode d'interaction entre ces 3 alcaloïdes et l'AIA a ensuite été étudié à l'aide d'un test emprunté à l'enzymologie : l'analyse de Lineweaver-Burk.Enfin, l'activité de ces alcaloïdes sur la régulation du transport auxinique a été analysée.

La brucine et la yohimbine, tout comme l'hypaphorine, restaurent l'allongement des pivots d'eucalyptus inhibés par de fortes concentrations d'AIA, et induisent un redressement plus précoce des hypocotyles cultivés en présence d'ACC.

Ces antagonistes n'interagissent qu'avec l'AIA, l'auxine naturelle, et pas avec le 2,4-D ou l'ANA, 2 auxines de synthèse non indolique. Ils ne semblent pas agir en inhibant le transport auxinique.

L'analyse Lineweaver-Burk a révélé que l'interaction alcaloïde indolique / AIA est de type inhibition compétitive.

Les alcaloïdes indoliques pourraient êtres considérés comme une nouvelle classe de régulateurs de l'activité de l'AIA, et contribués utilement à l'étude du mode d'action de l'AIA. Ces molécules pourraient entrer en compétition sur un récepteur, tel qu'ABP1.

L'activité anti-auxinique de champignons ectomycorhiziens, non producteurs d'hypaphorine, pourrait être due à une ou plusieurs molécules appartenant à la classe des alcaloïdes indoliques.

Anne Jambois [a], Franck Anicet Ditengou [a1], Tomonori Kawano [a2], Alain Delbarre [b] and Frédéric Lapeyrie [a,*]

The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid specific competitors which do not alter auxin transport

[a] Unité Mixte de Recherche INRA-UHP Interactions Arbres/Micro-organismes, Institut National de la Recherche Agronomique, F-54280 Champenoux, France
[b] Institut des Sciences du Végétal, CNRS, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif sur Yvette Cedex, France
[*] Corresponding author, e-mail: lapeyrie@nancy.inra.fr

[1] *Present address*: Albert-Ludwigs Universität Frieburg - AG Palme-Institüt für Biologie II -Zellbiologie - Schänzlestr. 1-79104 Frieburg. Germany
[2] *Present address*: Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan

PHYSIOLOGIA PLANTARUM 120: 501–508. 2004
Printed in Denmark – all rights reserved

Copyright © Physiologia Plantarum 2004

The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid-specific competitors which do not alter auxin transport

Anne Jambois[a], Franck Anicet Ditengou[a,1], Tomonori Kawano[a,2], Alain Delbarre[b] and Frédéric Lapeyrie[a,*]

[a] *Unité Mixte de Recherche INRA–UHP Interactions Arbres/Micro-organismes, Institut National de la Recherche Agronomique, F-54280 Champenoux, France*
[b] *Institut des Sciences du Végétal, CNRS, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif sur Yvette Cedex, France*
[1] *Present address: Albert-Ludwigs Universität Frieburg, AG Palme-Institüt für Biologie II -Zellbiologie, Schänzlestr. 1-79104, Frieburg, Germany*
[2] *Present address: Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739–8526, Japan*
**Corresponding author, e-mail: lapeyrie@nancy.inra.fr*

Received 24 April 2003; revised 22 August 2003

The indole alkaloids brucine and yohimbine, just like hypaphorine, counteract indole-3-acetic acid (IAA) activity in seedling roots, root hairs and shoots, but do not appear to alter auxin transport in roots or in cultured cells. In roots, the interactions between IAA and these three alkaloids appear competitive and specific since these molecules interact with IAA but with neither 1-naphthaleneacetic acid (NAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), two synthetic auxins. The data reported further support the hypothesis that hypaphorine brucine and yohimbine compete with IAA on some auxin-binding proteins likely to be auxin receptors and that 2,4-D and NAA are not always perceived by the same receptor as IAA or the same component of that receptor. At certain steps of plant development and in certain cells, endogenous indole alkaloids could be involved in IAA activity regulation together with other well-described mechanisms such as conjugation or degradation. Hypaphorine with other active indole alkaloids remaining to be identified, might be regarded as a new class of IAA antagonists.

Introduction

New specific inhibitors are much needed by plant physiologists to further investigate the activity of indole-3-acetic acid (IAA), the major plant hormone regulating fundamental processes of cell division, elongation and differentiation. Indeed so far only one activity inhibitor, clofibric acid (PCIB), is being used although it is suspected of inducing uncontrolled side-effects in treated plants. By contrast, regarding IAA transport, two well-documented IAA efflux inhibitors, 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) and 2 ([1-naphthalenylamino]carbonyl)-benzoic acid (NPA), have been available for many years and a potentially useful IAA influx inhibitor, 1-naphthoxyacetic acid (1-NOA), has recently been characterized (Imhoff et al. 2000, Parry et al. 2001).

Hypaphorine (tryptophan betaine), an indole alkaloid, is a candidate inhibitor of IAA activity. Hypaphorine has been isolated from a number of medicinal plants such as *Glycyrrhiza* species (Ohtani et al. 1992) and *Erythrina* species (Wandji et al. 1995) and only recently from a micro-organism, the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Béguiristain et al. 1995, Béguiristain and Lapeyrie 1997). In host plant roots colonized by *P. tinctorius*, the expression of a symbiosis-regulated gene has been shown to be regulated by fungal

Abbreviations – ACC, 1-amincocyclopropane-1-carboxylic acid; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; IAA, indole-3-acetic acid; NAA, 1-naphthaleneacetic acid; 1-NOA, 1-naphthoxyacetic acid; NPA, 2 ([1-naphthalenylamino]carbonyl) benzoic acid; PCIB, clofibric acid; TIBA, 2,3,5-triiodobenzoic acid.

hypaphorine (Martin et al. 1997, Nehls et al. 1998). Hypaphorine and IAA counteract in root and shoots of *Eucalyptus* seedlings, including during root colonization by the hypaphorine-producing ectomycorrhizal fungus. Whereas root hair elongation is inhibited by hypaphorine, it can be restored by exogenous IAA application (Ditengou et al. 2000). Furthermore, hypaphorine treatment could restore elongation of eucalypt seedling tap roots and hypocotyl inhibited by high concentrations of IAA and ethylene, respectively (Ditengou and Lapeyrie 2000). Similar observations are now available on the model plant *Arabidopsis thaliana* (Reboutier et al. 2002), suggesting that these conclusions can most probably be extended to a wide range of plant species.

Hypaphorine, counteracts only IAA activity and not that of synthetic-non-indolic auxins such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or 1-naphtalene acetic acid (NAA) (Ditengou and Lapeyrie 2000), which seems to indicate that hypaphorine interacts during the very early steps of IAA perception or IAA signal transduction.

If IAA and hypaphorine are interacting on a receptor involving primarily the indole ring, as suggested by the results summarized above, it can be expected that other indole alkaloids, among some 1200 described in plant and fungi, possess similar IAA antagonist properties. Here, the activities of brucine and yohimbine, two readily available and water-soluble indole alkaloids, have been compared with that previously described for hypaphorine. The mode of interaction between IAA and these three indole alkaloids was further characterized by applying the in-vivo Lineweaver–Burk analysis. Then, IAA carriers being potent sites for competition, the activities of such indole alkaloids on IAA transport were investigated.

Materials and methods

Chemicals

Hypaphorine was synthesized in vitro from tryptophan (Romburgh and Barger 1911). The purity of the product was determined by NMR and HPLC analysis (Béguiristain et al. 1995). ACC (1-amincocyclopropane-1-carboxylic acid), IAA (indole-3-acetic acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (1-naphthaleneacetic acid), PCIB (clofibric acid), TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid), NPA (2 ([1-naphthalenylamino]carbonyl)benzoic acid), brucine and yohimbine were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Radiolabelled [^{14}C]NAA and [^{14}C]2,4-D were provided by Isotopchim (Ganagobie-Peyruis, France).

IAA antagonism in seedling tap root

For comparison, the protocol followed was strictly identical to that previously described (Ditengou and Lapeyrie 2000). In brief, *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* (Maid et al.) Kirkp. seeds (seed lot no. 19493, provided by CSIRO Australian Tree Seed Centre, Canberra, Australia) were germinated in large Petri dishes over agar nutrient medium supplemented with IAA (1 μM), 2,4-D (0.1 μM), NAA (150 μM), brucine (0, 100, 500 μM) or yohimbine (0, 100, 500 μM) or combinations of one auxin and one indole alkaloid. Tap root length was recorded after 7 days on 20–40 seedlings per treatment.

Competitive inhibition of IAA activity on tap roots, Lineweaver–Burk kinetic analysis

The in-vivo Lineweaver–Burk kinetic analysis was used to investigate the mode of interaction between IAA and hypaphorine, yohimbine or brucine during IAA-dependent inhibition of the tap root elongation. *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* seedlings (at least 25 seedlings per treatment) were grown as above over agar nutrient medium supplemented with IAA (0.3, 1.0, 3.0, 10 μM) sometimes combined with hypaphorine (100 μM), yohimbine (100 μM) or brucine (100 μM). The inhibitory effect of IAA on root growth was expressed as the percentage of the IAA-dependent root growth inhibition ($I\%$), where $I\% = 100(L_C - L_I)/L_C$ where L_C and L_I are the length of roots in the absence of IAA and that in the presence of IAA, respectively. For Lineweaver–Burk kinetic analysis, the reciprocal data points of IAA-dependent root growth inhibition ($1/I\%$) were plotted against the reciprocals of IAA concentrations [1/(IAA) (μM)].

Inhibition of root hair elongation

Eucalypt seedlings were grown on agar medium sometimes supplemented with IAA (1 μM), brucine or yohimbine (100, 500 μM) as above. Root hair length was recorded on 14-day-old seedlings under a dissecting microscope, 20 mm behind the apex, in the fully elongated hair zone.

IAA antagonism in seedling hypocotyl

The protocol followed was strictly identical to that previously described (Ditengou and Lapeyrie 2000). In brief, *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* seeds were germinated on agar nutrient medium supplemented or not with 10 μM 1-amincocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) the ethylene precursor and brucine or yohimbine (0, 100, 500 μM). ACC treatment induced the formation of a typical apical hook on hypocotyl due to IAA over-accumulation in response to IAA transport inhibition by ethylene (Ditengou and Lapeyrie 2000). In each treatments (at least 35 seedlings per treatment), the percentage of seedlings whose hook had opened leading to hypocotyl elongation was recorded between 6 and 14 days after sowing.

Tap root gravitropic response

Tap root tip response to gravity change in the presence of hypaphorine, brucine or yohimbine was investigated

in Petri dishes, prepared as above, containing 8-day-old seedlings (at least 29 seedlings per treatment) grown vertically. Agar cylinders (10 µl) containing indole alkaloids (500 µ*M*) were applied against the root tip, on the right side of the apex. Soon after, the Petri dishes were rotated by 90° clockwise. The curvature angles at the root tip were recorded 6 h later on scanned plate images. For comparison seedlings were treated in the same conditions with two IAA transport inhibitors, NPA and TIBA (10 µ*M*).

Auxin transport, influx and efflux, by cells in culture

Hypaphorine activity on IAA transport was assessed according to Delbarre et al. (1996). Cells of *Arabidopsis thaliana* (eight replicate subsamples per treatment) were incubated in solutions containing simultaneously increasing concentrations of hypaphorine (0.03–300 µ*M*) and either 1.89×10^{-7} *M* [^{14}C]2,4-D (sharing the same influx carrier as IAA) or 5.26×10^{-9} M [^{14}C] NAA (sharing the same efflux carrier as IAA). After 30 s incubation, labelled 2,4-D or NAA accumulation in cells was assessed by scintillation counting after filtration. As for IAA transport inhibitors, the residual carrier activity in the presence of hypaphorine, was expressed as a percentage of the total saturable activity of the carrier determined in the presence of a high concentration (50 µ*M*) of unlabelled NAA or 2,4-D, respectively. An excess of unlabelled 2,4-D or NAA has been shown to saturate influx or efflux carriers, respectively (Delbarre et al. 1996), resulting in a sharp increase of the intracellular-labelled NAA concentration or a decrease of the intracellular 2,4-D concentration.

Statistical analysis

Data were analysed with Abacus Concepts, StatView Student (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) software [analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's Protected Least Significant Difference test, $P = 0.05$]. With the exception of experiments to assess auxin transport in cells and competitive inhibition (two replicate experiments), at least three independent replicate experiments were conducted, all of them giving concordant results.

Results

IAA antagonism in *Eucalyptus* seedling tap root

In comparison with control plants, the addition of 100 µ*M* brucine (Fig. 1A and B) or yohimbine (Fig. 1C and D) to the nutrient medium did not affect tap root elongation but higher concentration, 500 µ*M*, inhibited elongation, by approximately 25% (Fig. 1A and B) and 15% (Fig. 1C and D), respectively. The addition of auxins, IAA (1 µ*M*), 2,4-D (0.1 µ*M*) and NAA (150 µ*M*), to the nutrient medium resulted in strong inhibitions (from 50 to 75%) of tap root elongation (Fig. 1A and B) In the presence of 1 µ*M* IAA, tap root elongation could be restored by simultaneous addition of brucine or yohimbine at any concentration tested (100 or 500 µ*M*). Then, tap root elongation inhibition compared to-non-treated control tap roots ranged between approximately 0 and 30% depending on treatment combinations (Fig. 1). By contrast, while tap root elongation inhibition by 2,4-D and NAA were in the same range of magnitude than IAA inhibition, neither brucine (Fig. 1A and B) nor yohimbine (Fig. 1C and D) could counteract the inhibitory activity of both synthetic non-indolic auxins.

Competitive inhibition of IAA activity on tap roots, Lineweaver–Burk kinetic analysis

Since brucine and yohimbine activities, presented above, mimicked that of hypaphorine reported earlier (Ditengou and Lapeyrie 2000), the interactions between these three indole alkaloids and IAA were investigated simultaneously and compared. The actions of hypaphorine, brucine and yohimbine on prevention of IAA-dependent growth inhibition of *Eucalyptus* tap roots were graphically analysed with a double-reciprocal plot (Fig. 2). Hypaphorine (100 µ*M*) prevented the inhibition of IAA-dependent tap root growth in a typically competitive manner. The apparent K_m value for IAA rose sharply from 0.36 µ*M* in control medium to 8.23 µ*M* in a medium supplemented with hypaphorine, without significantly affecting the predicted V_{max} (from 93% IAA inhibition of tap root growth to 95% in hypaphorine supplemented medium). Brucine (100 µ*M*) and yohimbine (100 µ*M*) similarly prevented the IAA-dependent tap root growth inhibition. The mode of interaction between brucine or yohimbine and IAA was still competitive, although brucine and yohimbine lowered the predicted V_{max} from 93% IAA inhibition to 41 and 39%, respectively. The apparent K_m value for IAA in response to brucine or yohimbine supply rose from 0.36 µ*M* to 1.45 and 0.68 µ*M*, respectively, less than in response to hypaphorine.

Inhibition of root hair elongation

Brucine or yohimbine, added to the nutrient medium at 100 µ*M*, significantly inhibited eucalypt root hair elongation, by 33 and 20%, respectively (Fig. 3), just like hypaphorine (Béguiristain and Lapeyrie 1997). At a higher concentration, 500 µ*M*, elongation was inhibited by up to 85% (Fig. 3). As expected, IAA applied at a root elongation inhibitory concentration (1 µ*M*) did not affect root hair elongation (Fig. 3).

IAA antagonism in *Eucalyptus* seedling hypocotyl

Incorporation of the immediate precursor of ethylene, 1-amincocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) at 10 µ*M* in the agar medium enhanced the formation of an apical hook on *E. globulus* hypocotyl and delayed hook opening and cotyledon expansion as described for numerous plant species (Smalle and Van Der Straeten 1997).

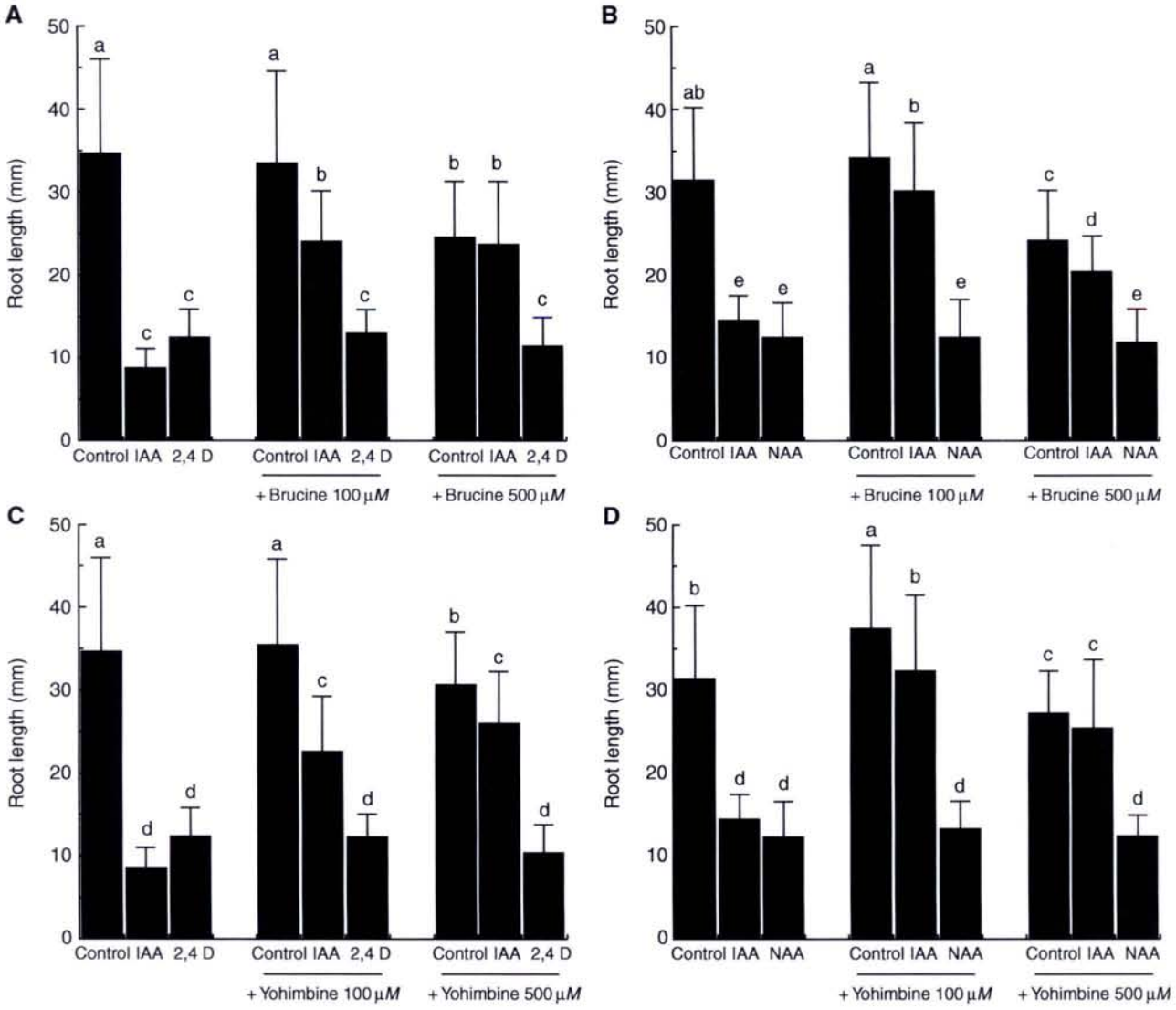


Fig. 1. Interaction between IAA and brucine (A, B) or yohimbine (C, D) as concerns control of tap root elongation. *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* seedlings were cultivated for 7 days over agar nutrient medium (Control) sometimes supplemented with an indole alkaloid (brucine or yohimbine, 100 µ*M*, 500 µ*M*) and IAA 1 µ*M*, 2,4-D 0.1 µ*M* or NAA 150 µ*M*. Mean values recorded on at least 35 seedlings ±SD for each experiment (A, B, C or D) compared using ANOVA and Fisher's Protected Least Significant Difference test, $P = 0.05$.

After 7 days of incubation in a growth chamber, 100% of the hypocotyls of control seedlings were elongated, whereas in the presence of ACC, 100% of the seedlings displayed an apical hook (Fig. 4). It took 14 days for 80% of the ACC-treated seedlings to elongate (Fig. 4). The incorporation of brucine (Fig. 4A) or yohimbine (Fig. 4B) at 100 or 500 µ*M* in the nutrient medium did not affect hypocotyl elongation compared with control seedlings.

When 500 µ*M* of brucine (Fig. 4A) or yohimbine (Fig. 4B) were added to the agar medium together with 10 µ*M* ACC, hypocotyls elongated much earlier than those treated with ACC alone. From 30 to 35% of the hypocotyls were elongated after 7 days and 95 to 100% after 11 days. The same trend was recorded, with a lower intensity, when both alkaloids were added at a lower concentration, 100 µ*M*, into ACC supplemented nutrient medium (Fig. 4).

Gravitropic response of *Eucalyptus* seedling tap root

The gravitropic response of root tips was recorded 6 h after the roots had been orientated horizontally. The mean angle of curvature of control root tips was then 48° (Fig. 5). When inhibitors of auxin transport were applied, 10 µ*M* NPA or 10 µ*M* TIBA, the mean angles of curvature were only 8° and 6°, respectively (Fig. 5). Neither brucine, yohimbine or hypaphorine at otherwise active concentrations (500 µ*M*) affected the gravitropic response (Fig. 5).

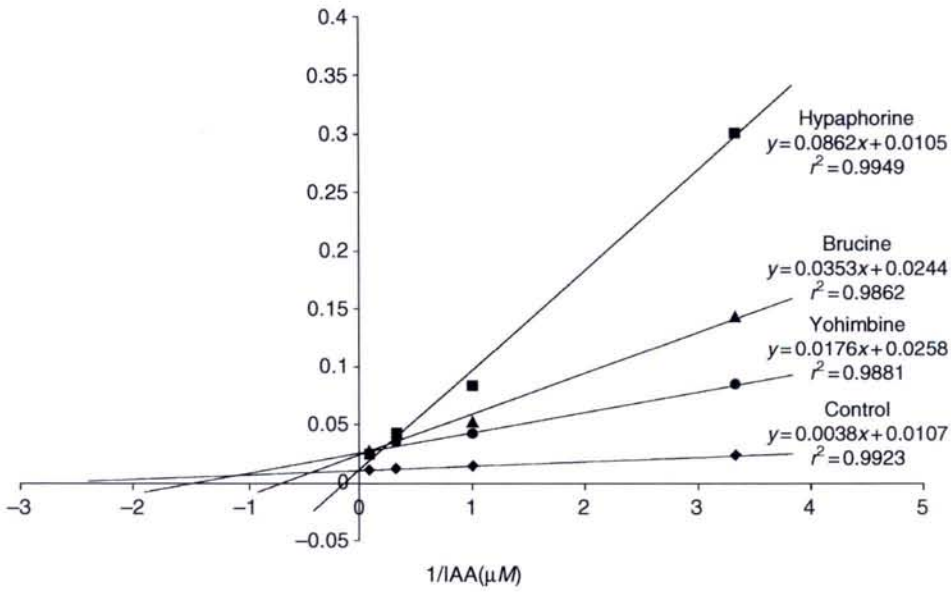


Fig. 2. Assessment (Lineweaver–Burk kinetic analysis) of the interaction between brucine, yohimbine or hypaphorine (100 μ*M*) and IAA during prevention of IAA-dependent growth inhibition of *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* tap roots. Inhibitory effect of IAA on root growth is expressed as the percentage of the IAA-dependent root growth inhibition (*I*%): $I\% = 100(L_C - L_I)/L_C$ where L_C and L_I are the length of roots in the absence of IAA and that in the presence of IAA, respectively. The reciprocal data points of IAA-dependent root growth inhibition ($1/I\%$) are plotted against the reciprocals of IAA concentrations [1/(IAA) (μM)]. Mean values recorded on at least 25 seedlings.

Auxin transport, influx and efflux, by *Arabidopsis* cells in culture

IAA is known to share influx carriers with 2,4D and eflux carriers with NAA (Delbarre et al. 1996). The activities of both carriers were assessed after 30 s incubation in radiolabelled 2,4-D and NAA solutions, respectively.

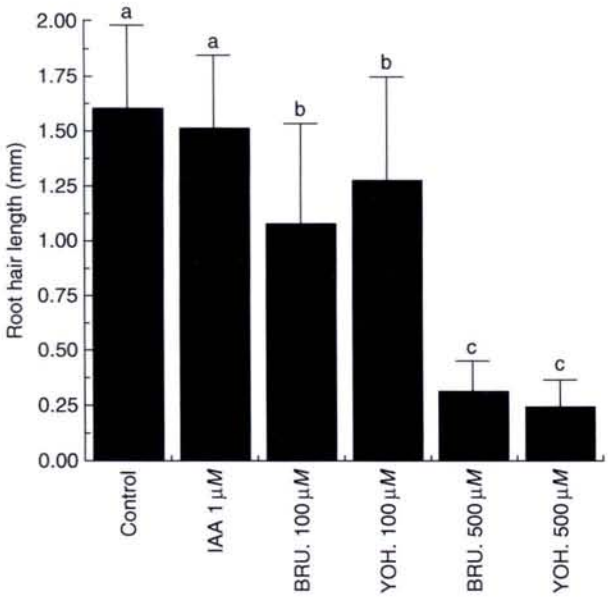


Fig. 3. Length of *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* fully elongated root hairs on agar medium sometimes supplemented with IAA (1 μ*M*), brucine or yohimbine (100, 500 μ*M*). Mean values recorded on at least 35 seedlings ±SD, compared using ANOVA and Fisher's Protected Least Significant Difference test, $P = 0.05$.

High concentration (50 μ*M*) of unlabelled 2,4-D inhibited 100% of saturable activity of the influx carrier, according to the definition of the saturable activity (Fig. 6A). Hypaphorine treatments, at any concentration tested up to 300 μ*M*, had no impact on auxin influx carrier activity (Fig. 6A). Similarly, while a high concentration (50 μ*M*) of unlabelled NAA inhibited 100% of auxin efflux carrier saturable activity, hypaphorine treatments had no impact on auxin efflux carrier activity (Fig. 6B).

Discussion

The effects of brucine and yohimbine on tap root, root hair and hypocotyl elongation, reported here, mimic closely those of hypaphorine recorded earlier (Ditengou et al. 2000, Ditengou and Lapeyrie 2000). In the tap root elongation zone, the tested alkaloids supplied simultaneously with toxic concentrations of IAA restored elongation. In root hairs, tested alkaloids inhibited apical growth, whereas IAA could restore growth inhibited by hypaphorine (Ditengou et al. 2000). In hypocotyls in which ethylene and IAA activities are linked to control the apical hook formation (Lehman et al. 1996), the tested alkaloids stimulated hook opening.

The Lineweaver–Burk analysis of data recorded on elongating tap roots suggests that interactions between these three indole alkaloids and IAA are competitive. The Lineweaver–Burk analysis originally designed for enzyme kinetics (Dixon and Webb 1979) is often applied to the study of interactions between two different plant growth substances, or between an active plant growth substance and its inactive analogues in various plant

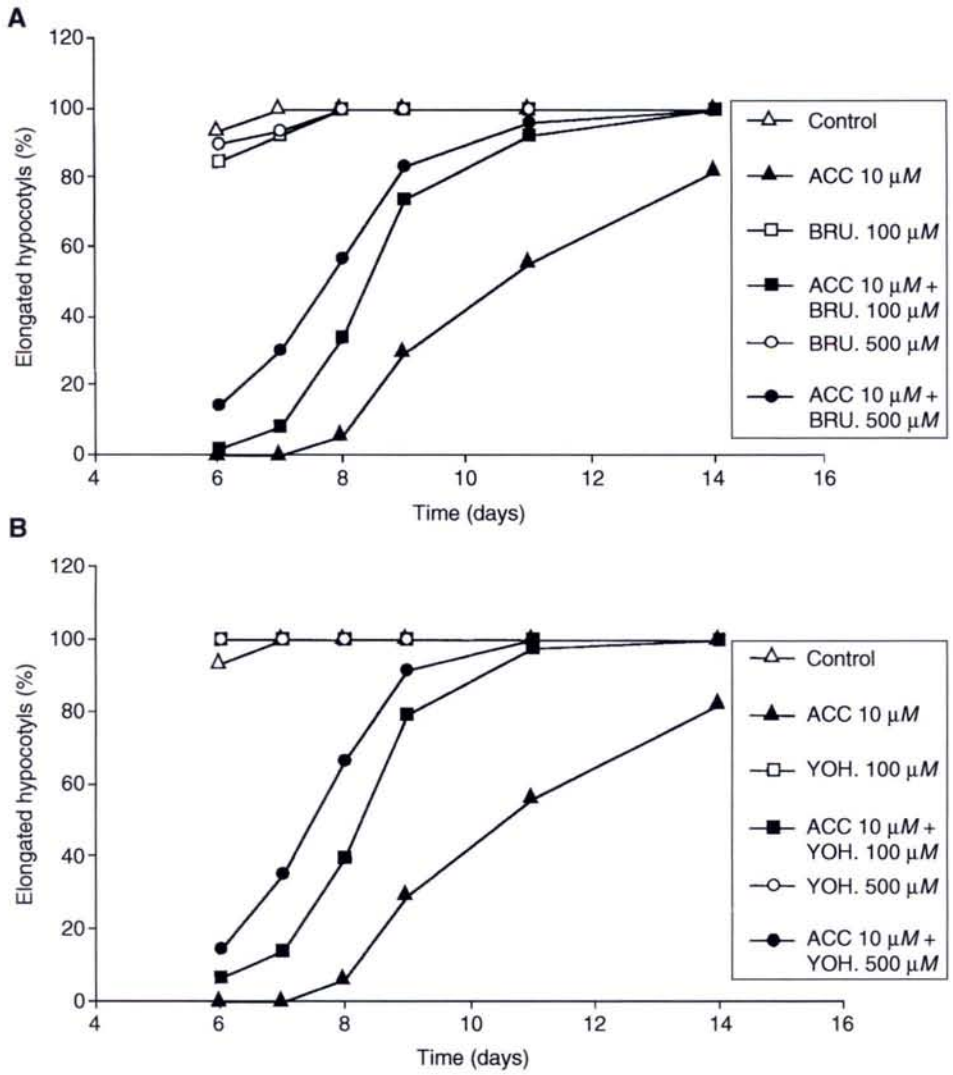


Fig. 4. Interaction between brucine (A) or yohimbine (B) and (ACC) as concerns control of hypocotyl elongation. *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* seedlings were cultivated over agar nutrient medium (Control) supplemented with ACC 10 µ*M*, brucine or yohimbine (100 µ*M*, 500 µ*M*) or a combination of ACC and brucine or yohimbine. The kinetics of the hypocotyl elongation were followed over 14 days. Percentages of elongated hypocotyls were recorded for at least 35 seedlings per treatment.

materials (Christianson 2000, Zhong et al. 2001). Traditionally, the in-vivo Lineweaver–Burk analysis has been applied to assess the mode of interaction between auxins and their putative inhibitors in the early days of auxin research. Competitive interactions between 2,4-D and structurally related compounds, 2,4-dichlorophenoxyisobutyric acid and 4-chlorophenoxyisobutyric acid (PCMB) have been demonstrated in this way (McRae and Bonner 1964). Here this approach demonstrates clearly the competitive interaction between IAA and hypaphorine. The competitive interactions between IAA and brucine or IAA and yohimbine are less obvious as the respective V_{max} values were found to be slightly lower. However we must keep in mind that in vivo, as opposed to in vitro, applied molecules may induce some side-effects on plants not related to the function investigated, for example, 500 µ*M* brucine slightly inhibited root elongation in control treatment in the absence of IAA (Fig. 1).

Due to structural similarity with IAA, namely the presence of the indole ring, we propose that hypaphorine brucine and yohimbine specifically compete with IAA on some auxin-binding proteins likely to be auxin receptors (Napier et al. 2002). This hypothesis is supported by the recent reports (Kawano et al. 2001, 2002) that IAA and hypaphorine competitively interact on a purified protein, a peroxydase, sharing some structural similarities with previously described auxin-binding proteins. Competition between IAA and indole alkaloids therefore appears to be the most plausible hypothesis to explain IAA activity regulation in all our model systems. This does not exclude the

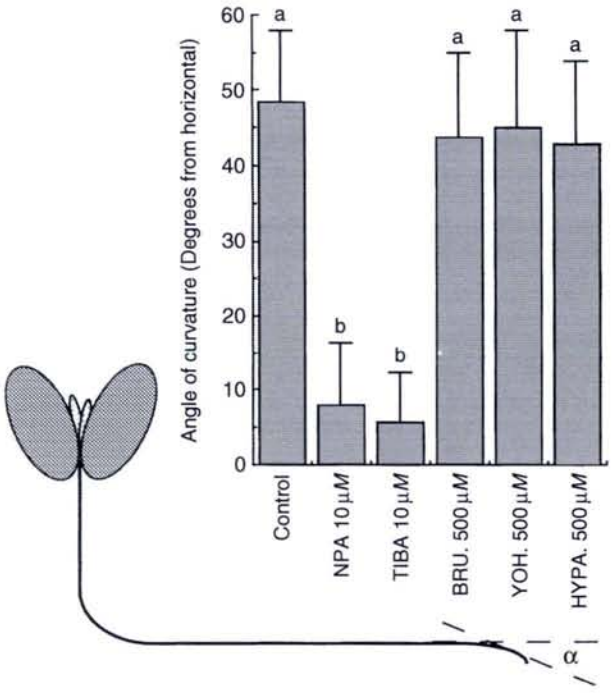


Fig. 5. Tap root gravitropic response in the presence of indole alkaloids (hypaphorine, brucine or yohimbine, 500 µ*M*) or IAA transport inhibitors (NPA or TIBA, 10 µ*M*) compared with control. *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* seedlings grown vertically were rotated by 90° and the curvature angle at the root tip was recorded 6 h later. Mean values recorded on at least 29 seedlings ±SD compared using ANOVA and Fisher's Protected Least Significant Difference test, $P = 0.05$.

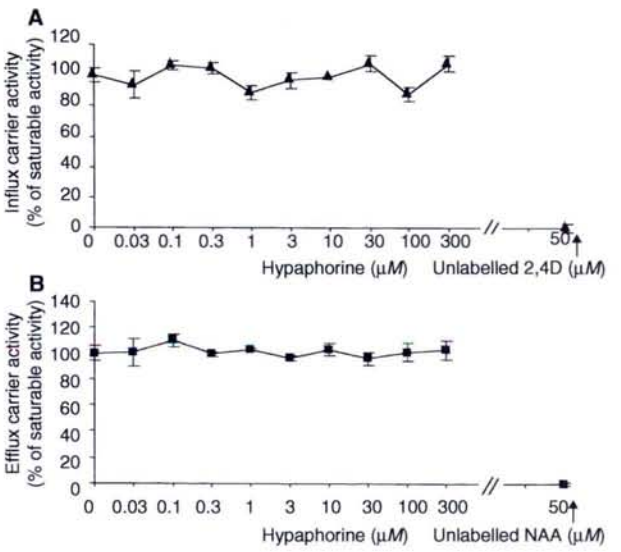


Fig. 6. Hypaphorine activity on 2,4-D influx (A) or NAA efflux (B). Cells of *Arabidopsis thaliana* were incubated in solutions containing either [^{14}C]2,4-D or [^{14}C]NAA and increasing concentrations of hypaphorine (0.03–300 µ*M*). Labelled auxin accumulation in cells was assessed after 30 s. The carrier activity is expressed as a percentage of the total saturable activity of the carrier determined in the presence of a high concentration (50 µ*M*) of unlabelled 2,4-D or NAA, respectively. Mean values recorded on at least eight cell culture subsamples ±SD.

possibility that various regulatory mechanisms may be induced by indole alkaloids such as IAA conjugation or degradation.

Hypaphorine (Beguiristain and Lapeyrie 1997), brucine and yohimbine (data not shown), included at millimolar concentrations do not alter developmental steps, such as root branching, known to be auxin regulated. This suggests that these alkaloids compete with IAA on some receptors only. These receptors must be involved in cell elongation rather than in cell division and found in various cells such as root hairs, or tissues such as the root and hypocotyl elongating zones. The absence of interaction in roots between any of these three indole alkaloids and non-indolic auxins suggests that 2,4-D and NAA are not always perceived by the same receptor as IAA or the same component of that receptor. The comparison of numerous indole alkaloid structures, including that of inactive ones to be identified, with their IAA antagonist activities, could contribute to define structure/activity relationship and consequently to characterize the binding site of that receptor and its environment.

It was hypothesized earlier (Ditengou and Lapeyrie 2000) that hypaphorine does not interfere with IAA transport and this was confirmed here at the cellular level. In *Arabidopsis* cells, hypaphorine appears not to interfere either with the IAA influx or the IAA efflux carrier activities since accumulation of radiolabelled 2,4-D and NAA, assumed to share the influx or efflux carrier, respectively, with IAA (Delbarre et al. 1996, Yamamoto and Yamamoto 1998), were not regulated by the hypaphorine external supply. Further evidence was provided with seedling tap roots. Following eucalypt seedling 90° rotation, root tip reorientation was delayed by TIBA and NPA confirming that here too gravitropic response was dependent on apical auxin transport as for numerous plant species (Rashotte et al. 2000). Neither hypaphorine nor brucine, nor yohimbine, at an otherwise active concentration, affected eucalypt seedling gravitropic response. These molecules control neither eucalyptus tap root elongation as reported earlier (Béguiristain and Lapeyrie 1997, Ditengou and Lapeyrie 2000), nor auxin transport at root tip. Polar transport experiments on *Eucalyptus* seedlings could reinforce the demonstration.

Indole alkaloids make up the major group of plant alkaloids with more than 1200 described so far (Richter 1993). Since three of the indole alkaloids, tested so far, proved to act as auxin antagonists we may assume that numerous others could also compete with IAA and some of them may even be more efficient antagonists than hypaphorine. Consequently at certain steps of plant development and in certain cells, endogenous indol alkaloids could be involved in IAA activity regulation together with other well-investigated regulatory mechanisms such as conjugation or degradation.

Although the first evidence of IAA activity down-regulation in plant tissues by a colonizing micro-organism was reported 2 years ago (Ditengou and Lapeyrie 2000), the absence of hypaphorine in the few ectomycorrhizal species investigated so far, apart from *P. tinctorius* (Béguiristain et al. 1995) hinders any generalization of this model of plant ectomycorrhizal fungus interaction. The data reported here suggest that numerous other indole alkaloids, transferred by hyphae to differentiating epidermal cells may play the same role, including the inhibition of root hair elongation, a general feature of ectomycorrhizae (Ditengou et al. 2000). Altogether such regulatory mechanisms might operate in a wider range of plant–microbe interactions since numerous indole alkaloids are synthesized by fungi (Richter 1993).

Hypaphorine, together with other active indol alkaloids to be identified, might be regarded as a new class of IAA antagonist. They might be especially useful further for investigating IAA activity since they are specific to IAA, contrary to NAA and 2,4D. They do not affect much plant development, apart from root hair elongation, limiting the risk of indirect side-effects. Such IAA antagonists are active on the model plant *Arabidopsis thaliana* including cultured cells (Reboutier et al. 2002) and most probably competing with IAA on receptor proteins (Kawano et al. 2001, 2002). In comparison with brucine and yohimbine, and by analogy with enzyme–substrate interactions, hypaphorine reduced the cell affinity for IAA much more sharply (higher apparent K_m value) and therefore, among the three alkaloids tested, hypaphorine seems to be the most promising experimental tool to date.

Acknowledgements – The authors are grateful to Professor Claude Selve and Dr Christine Gérardin (Université Nancy I, France) for helping to synthesize hypaphorine and Dr Eric Gelhaye (Université Nancy I, France) for critical discussions. They wish to thank Sophie Kotowski for helpful technical assistance. This work was supported by the European Commission INCO-DC program (contract number: ERBIC18CT-98319).

References

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

Béguiristain T, Côté R, Rubini P, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (1995) Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry 40: 1089–1091

Christianson ML (2000) ABA prevents the second cytokinin-mediated events during the induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. Am J Bot 87: 1540–1545

Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphtalene-1-acetic acid, indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. Planta 198: 532–541

Ditengou FA, Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. Mol Plant Microbe Interact 13: 151–158

Ditengou FA, Beguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211: 722–728

Dixon M, Webb EC (1979) Enzymes, 3rd edn. Academic Press, New York

Imhoff V, Muller P, Guern J, Delbarre A (2000) Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. Planta 210: 580–588

Kawano T, Kawano N, Hosoya H, Lapeyrie F (2001) Fungal auxin antagonist, hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. Biochem Biophys Res Com 288: 546–551

Kawano T, Kawano N, Lapeyrie F (2002) A fungal auxin antagonist, hypaphorine prevents the indole-3-acetic acid-dependent irreversible inactivation of horseradish peroxidase: inhibition of compound III-mediated formation of P-670. Biochem Biophys Res Com 294: 553–559

Lehman A, Black R, Ecker JR (1996) HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required, for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. Cell 85: 183–194

Martin F, Lapeyrie F, Tagu D (1997) Altered gene expression during ectomycorrhizal development. In: Carroll G, Tudzynski P (eds) The Mycota, Vol. V. Part. A. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 223–242

McRae DH, Bonner J (1964) Plant Growth and Development. McGraw-Hill Inc, New York

Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C (2002) A short history of auxin-binding proteins. Plant Mol Biol 49: 339–348

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

Ohtani K, Ogawa K, Kasai R, Yang CR, Yamasaki K, Zhou J, Tanaka O (1992) Oleanane glycosides from *Glycyrrhiza yunnanensis* roots. Phytochem 31: 1747–1752

Parry G, Delbarre A, Marchant A, Swarup R, Napier R, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. Plant J 25: 399–406

Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. Plant Physiol 122: 481–490

Reboutier D, Bianchi M, Brault M, Roux C, Dauphin A, Rona JP, Legué V, Lapeyrie F, Bouteau F (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in non-host *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Interact 15: 932–938

Richter G (1993) Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Presse Polytechniques et. Universitaires Romanes, Lausanne.

Romburgh PV, 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, Van Der Straeten D (1997) Ethylene and vegetative development. Physiol Plant 100: 593–605

Wandji J, Awanchiri SS, Fomum ZT, Tillequin F, Libot F (1995) Isoflavones and alkaloids from the stem bark and seeds of *Erythrina senegalensis*. Phytochemistry 39: 677–681

Yamamoto M, 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

Zhong GY, Huberman M, Feng XQ, Sisler EC, Holland D, Goren R (2001) Effect of 1-methyleyclopropene on ethylene-induced abscission in citrus. Physiol Plant 113: 134–141

Edited by D. Van Der Straeten

III. Activité de l'hypaphorine fongique et de l'auxine sur l'expression de gènes d'une plante hôte, le peuplier

Résumé de l'article ci-joint : **Auxins and hypaphorine, the indol alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*, alter gene expression in poplar roots**

Après avoir confirmé que l'activité antagoniste hypaphorine/AIA s'exerçait également au peuplier, la régulation de l'expression des gènes par ces deux antagonistes a été analysée. L'activité de l'hypaphorine et de l'AIA ou d'un traitement combinant ces deux molécules, sur l'expression de plus de 4000 gènes de peuplier a pu être étudiée grâce à l'utilisation de **cDNA-array**.

Après 24 heures de traitement avec de l'hypaphorine 500 µM et / ou de l'AIA 5 µM l'expression de la majorité des gènes étudiés ne semblent pas régulée. Seuls 121 gènes au total sont différentiellement.

Sur les 17 gènes régulés par l'hypaphorine, 6 sont également régulés par l'auxine. Parmi ces 6 gènes, 1 seul est régulé de manière opposée par ces deux molécules, il code pour une "**Extensin-like-protein**" est réprimé par l'hypaphorine, stimulé par l'auxine, et également stimulé par un traitement auxine + hypaphorine. Cinq gènes sont régulés de façon agoniste, c'est-à-dire qu'ils sont par exemple stimulés en présence d'hypaphorine ou en présence d'AIA.

En dehors du transcrit codant pour une "Extensin-like-protein", protéines nécessaires à la cohésion de la paroi, tous les gènes régulés par l'AIA ou hypaphorine sont régulés de la même façon avec tout au plus des différences quantitatives dans le niveau d'expression. Ceci peut paraître paradoxal au regard des réponses physiologiques observées en présence de l'une ou l'autre molécule, puisque aucune réponse n'a été mise en évidence à ce jour; seuls des antagonismes ont été rapportés.

Sur l'ensemble des gènes significativement régulés, plusieurs codent pour des **protéines** impliquées **dans la paroi** (des extensines, des protéines riches en proline, des periaxines). Comme pour le partenaire fongique, les protéines pariétales du partenaire végétal semblent connaître des remaniements importants et être une des premières cibles des médiateurs chimiques.

Un facteur de transcription et une **GTPase** sont fortement régulés (15-20 fois) par les traitements auxine et auxine + hypaphorine. Ces observations sont identiques à celles faites au cours des travaux portant sur la cinétique de

mycorhization. Les GTPase sont connues par ailleurs pour réguler la croissance apicale et l'exocytose et pourraient jouer un rôle dans l'ontogenèse ectomycorhizienne, notamment dans la réorientation de la croissance des cellules rhizodermiques.

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

Jambois A, Kohler A, Martin F, Lapeyrie F

IAA and hypaphorine, the indol alkaloid from the ectomycorrhizal fungus Pisolithus microcarpus, alter gene expression in poplar roots

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

Running title: Poplar gene expression is regulated by hypaphorine

* Corresponding author; e-mail: lapeyrie@nancy.inra.fr; Fax +33-383-39-40-69.

Summary

Ectomycorrhizal fungi release several active metabolites, including auxins and derivatives, in the rhizosphere. These compounds induce striking morphological and biochemical changes in root tissues of the host-plant and they likely contribute to the ectomycorrhiza development. Hypaphorine, an indole-3-acetic acid (IAA) antogonist, released by Pisolithus species, controls elongation rate of root hairs and induces a transitory root hair tip swelling, suggesting that this indolic compound might contribute to the lack of root hairs in ectomycorrhiza. Here, we have analyzed the effect of 500 µM hypaphorine and 5 µM IAA on gene expression in poplar roots, using a poplar microarray (i.e., a unigene set of 4486 cDNAs of Populus trichocarpa x deltoides). Incubation in the presence of hypaphorine for 24 h induced the regulation of 17 genes amongst them six were also regulated by IAA. Hypaphorine and IAA showed an opposite effect on the gene expression of only one of these genes coding for an extensin-like protein. On the other hand, IAA induced the regulation of 71 EST of which, several aquaporins, an elongation factor 1 alpha, a WD-GTPase ß subunit, a nitrate-induced gene, cell-wall proteins and metallothioneins. The changes in the concentration of transcripts of representative regulated genes was confirmed by semi-quantitative RT-PCR. The present data suggest that ectomycorrhizal fungi are able to trigger changes in root hormone metabolism through the release of active metabolites. The inhibition of root hair elongation by hypaphorine may be the consequence of the observed decrease in transcripts of extensin, a cell wall protein. Whether the hypaphorine-regulated extensin is located in root hair cell walls is currently investigated.

Key words: cDNA arrays, poplar, symbiosis-regulated genes, IAA, Hypaphorine

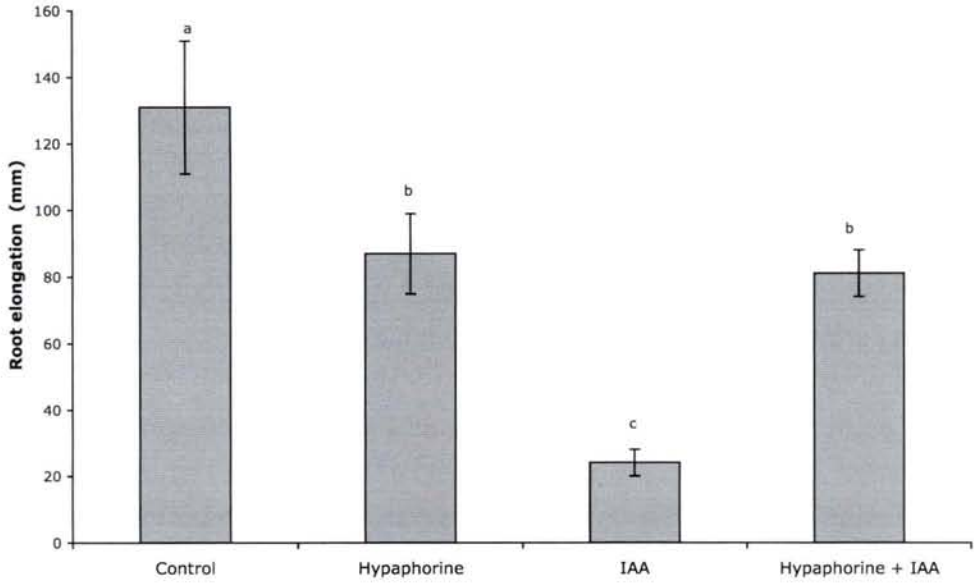
Introduction

Ectomycorrhizas are symbiotic associations between up to 95% of short roots of trees and soil fungi in boreal and temperate forests. Their development involves dramatic changes in root morphology coinciding with the colonization of the root surface and penetration between epidermal cells by the fungal mycelium: formation of lateral roots is highly stimulated, highly branched coralloid structures may form on these lateral roots, root hair formation is suppressed and radial elongation of cortical cells occurs (Harley and Smith 1983). Such changes in plant development are likely regulated by signaling molecules exchanged between partners during the different developmental steps.

Unlike plant pathogen interactions interactions, where components of signal transduction pathways are well understood (Dean 1997, Hahn 2000, Katagiri 2004, Lengeler et al. 2000), the molecular basis of signal perception and transduction in ectomycorrhizas are still poorly defined. Evidence for the role of auxins comes from the ectomycorrhizal phenotype of an auxin-overproducing mutant of Hebeloma cylindrosporum. Pinus pinaster inoculated with this mutant produced an increased number of ectomycorrhizal roots (Gay et al. 1994, Gea et al. 1994) having a multiseriate Hartig net (Tranvan et al. 2000) and an up-regulation of auxin-regulated/genes (Charvet-Candela et al. 2002). These studies confirmed that several morphogenetic steps involved in mycorrhiza development are regulated by fungal indole acetic acid (IAA) (Martin et al. 2001).

Other indolic compounds released by ectomycorrhizal fungi may play a role in symbiosis development. During the establishment of the mycorrhiza between Pisolithus microcarpus and Eucalyptus globulus, the mycelium accumulates the indole alkaloid hypaphorine, the tryptophan betaine (Beguiristain et al. 1995). Hypaphorine regulates root hair elongation and auxin activity in root hair, root and shoot of the host plant (Ditengou et al. 2000, Ditengou and Lapeyrie 2000, Ditengou et al. 2003, Jambois et al. 2005). Furthermore, hypaphorine competitively prevents the IAA-dependent root growth inhibition (Jambois et al. 2005).
In ectomycorrhiza, it is likely that fungal auxins, hypaphorine and others metabolites act in concert to ensure a fine tuning of developmental steps. However the precise role of each molecule in the cascade of molecular events triggering host gene expression and ultimately leading to mature symbiosis is still unknown. In the present study, we repport the inhibition of poplar root hair elongation by hypaphorine, associated with alteration in gene expression. Hypaphorine and IAA differentially regulated the expression of 121 transcripts.

A



B

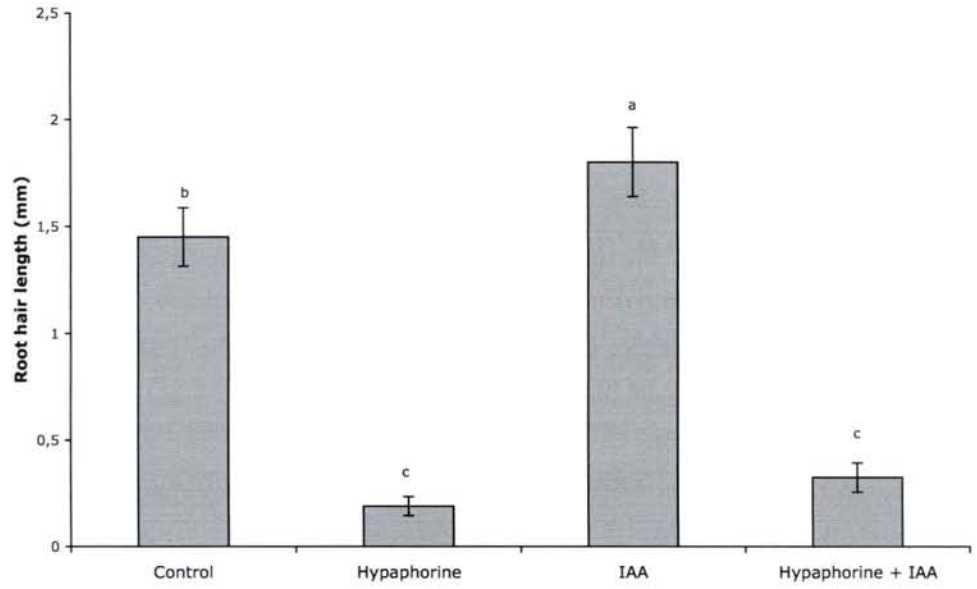


Fig 1: Effect of IAA and hypaphorine treatment on poplar root elongation **(A)** and root hair elongation **(B)**. Two weeks old cuttings from the hybrid poplar P.x canescens Sm. (Populus. tremula L. x Populus alba L.) cv 717-1-B4 were treated with hypaphorine (0-500 µM final concentration in agar) and IAA (0-5 µM final concentration in agar). Primary root elongation and root hair length were recorded 7 days after treatment.

Results

Populus responses to IAA and hypaphorine incubation

To confirm that poplar was responsive to hypaphorine and hypaphorine/IAA interaction as previously reported for Eucalyptus and Arabidopsis seedlings (Ditengou and Lapeyrie 2000, Reboutier et al. 2002) micropropagated plantlets Populus tremula x alba 717-1-B-4 hybrid were incubated in the presence of 5 µM IAA, 500 µM hypaphorine and a mix of 5 µM IAA and 500 µM hypaphorine.

Adventive root elongation was strongly inhibited by 5 µM IAA, while it was slightly inhibited by 500 µM hypaphorine (Fig 1A). Elongation of roots treated simultaneously with IAA and hypaphorine was similar to that of roots treated with hypaphorine alone (Fig 1A). Conversely root hair elongation was strongly inhibited by hypaphorine while it was slightly stimulated by IAA. Simultaneous treatment with IAA and hypaphorine led to short root hairs as when treated with hypaphorine alone (Fig 1B).

Quantification of hypaphorine- and IAA-responsive genes

To assess regulation of gene expression in response to hypaphorine, the fungal alkaloid, or IAA, its antagonist, we performed large-scale expression profiling using a poplar microarray (i.e., a unigene set of 4486 cDNAs of Populus trichocarpa x deltoides cv Beaupré) (Kohler et al. 2004, Kohler et al. 2003). Total RNA were extracted from roots of 5-weeks-old P. tremula x alba cv 717-1-B4 plantlets treated or not during 24 h by hypaphorine (500 µM), IAA (5 µM), or a mix of both compounds (hyp-IAA treatment). Extracted RNA were then used to synthesize complex cDNA probes hybridized to the cDNA array.

Amongst the 4486 Populus genes analyzed, 121 (ca. 2.7%), showed a significant regulation in expression (Bayes Cyber-T, $p < 0.05$) following hypaphorine or/and IAA treatment (Table 1, Fig 2). Amongst these 121 regulated transcripts 17, 71 and 59 genes were up- or down-regulated, by hypaphorine, IAA or hypa-IAA treatments, respectively (Fig 3). a minimum of 56 genes were hypaphorine-responsive, whether hypaphorine was brought alone or in combination with IAA (Fig 3). As the Populus genome contains about 40 000 genes, extrapolation of the present results suggests that approximatively 500 hypaphorine-responsive genes probably occurs in Populus. Most of these hypaphorine-responsive genes appeared to be co-regulated by IAA (39 genes were responsive to the hyp-IAA treatment only, whereas 10 genes were responsive to the hypaphorine treatment

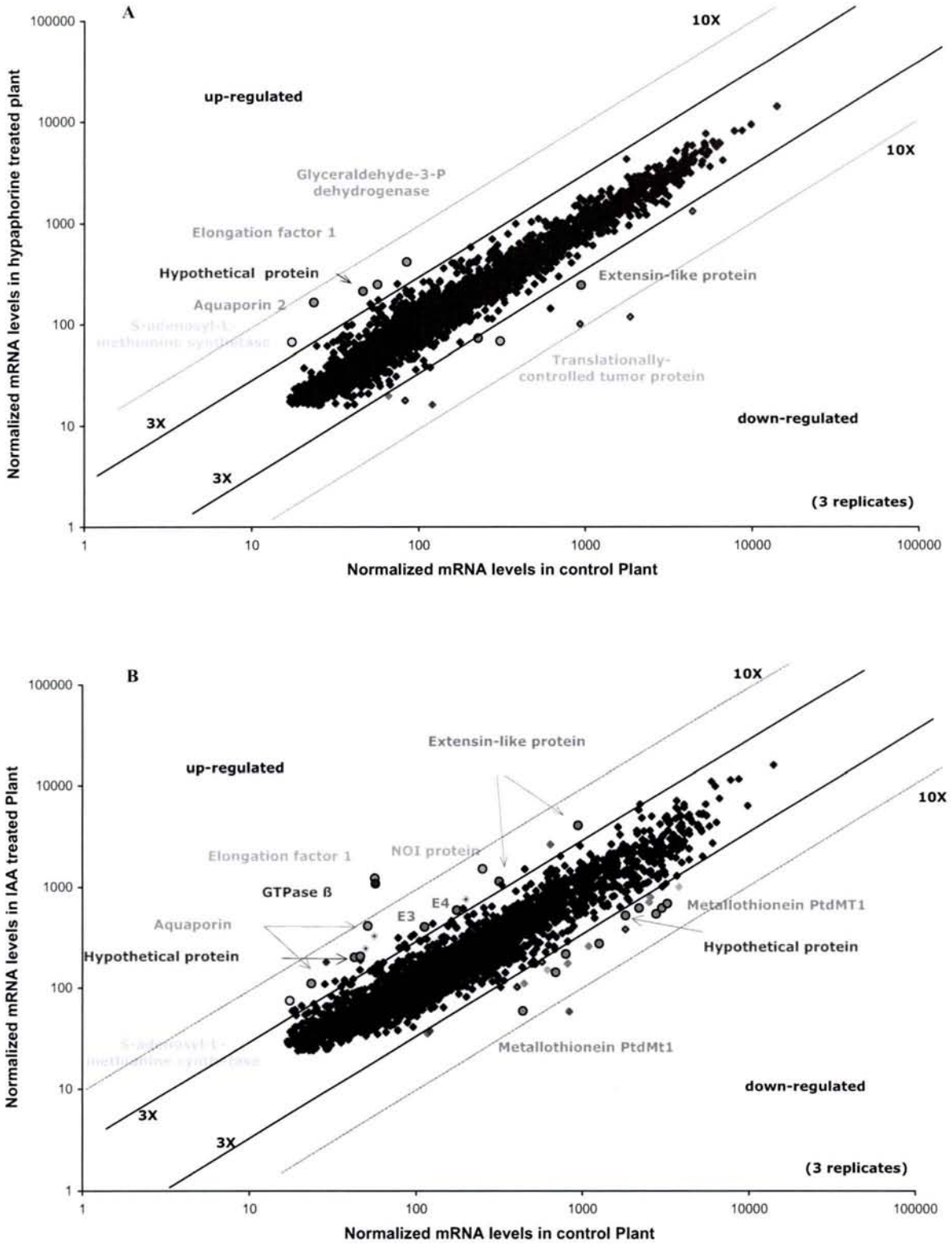
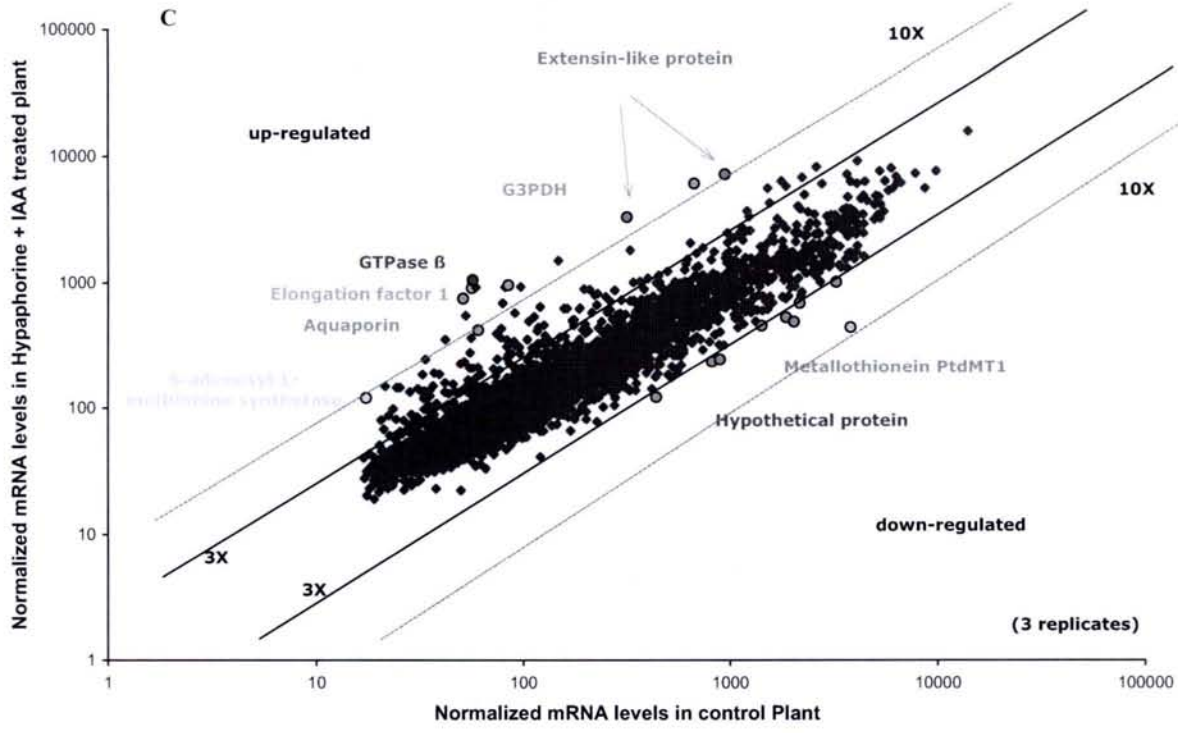


Fig 2: Expression profiles scatterplots of genes in treated and control roots (values are mean signal intensities of three replicate experiments). Hypaphorine treated vs control roots (**A**). IAA treated vs control roots (**B**). IAA + hypaphorine treated vs control roots **(C)**. Solid lines indicate 3.0 fold expression differences between treated and control roots ; broken lines indicate 10-fold expression differences.



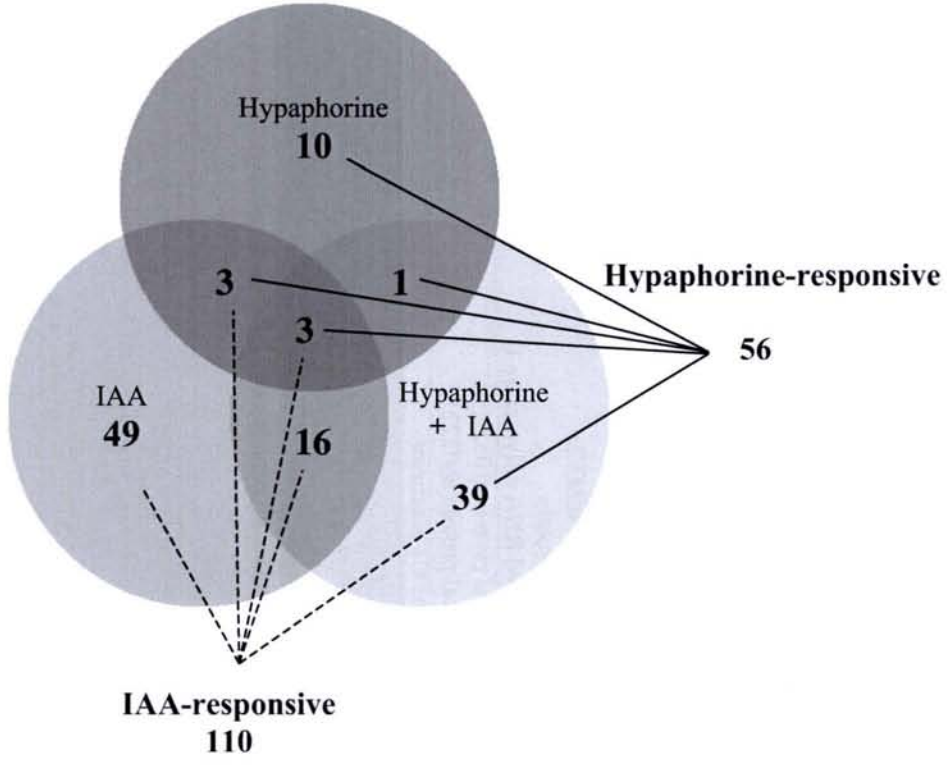


Fig 3: Venn diagram indicating the number of hypaphorine- and/or IAA-regulated transcripts in poplar roots (Difference expression $\geq$ 2 fold). Numbers in the overlapping areas indicate the number of regulated genes shared.

Tab 1. Hypaphorine and /or IAA –regulated genes. Differential gene expression in poplar roots after a treatment with hypaphorine (500 µM) **(1A)**, or IAA (5 µM) **(1B)**, or hypaphorine (500 µM) plus IAA (5 µM) **(1C)** compare to control treatment. The 121 transcripts with the highest and lowest expression ratios are listed with their Bayes value. Genes with significativ differentiel value (Bayes, $p < 0,05$) are marked in bold.

Tab 1A : Hypaphorine-regulated gene

GenBank accession no.	Clone ID	Best database match determined with Blast X	Hypa/ Control	Bayes,p	IAA/ Control	Bayes,p	IAA + Hypa / Control	Bayes,p
CA824966	R51B05	translationally-controlled tumor protein	**-3.98**	**0.018**	-1.82	0.154	-2.08	0.108
CA824902	R50B05	hypothetical protein	**-2.65**	**0.048**	-1.15	0.731	-1.77	0.151
CA824918	R50D02	metallothionein PtdMT1a	**-2.41**	**0.036**	**-4.77**	**0.003**	-1.82	0.130
CA826088	R72D02	hypothetical protein	**-2.16**	**0.027**	1.13	0.693	-1.27	0.505
CA824986	R51E03	proline-rich protein	**2.13**	**0.044**	-1.05	0.905	1.60	0.278
CA824632	R45G12	metallothionein PtdMT2a	**2.17**	**0.027**	2.82	0.068	14.65	0.079
CA824673	R46D09	hypothetical protein	**2.23**	**0.046**	1.57	0.277	2.14	0.113
CA821234	RA01D05	DNA-directed RNA polymerase II	**2.32**	**0.040**	1.28	0.447	1.01	0.981
CA825681	R64E09	hypothetical protein t10o22.15	**2.35**	**0.028**	1.25	0.487	2.53	0.139
CA826368	R77B03	hypothetical protein ab022215	**2.41**	**0.019**	1.06	0.877	2.22	0.085
CA825352	R57D12	cytochrome C1 precursor	**2.52**	**0.037**	2.02	0.116	1.28	0.475
CA824616	R45E11	aquaporin 2	**2.93**	**0.047**	**7.65**	**0.011**	13.85	0.082
CA824650	**R46B03**	**S-adenosyl-L-methionine synthetase**	**3.52**	**0.046**	**3.68**	**0.014**	**5.71**	**0.027**
CA821242	**RA01E04**	**elongation factor 1 alpha**	**4.06**	**0.016**	**20.61**	**0.034**	**15.27**	**0.046**
CA825770	R67C07	hypothetical protein	**4.37**	**0.046**	**3.82**	**0.039**	2.23	0.245
CA825377	R57H04	NAD-dependent glyceraldehyde-3-P dehydrogenase	**4.56**	**0.040**	-1.01	0.961	**11.06**	**0.028**

Tab 1B : IAA-regulated gene

GenBank accession no.	Clone ID	Best database match determined with Blast X	Hypa/ Control	Bayes,p	IAA/ Control	Bayes,p	IAA + Hypa / Control	Bayes,p
CA824892	R50A03	metallothionein PtdMT1b	-1.42	0.469	**-7.12**	**0.006**	**-3.50**	**0.022**
CA824417	R41G02	metallothionein PtdMT1a	-1.48	0.477	**-5.16**	**0.044**	-1.62	0.415
CA826184	R74A03	metallothionein PtdMT1a	-1.65	0.359	**-4.86**	**0.043**	-2.17	0.195
CA824918	R50D02	metallothionein PtdMT1a	**-2.41**	**0.036**	-4.77	**0.003**	-1.82	0.130
CA825284	R56D12	hypothetical protein	-1.44	0.435	**-4.77**	**0.013**	-1.30	0.555
CA826321	R76C11	metallothionein PtdMT1a	-1.28	0.637	**-4.72**	**0.033**	-3.08	0.074
CA825562	R61C02	metallothionein PtdMT2b	-1.33	0.443	**-4.63**	**0.006**	-1.54	0.322
CA825351	R57D11	metallothionein PtdMT1b	-1.48	0.392	**-4.56**	**0.015**	-2.09	0.138
CA822203	R04H12	metallothionein PtdMT1b	-1.21	0.638	**-4.19**	**0.013**	-2.01	0.126
CA824958	R51A03	metallothionein PtdMT1b	-1.04	0.908	**-3.93**	**0.004**	-1.12	0.806
CA825310	R56H02	metallothionein PtdMT1b	-1.72	0.186	**-3.63**	**0.012**	-2.31	0.060
CB239337	R62E10	metallothionein PtdMT1b	-1.04	0.934	**-3.58**	**0.043**	-2.76	0.085
CA825283	R56D11	metallothionein PtdMT1b	-1.42	0.472	**-3.57**	**0.039**	-1.30	0.628
CA826389	R77D09	hypothetical protein	-1.99	0.177	**-3.51**	**0.029**	-1.69	0.266
CA822673	R11G11	hypothetical protein f25c20.20	-1.20	0.626	**-3.16**	**0.016**	**-2.60**	**0.034**
CA825035	R52D05	cytoplasmic aldolase	-1.81	0.097	**-3.02**	**0.016**	**-2.40**	**0.035**
CA824443	R42B07	Kunitz trypsin proteinase inhibitor (thionin)	-1.09	0.848	**-2.84**	**0.039**	2.52	0.149
CA825372	R57G06	metallothionein PtdMT1a	-1.07	0.856	**-2.79**	**0.019**	-1.43	0.352
CA821005	F07B12	glutamine synthetase	-1.53	0.256	**-2.68**	**0.030**	**-2.75**	**0.030**
CA825952	R70C03	GTP-binding protein	-1.50	0.309	**-2.63**	**0.036**	-1.32	0.492
CA826023	R71C11	hypothetical protein	1.91	0.171	**-2.43**	**0.029**	1.02	0.972
CB307008	R01A07	asparagine synthetase	-1.76	0.107	**-2.40**	**0.023**	**-2.43**	**0.027**
CA825934	R70A01	proline-rich protein	-1.19	0.571	**-2.38**	**0.024**	-1.32	0.452
CA821271	RA01H03	60S ribosomal protein L6	1.01	0.972	**-2.26**	**0.049**	-1.28	0.562
CA823890	R33A04	germin	-1.43	0.234	**-2.22**	**0.017**	-1.95	0.051
CA824308	R39G07	aldehyde reductase	-1.15	0.659	**-2.20**	**0.028**	-1.79	0.103
CB833366	R19D03	leucine-rich repeat protein	-1.22	0.532	**-2.18**	**0.033**	-1.20	0.619
CA826332	R76E08	phosphoenolpyruvate carboxylase	-1.40	0.250	**-2.09**	**0.038**	-1.67	0.138
CA822941	R16F03	chalcone-flavonone isomerase	1.31	0.394	**2.11**	**0.046**	2.07	0.118
CA824589	R45A07	acid phosphatase (vegetative storage protein)	1.24	0.569	**2.12**	**0.038**	2.78	0.077
CA824837	R49C01	chloroplastic phosphoadenosine-phosphosulfate reductase	1.09	0.788	**2.14**	**0.028**	2.23	0.119
CA820717	F00D06	periaxin-like protein	1.25	0.484	**2.15**	**0.036**	**3.16**	**0.034**
CA826019	R71C06	fimbriata-associated (kinetochore protein skp1	1.19	0.719	**2.30**	**0.030**	1.84	0.159
CA824755	R47H01	mago nashi protein	1.48	0.257	**2.32**	**0.031**	1.81	0.140
CA824904	R50B07	hypothetical protein F28A21.20	1.48	0.424	**2.47**	**0.035**	2.13	0.114

Tab 1B : IAA-regulated gene (continuation)

GenBank accession no.	Clone ID	Best database match determined with Blast X	Hypa/ Control	Bayes,p	IAA/ Control	Bayes,p	IAA + Hypa / Control	Bayes,p
CA825468	R59E02	ubiquitin-specific protease 12	1.14	0.782	**2.52**	**0.048**	1.81	0.166
CA825190	R54H03	mitochondrial ATP synthase gamma chain	1.76	0.220	**2.54**	**0.022**	2.62	0.064
CA825214	R55C02	cytochrome C	1.12	0.807	**2.55**	**0.027**	1.59	0.257
CA824833	R49B09	branched-chain amino acid aminotransferase	1.72	0.099	**2.56**	**0.027**	3.35	0.069
CA823847	R32C07	proline-rich protein	1.34	0.385	**2.61**	**0.026**	2.34	0.059
CA824682	R46E10	elongation factor eF-2	-1.12	0.824	**2.62**	**0.039**	1.61	0.381
CA824791	R48E05	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	1.73	0.347	**2.68**	**0.028**	3.24	0.113
CA824608	R45D11	auxin-repressed dormancy protein	2.54	0.192	**2.69**	**0.029**	**9.81**	**0.021**
CA824620	R45F05	hypothetical protein	-1.49	0.447	**2.71**	**0.037**	2.18	0.135
CA823930	R33F08	senescence down-regulated SEND32 protein	1.12	0.714	**2.79**	**0.028**	**3.83**	**0.044**
CA824550	R44D01	extensin like protein	-1.76	0.302	**2.98**	**0.016**	**3.20**	**0.015**
CA826370	R77B05	AAA-type ATPase	1.45	0.461	**3.03**	**0.014**	**4.77**	**0.024**
CA824635	R45H04	aquaporin	2.04	0.141	**3.15**	**0.021**	**8.48**	**0.040**
CA825620	R63E07	hypothetical protein f17l21.8	1.18	0.697	**3.21**	**0.042**	1.86	0.205
CA822804	R14B01	proline-rich protein	1.28	0.509	**3.39**	**0.029**	2.92	0.062
CA821226	RA01C07	osmotin-like protein osm34 precursor	1.12	0.686	**3.43**	**0.039**	9.19	0.075
CA824614	R45E07	cytosolic cysteine synthase	1.11	0.761	**3.43**	**0.028**	3.61	0.075
CA824502	R43F01	periaxin-like proline-rich protein	1.09	0.807	**3.59**	**0.021**	**4.71**	**0.034**
CA824677	R46E01	gibberellin responsive SCARECROW-like modulator	2.29	0.101	**3.62**	**0.044**	4.25	0.087
CA824650	R46B03	S-adenosyl-L-methionine synthetase	**3.52**	**0.046**	**3.68**	**0.014**	**5.71**	**0.027**
CA824710	R47A06	40S ribosomal protein S9	1.41	0.283	**3.75**	**0.046**	2.37	0.095
CA825770	R67C07	hypothetical protein	**4.37**	**0.046**	**3.82**	**0.039**	2.23	0.245
CA825071	R53A07	elongation factor 1-alpha (ef-1-alpha)	1.94	0.149	**4.05**	**0.048**	5.41	0.073
CA824781	R48C12	aquaporin 2	5.82	0.070	**4.18**	**0.003**	**3.64**	**0.042**
CA824831	R49B06	hypothetical protein	-1.17	0.743	**4.27**	**0.005**	2.31	0.051
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
CA824870	R49F09	hypothetical protein	1.42	0.445	**4.48**	**0.008**	2.26	0.060
CA826433	R78B01	ribosomal protein L8	-1.49	0.474	**4.67**	**0.018**	4.35	0.065
CA824786	R48D09	peroxiredoxin TPX1	1.12	0.863	**5.35**	**0.010**	5.20	0.063
CA824788	R48D11	40S ribosomal protein S19	1.94	0.120	**5.51**	**0.002**	**6.11**	**0.043**
CA824732	R47D02	NADP-malic enzyme	1.52	0.404	**5.72**	**0.023**	**2.76**	**0.039**
CA824557	R44E01	nitrate-induced NOI protein	-1.79	0.073	**5.98**	**0.047**	3.12	0.090
CA824616	R45E11	aquaporin 2	**2.93**	**0.047**	**7.65**	**0.011**	13.85	0.082
CA821242	RA01E04	elongation factor 1 alpha	**4.06**	**0.016**	**20.61**	**0.034**	**15.27**	**0.046**

Tab 1C : (IAA+hypaphorine)-regulated gene

GenBank accession no.	Clone ID	Best database match determined with Blast X	Hypa/ Control	Bayes,p	IAA/ Control	Bayes,p	IAA + Hypa / Control	Bayes,p
CA823684	R29G07	metallothionein PtdMT1b	-1.11	0.809	-1.79	0.250	**-4.09**	**0.025**
CA826190	R74A10	metallothionein PtdMT1a	-1.32	0.444	-1.38	0.378	**-3.62**	**0.012**
CA824892	R50A03	metallothionein PtdMT1b	-1.42	0.469	**-7.12**	**0.006**	**-3.50**	**0.022**
CA826373	R77B11	metallothionein PtdMT1b	-1.44	0.378	-2.05	0.105	**-3.00**	**0.035**
CA823936	R34G06	late-embryogenesis protein LEA5	-1.20	0.587	-1.34	0.442	**-2.91**	**0.018**
CA823275	R23D01	clathrin coat assembly protein ap17 - maize	-1.09	0.822	-1.49	0.282	**-2.83**	**0.024**
CA821005	F07B12	glutamine synthetase	-1.53	0.256	**-2.68**	**0.030**	**-2.75**	**0.030**
CA826344	R76G04	metallothionein PtdMT1a	-1.52	0.270	-2.10	0.090	**-2.68**	**0.030**
CA823602	R28G01	hypothetical protein	-1.04	0.901	-1.62	0.213	**-2.67**	**0.031**
CA822673	R11G11	hypothetical protein f25c20.20	-1.20	0.626	**-3.16**	**0.016**	**-2.60**	**0.034**
CA823567	R28C02	hypothetical protein t19e23.9	-1.07	0.820	-1.45	0.272	**-2.60**	**0.019**
CA823129	R21C04	similarity to S-locus protein	-1.05	0.897	1.20	0.645	**-2.59**	**0.038**
CA823497	R27B08	hypothetical protein	-1.07	0.850	-1.16	0.661	**-2.59**	**0.032**
CA824364	R40G04	hypothetical protein ref|np_065141.1	-1.02	0.957	-1.08	0.793	**-2.52**	**0.028**
CA823710	R30B07	chalcone--flavonone isomerase	1.00	0.999	-1.34	0.470	**-2.50**	**0.049**
CB307008	R01A07	asparagine synthetase	-1.76	0.107	**-2.40**	**0.023**	**-2.43**	**0.027**
CA825035	R52D05	cytoplasmic aldolase	-1.81	0.097	**-3.02**	**0.016**	**-2.40**	**0.035**
CA823739	R30E11	RNA-binding protein	-1.06	0.852	-1.38	0.365	**-2.38**	**0.037**
CA823300	R23G02	hypothetical protein	1.02	0.957	-1.39	0.298	**-2.20**	**0.042**
CA825738	R65F07	suspensor-specific protein	1.02	0.957	-1.91	0.051	**-2.16**	**0.031**
CA823883	R32H06	pEARLI 1 protein	-1.35	0.550	1.50	0.289	**2.32**	**0.036**
CA825997	R71A02	survival protein	1.93	0.275	1.60	0.262	**2.74**	**0.041**
CA824732	R47D02	NADP-malic enzyme	1.52	0.404	**5.72**	**0.023**	**2.76**	**0.039**
CA825365	R57F10	hypothetical protein	1.34	0.553	2.19	0.086	**2.77**	**0.036**
CA825335	R57C02	5'-adenylylsulfate reductase	1.05	0.884	2.16	0.088	**2.82**	**0.035**
CA824670	R46D03	hypothetical protein f15p23.3	1.36	0.620	2.58	0.050	**2.92**	**0.048**
CA824503	R43F02	hypothetical protein 39057-40250	-1.42	0.279	2.83	0.075	**3.02**	**0.046**
CA820717	F00D06	periaxin-like protein	1.25	0.484	**2.15**	**0.036**	**3.16**	**0.034**
CA824550	R44D01	extensin like protein	-1.76	0.302	**2.98**	**0.016**	**3.20**	**0.015**
CB833313	R01B12	extensin	-1.20	0.718	-1.24	0.659	**3.25**	**0.021**
CA824742	R47E05	hypothetical protein	1.42	0.458	2.02	0.193	**3.25**	**0.027**
CA824781	R48C12	aquaporin 2	5.82	0.070	**4.18**	**0.003**	**3.64**	**0.042**
CA825200	R55A04	polyubiquitin	2.13	0.329	1.48	0.492	**3.65**	**0.042**
CA824922	R50D09	hypothetical protein	1.97	0.143	2.80	0.084	**3.65**	**0.017**

Tab 1C : (IAA+hypaphorine)-regulated gene (continuation)

GenBank accession no.	Clone ID	Best database match determined with Blast X	Hypa/ Control	Bayes,p	IAA/ Control	Bayes,p	IAA + Hypa / Control	Bayes,p
CA824600	R45C07	40S ribosomal protein S19	1.75	0.165	2.46	0.075	**3.67**	**0.049**
CA824536	R44B09	water-stress induced aquaporin TIP	1.04	0.959	2.39	0.138	**3.73**	**0.049**
CA825786	R67E06	NADH-aldehyde dehydrogenase	1.56	0.327	1.81	0.214	**3.73**	**0.038**
CA824825	R49A10	translation initiation factor eIF-4A	1.05	0.920	1.46	0.368	**3.74**	**0.039**
CA825363	R57F08	cytochrome C1 precursor	2.25	0.101	**2.27**	**0.042**	**3.74**	**0.031**
CA823930	R33F08	senescence down-regulated SEND32 protein	1.12	0.714	**2.79**	**0.028**	**3.83**	**0.044**
CA824864	R49E11	60S ribosomal protein L39	-1.20	0.661	-1.35	0.350	**4.16**	**0.024**
CA824418	R41G03	ubiquinol-cytochrome c reductase complex, 6.7 kd protein	1.18	0.717	1.08	0.835	**4.26**	**0.048**
CA824805	R48G02	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	1.46	0.683	1.77	0.417	**4.33**	**0.038**
CA824502	R43F01	periaxin-like proline-rich protein	1.09	0.807	**3.59**	**0.021**	**4.71**	**0.034**
CA826370	R77B05	AAA-type ATPase	1.45	0.461	**3.03**	**0.014**	**4.77**	**0.024**
CA824945	R50G06	ATP-citrate-lyase	2.53	0.136	2.15	0.152	**5.30**	**0.006**
CA824650	R46B03	S-adenosyl-L-methionine synthetase	**3.52**	**0.046**	**3.68**	**0.014**	**5.71**	**0.027**
CA824854	R49E01	aspartic proteinase 3	1.40	0.586	2.24	0.126	**5.88**	**0.048**
CA824788	R48D11	40S ribosomal protein S19	1.94	0.120	**5.51**	**0.002**	**6.11**	**0.043**
CA824719	R47B07	aquaporin SPCP2	2.34	0.207	2.49	0.112	**6.65**	**0.034**
CA824635	R45H04	aquaporin	2.04	0.141	**3.15**	**0.021**	**8.48**	**0.040**
CA824608	R45D11	auxin-repressed dormancy protein	2.54	0.192	**2.69**	**0.029**	**9.81**	**0.021**
CA824780	R48C11	extensin-like protein	1.03	0.944	3.60	0.148	**10.66**	**0.044**
CA825377	R57H04	NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	**4.56**	**0.040**	-1.01	0.961	**11.06**	**0.028**
CA821242	RA01E04	elongation factor 1 alpha	**4.06**	**0.016**	**20.61**	**0.034**	**15.27**	**0.046**
CA825225	R55D11	GTPase, beta subunit	1.39	0.388	17.73	0.063	**17.54**	**0.049**

only). A minimum of 110 genes were IAA-responsive, wether IAA was brought alone or in combination with hypaphorine (Fig 3). Extrapolation indicates that ca. 1000 IAA-responsive-genes could be expected in the Populus genome.

Identification of hypaphorine- and IAA-responsive genes

Whithin the 65 IAA-regulated genes (Fig 3), we found genes coding for metallothioneins and cell wall proteins, aquaporins, a WD-GTPase (Fig 4). Eleven transcripts are responding only to hypaphorine (mainly hypothetical proteins) and 6 are responding to both treatments. Among these 6 genes, hypaphorine-responsive and IAA-responsive, 5 were up- or down- regulated in the same way by both molecules (ie. a S-adenosyl-L-methionine synthetase, an elongation factor 1 alpha, a aquaporin) (Fig 4), while only one transcript, coding for an extensin-like protein (Tab 1, Fig 4), was regulated the opposite way by hypaphorine and IAA.

Three genes are significantly regulated by both hypaphorine and IAA as well as by their combination (Fig 3). Hypaphorine and IAA are up-regulating two of them, coding for a S-adenosyl-L-methionine synthetase and an elongation factor 1 alpha. In one case, the gene coding for a S-adenosyl-L-methionine synthetase, additive activity of hypaphorine and IAA was evidenced (Fig 4). Hypaphorine incubation led to the down-regulation a gene coding for an extensin-like protein, while it was up-regulated by IAA incubation, but hypaphorine supply together with IAA did not clearly altered IAA response.

Discussion

As shown for Eucalyptus or Arabidopsis seedlings (Ditengou and Lapeyrie 2000, Reboutier et al. 2002), Populus root system was affected by IAA or hypaphorine treatments. Hypaphorine inhibited root hair elongation and counteracted IAA activity in poplar roots. Hypaphorine and IAA have been shown to counteract competitively, in vivo in Eucalyptus roots (Jambois et al. 2004a) as well as in vitro on a peroxidase (Kawano et al. 2001, Kawano et al. 2002).

Extrapolation of data recorded on 4486 genes suggests that among Populus genome 500 genes could be hypaphorine-responsive and 1000 IAA-responsive. Here 2.45 % of Populus genes appeared to be IAA-responsive which is in the same range of magnitude than in Arabidopsis (1.37 % calculated from data published by Redman et al. 2004). While hypaphorine activity has been investigated here for the first time at that scale, the figure recorded here, 1.25% of

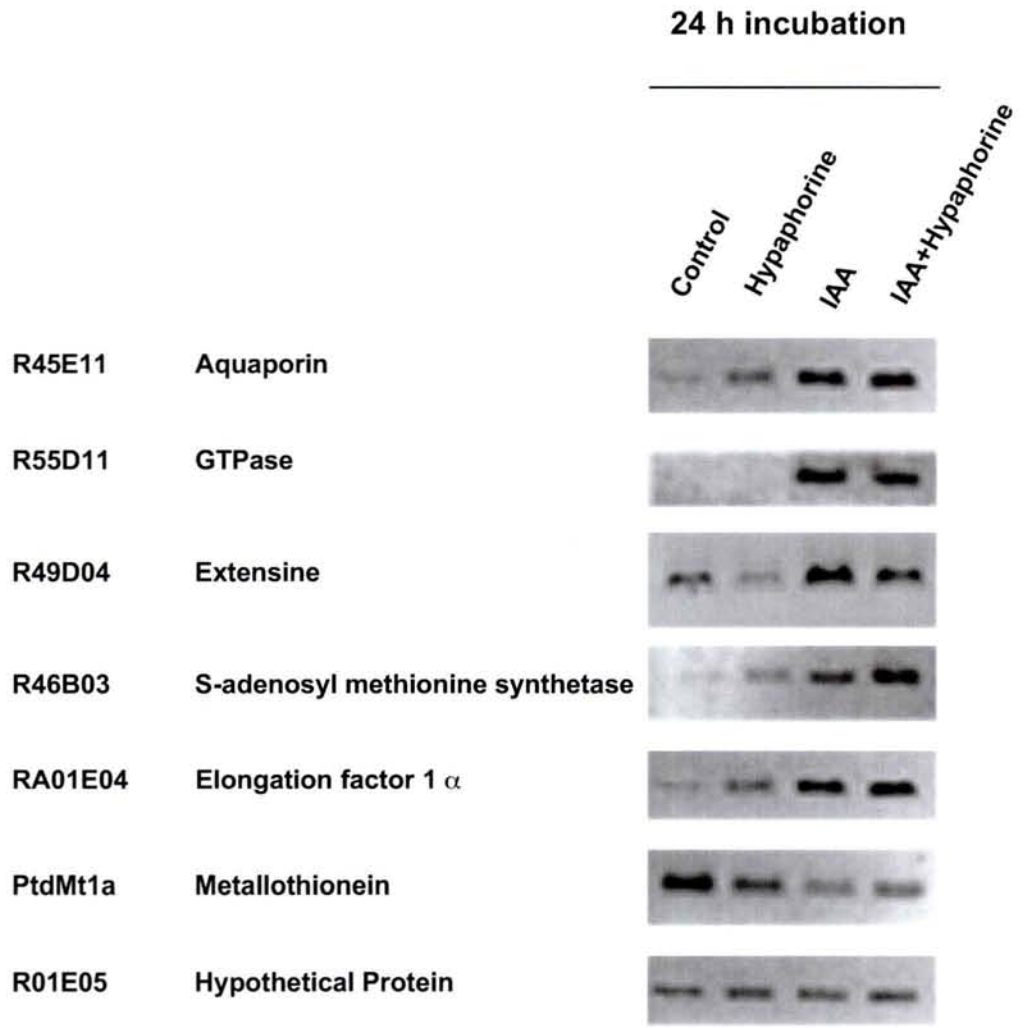


Fig 4 : Regulation of *genes* expression by hypaphorine (0-5 µM final concentration in Murashige and Skoog liquid nutrient medium) and/or IAA (0-5 µM final concentration in MS liquid nutrient medium) analysed by semi-quantitativ RT-PCR.

hypaphorine-responsive genes, support the idea that hypaphorine as other indole alcaloïdes with similar activities (Jambois et al. 2004b), could have significant impact on plant physiology and development.
While the hypaphorine/IAA competitive antagonism has been reported at the organ development (Jambois et al. 2004b)and protein-binding levels (Kawano et al. 2001, Kawano et al. 2002), gene profiling revealed here only one single gene, coding for an extensin-like protein, being regulated opposite ways by hypaphorine (downregulated) and by IAA (upregulated). All other five genes regulated by both hypaphorine and IAA, were responding in the same direction. Such apparent paradox of auxin responsive genes being similarly regulated by IAA and an auxin antagonist, might suggest that these genes have a rather low impact on plant physiology and development when triggered by IAA.

Cell walls and extra-cellular matrices have been suggested to play key roles in mycorrhiza formation (Martin et al. 1999, Tagu et al. 2002). They must control cell extension and growth in plant and fungi. They are the first cellular structures getting in contact between the two partners; apoplastic space is an obligate way for signaling molecules and metabolites. Cell walls are connected to plasma membranes where receptors are anchored and cell walls are responsible, together with the cytoskeleton, for maintening the cell structure and integrity. Mycorrhiza formation is associated with drastic changes in the composition and structure of plant and fungus cell walls or extracellular matrices (Bonfante 2001). Ectomycorrhizal symbioses regulated cell-wall polypeptides habe been identified in ectomycorhizal fungus (Laurent et al. 1999, Martin et al. 1999, Voiblet et al. 2001). In the host plant Pinus Pinaster, Pp-C61 a gene coding for a cell-wall polypeptide is up-regulated by IAA and by ectomycorhizal inoculation (Reddy et al. 2003). Here 11 EST coding for cell wall proteins have been shown to be regulated either by IAA or hypaphorine, supporting the idea that cell wall and extracellular matrice alterations during ectomycorrhizae ontognesis could be due, in part, to hypaphorine and IAA activities.

Materiels and methods

Chemicals

Hypaphorine was synthesised in vitro from tryptophan (Romburgh and Barger 1911). The purity of the product was determined by NMR, chemical and HPLC analysis (Beguiristain et al. 1995). IAA (indole-3-acetic acid) was purchased from Sigma (St Louis MO).
Plant Material

Tab. 2 : Specific primers used for RT-PCR

Clone ID	putativ function	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
PtdMT1a	Metallothionein type 1a	TGG CTG TAG CTG TGG CTC TGA	CAT CTT AAC TGG TGC AAC
R55D11	GTPase ß subunit	CCC TTA TTC TTC GAG GCA CC	GCT CGC CGT CCC AGG AAC C
R46B03	S-adenosyl-methionine synthetase	CTC GCT CTC GCA TTT GAG	CAT CGA GGC CAA CGT CAG
RA01E04	Elongation facteur 1 alpha	GAG GTT CGA GAA GGA AGC TG	GGA TGG CCA GAC CCG TGA GC
R49D04	Extensin-like protein	CCA AGC CCT TCC RGT GGA AAG TGC CC	CCC ARG ATG TTA GCT TTG ATG GCA G
R01E05	Hypothetical protein	GTG CCA CTT GAG GAA TTC AGG G	GAG ATC ATC CAC AGC ATC AAT CAG
R45E11	Aquaporin	GCT GGT ATT TCA GGG GGT CAC	GGC ACA TGG GAG TCC CTA GCA C

Confirmation that poplar is hypaphorine/IAA responsive

Cuttings from the hybrid poplar P.x canescens Sm. (Populus. tremula L. x Populus alba L.) cv 717-1-B4 were transferred on agar Murashige and Shoog modified solid medium (0.5X of MS basal salt macronutrient solution SIGMA ; 1X of MS basal salt micronutrient solution SIGMA ; 100 mg/L myo-inositol; 200 mg L-glutamine ; 1 g/L glucose; 12 g/L agar; and 10 ml of organic solution (100 mg/L nictotinic acid ; 100 mg/L piridoxine ; 100 mg/L thiamine ; 100 mg calcium-penthontenate ; 100 mg L-cysteine chlorhydrate ; 1mg/L D-biotin), and grown in a controlled environment growth chamber (17h light period at 1000 µE/m2/s at 23°C). The roots of two week old plantlets were treated with hypaphorine (0-500 µM final concentration in agar) and IAA (0-5 µM final concentration in agar) and returned to the growth chamber. Seven days after treatment primary root elongation was recorded and root hair length recorded under a dissecting microscope, 20 mm behind the apex. The position of root at treatment time has been marked on Petri Dish.

Gene expression regulation by hypaphorine and IAA

Poplar 717-1-B4 cuttings were transferred in test tube with 8ml per tube of modified Murashige and Shoog liquid medium (as described above without agar). Cuttings were maintened in the tube with a wire mesh and grown in a controlled environment chamber.

After one month, the plantlets bearing a thin white roots and four to seven green leaves were selected and incubated for 24h with hypaphorine (0-500 µM, final concentration in liquid medium) and/or IAA (0-5 µM, final concentration in liquid medium). Then, root tissues were harvested, frozen in liquid N2, and stored at –80°C before RNA extraction. Roots from a minimum of four plants were pooled for each treatment.

RNA extraction

Total RNA extraction was performed with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) from 50 mg of frozen (-80°C) material. For RNA extraction from root tissues, 20 mg/ml of polyethyleneglycol (PEG) 8000 and 10 µl/ml of ßmercaptoethanol (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) were added to the Qiagen homogenization buffer containing guanidine hydrochloride. DNase I (Qiagen, Courtaboeuf, France) treatment was included in the extraction procedure according to the manufacturer's instructions to eliminate traces of genomic DNA.

cDNA library construction, generation and analysis of cDNA arrays

Three cDNA libraries (i.e., adventitious roots, water stressed roots, and expanding leaves from hybrid poplar Populus trichocarpa x Populus deltoïdes cv Beaupré) were constructed as described by Kohler et al. (2003) using the SMART cDNA synthesis kit in lTriplEx2 (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Library R was made from the adventitious root system of two-month-old rooted cuttings. For the library RSH, the root system of two-month-old plants that were drought-stressed during 19 days was used. Library F was constructed from expanding leaves of two-month-old poplar plants. DNA sequencing, sequence processing and analysis were previously described (Kohler et al. 2003). A Unigene set was selected from the ESTs from adventitious roots (library R) and leaves (Library F) (Kohler et al. 2003). Then 4608 PCR-amplified cDNA inserts corresponding to 486 poplar leaves and 4000 poplar roots expressed sequence tags (ESTs) (Kohler et al. 2003), were spotted onto nylon membranes by using the BioGrid arrayer (BioRobotics, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instruction (Eurogentec, Saraing, Belgium). Controls (human desmine, sequence of the pTriplEx2 polylinker) were also spotted to assess the level of non-specific hybridization.

The transcript populations of treated roots were separately amplified, 33P-labelled, and hybridized to nylon microarrays as described before (Lacourt et al. 2002).

Air-dried filters were then wrapped in plastic foils and exposed to a phosphor screen (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) for varying periods (24 h to 3 days), after which the imaging plate was scanned by a Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at a resolution of 50 µm per pixel. Three replicate experiments have been carried out to analyse the effect of hypaphorine and/or IAA treatment on root-gene expression. These replicate experiments were all analysed with different nylon microarrays.

The raw image data obtained with the phosphorimager imaging system were imported into the X-DOTREADER programme (version 2.0; Cose, Paris, France) and quantified. Detection and quantification of the signals were performed using the 'volume quantification' method. Each spot was defined by automatic grid positioning over the array image and average pixel intensity of each spot was determined. Net signal was determined by substraction of the local surrounding background from the intensity for each spot. The data table generated by XDOTREADER, containing the intensity of each spot, was then exported to the EXCEL X:mac worksheet programme (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) for further manipulation. Spots that had an intensity of less than two-fold that of the background were flagged as undetectable and had their intensity raised to a minimum threshold value of 0.1 to avoid spurious expression level ratios at the bottom of the spot intensity range. To take account of experimental variations in specific activity of the cDNA probe preparations or exposure time that might alter the signal intensity, the raw data obtained from different hybridizations were

normalized (scaled) by dividing the intensity for each spot by the average of the intensities of all the spots present on the filter, to obtain a centered, normalized value (Eisen et al., 1998). A Microsoft EXCEL spreadsheet with the full data set of transcripts will be available on the PoplarDB web site (http://mycor.nancy.inra.fr/poplardb/).
Data quality assessment was performed using a Bayesian statistical framework implemented in the Cyber-T web interface (http://www.igb.uci.edu/servers/cybert/) (Long et al., 2001). Data quality assessment was performed using analysis of variance (t-test) and a Bayesian statistical framework implemented in the Cyber-T web interface (http://www.igb.uci.edu/servers/cybert/) (Long et al., 2001).

Semi quantitativ RT-PCR

The regulation of seven genes (R49D04, extensin like protein ; R46B03, S-adenosyl-L-methionine synthetase ; R55D11, GTPase ; PtdMT1a, metallothionein ; R45E11, aquaporin ; RA01E04, elongation factor 1 alpha ; R01E05, hypothetical protein) was confirmed by semi quantitative RT-PCR in each of the three replicate experiments. First strand cDNA was synthesized from 600 ng DNase-treated total RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in a total volume of 20 µl according to the manufacturer's instructions. One µl of RT products were amplified by PCR in the following conditions: 94°C for 2 min followed by 20 to 35 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 45 s and a final extension at 72°C for 2 min. The specific primers listed in Table 2 were used for PCR. Aliquots of 5 to 10 µl of the PCR products were run on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Gels were visualized under UV-light and images were taken using a gel documentation system (Vilber Lourmant, Marne-la-Vallée, France). TIFF images were uploaded in Adobe Photoshop and a negative version of the images is shown in the figures. All PCRs were replicated at least twice using first strand cDNA from two independant RNA preparations (i.e., biological repeats).

Acknowledgements

The authors are grateful to Pr Claude Selve, Christine Gerardin and Joelle Gérard (Université Henri Poincaré, France) for helping to synthesise hypaphorine and to Sophie Kotowski and Maxime Lhuillier for helpful technical contribution.

References

Beguiristain T, Cote R, Rubini P, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (1995) Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry 40: 1089-1091

Bonfante P (2001) At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. - *In* The Mycota IX Fungal Associations (Hock, ed), pp. 45-61. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Charvet-Candela V, Hitchin S, Reddy MS, Cournoyer B, Marmeisse R, Gay G (2002) Characterization of a *Pinus pinaster* cDNA encoding an auxin up-regulated putative peroxidase in roots. Tree Physiol 22: 231-238

Dean RA (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. Annu Rev Phytopathol 35: 211-234

Ditengou FA, Beguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211: 722-728

Ditengou FA, Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. Mol Plant Microbe Interact 13: 151-158

Ditengou FA, Raudaskoski M, Lapeyrie F (2003) Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs. Planta 218: 217–225

Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud J (1994) Auxin overproducer mutants of Hebeloma cylindrosporum Romagnesi have increased mycorrhizal activity. New Phytol. 128: 645-657

Gea L, Normand L, Vian B, Gay G (1994) Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. New Phytol. 128: 659-670

Hahn (2000) The rust fungi.Cytology, physiology and molecular biology infection. - *In* Fungal Pathology (K. JW, ed), pp. 267-306. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Harley J, Smith S (1983) The causal anatomy of ectomycorrhizas. - *In* Mycorrhizal Symbiosis, pp. 299-316. Academic Press.

Jambois A, Dauphin A, Kawano T, Bouteau F, Legué V, Lapeyrie F (2005) Competition between IAA and hypaphorine must contribute to regulate ontogenesis. Physiol Plant. In press

Jambois A, Ditengou FA, Kawano T, Delbarre A, Lapeyrie F (2005) The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid-specific competitors which do not alter auxin transport. Physiol Plant 120: 501-508

Katagiri F (2004) A global view of defense gene expression regulation – a highly interconnected signaling network. Current Opinion in Plant Biology 7: 506-511

Kawano T, Kawano N, Hosoya H, Lapeyrie F (2001) Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. Biochem Biophys Res Commun 288: 546-551

Kawano T, Kawano N, Lapeyrie F (2002) A fungal auxin antagonist, hypaphorine prevents the indole-3-acetic acid-dependent irreversible inactivation of horseradish peroxidase: inhibition of Compound III-mediated formation of P-670. Biochem Biophys Res Commun 294: 553-559

Kohler A, Blaudez D, Chalot M, Martin F (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. New Phytol. 164: 83-94

Kohler A, Delaruelle C, Martin D, Encelot N, Martin F (2003) The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. FEBS Lett 542: 37-41

Lacourt I, Duplessis S, Abba S, Bonfante P, Martin F (2002) Isolation and characterization of differentially expressed genes in the mycelium and fruit body of *Tuber borchii*. Appl Environ Microbiol 68: 4574-4582

Laurent P, Voiblet C, Tagu D, De Carvalho D, Nehls U, De Bellis R, Balestrini R, Bauw G, Bonfante P, Martin F (1999) A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. Mol Plant Microbe Interact 12: 862-871

Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. Microbiol Mol Biol Rev 64: 746-785

Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F (2001) Developmental Cross Talking in the Ectomycorrhizal Symbiosis: Signals and Communication Genes. New Phytol. 151: 145-154

Martin F, Laurent P, de Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, Bonfante P, Tagu D (1999) Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. Fungal Genet Biol 27: 161-174

Reboutier D, Bianchi M, Brault M, Roux C, Dauphin A, Rona JP, Legue V, Lapeyrie F, Bouteau F (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Interact 15: 932-938

Reddy S, Pandey A, Melayah D, Marmeisse R, Gay G (2003) The auxin responsive gene Pp-C61 is up-regulated in *Pinus pinaster* roots following inoculation with ectomycorrhizal fungi. Plant, Cell and Environment 26: 681-691

Romburgh PV, Barger G (1911) Preparation of the betaine of tryptophan and its identity with the alkaloid hypaphorine. J. Am. Chem. Soc. 99: 2068-2070

Tagu D, Lapeyrie F, Martin F (2002) The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. Plant and Soil 244: 97-105

Tranvan H, Habricot Y, Jeannette E, Gay G, Sotta B (2000) Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. Tree Physiol 20: 123-129

Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. The Plant Journal 25: 181-191

SYNTHÈSE DES CONNAISSANCES ET DISCUSSION GÉNÉRALE : RÔLE ET MODE D'ACTION DE L'HYPAPHORINE

Anne Jambois [a*], Aurélien Dauphin [a*], Tomonori Kawano [b], Franck Anicet Ditengou [c], François Bouteau [d], Valérie Legué [a] and Frédéric Lapeyrie [a,1]

Competitive antagonism between IAA and indole alkaloid hypaphorine must contribute to regulate ontogenesis

[a] Unité Mixte de Recherche INRA-UHP Interactions Arbres/Micro-organismes, Institut National de la Recherche Agronomique, F-54280 Champenoux, France

[b] The University of Kitakyushu, 1-1 Hibikino, Wakamatsu-Ward, 808-0135 Kitakyushu, Japan

[c] Albert-Ludwigs, Universität Frieburg, Institüt für Biologie II, Zellbiologie, Schänzlestr, 1-79104 Frieburg, Germany

[d] Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes (LEM) EA 3514, Université Denis Diderot - Paris 7, Case 7069, 2 place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05, France

[1] Corresponding author, e-mail: lapeyrie@nancy.inra.fr

[*] Joint first authorship

PHYSIOLOGIA PLANTARUM 123: 120–129. 2005
Printed in Denmark – all rights reserved

doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00474.x
Copyright © Physiologia Plantarum 2005

Review

Competitive antagonism between IAA and indole alkaloid hypaphorine must contribute to regulate ontogenesis

Anne Jambois[a,1], Aurélien Dauphin[a,1], Tomonori Kawano[b], Franck Anicet Ditengou[c], François Bouteau[d], Valérie Legué[a] and Frédéric Lapeyrie[a,*]

[a]*Unité Mixte de Recherche INRA–UHP Interactions Arbres/Micro-organismes, Institut National de la Recherche Agronomique, F-54280 Champenoux, France*
[b]*The University of Kitakyushu, 1–1 Hibikino, Wakamatsu-Ward, 808–0135 Kitakyushu, Japan*
[c]*Albert-Ludwigs-Universität Frieburg, Institüt für Biologie II, Zellbiologie, Schänzlestr, 1–79104 Frieburg, Germany*
[d]*Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes (LEM) EA 3514, Université Denis Diderot – Paris 7, Case 7069, 2 place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05, France*
[1]*Joint first authorship*
**Corresponding author, e-mail: lapeyrie@nancy.inra.fr*

Received 6 September 2004; revised 3 December 2004

Since 1995 the role of fungal hypaphorine in plants has been widely investigated and its IAA-antagonist activity recognized. Evidence of competitive antagonism includes organ development, gene expression or molecule–molecule interaction levels. Based on present knowledge, three sites of hypaphorine/IAA competition and subsequent signalling pathways have been hypothesized: the extracellular signalling pathway, the intracellular signalling pathway, and the transmembrane signalling pathway. Hypaphorine with other active indole alkaloids should be regarded as a new class of IAA antagonist finely regulating specific steps of plant growth or development.

Introduction: symbiosis between plant root and soil fungi, ectomycorrhiza ontogenesis

Ectomycorrhizae are symbiotic associations between up to 95% of short roots of land trees and soil fungi in boreal, temperate as well as some tropical forests. The establishment of ectomycorrhiza, the symbiotic organ, leads to change both in fungi with formation of a mantle and a Hartig net and in roots with stimulation of lateral root initiation, absence of root hairs and in some species, radial elongation of root cortical cells (Smith and Read 1997). Such reorientation in plant and fungus development must be regulated by the exchange, from early stages, of signalling molecules between the two partners.

Unlike plant pathogen interactions, where elements of the signal transduction pathways are well documented (Dean 1997, Hahn 2000, Lengeler et al. 2000), our understanding of the molecular basis for signal perception and transduction in mycorrhizae is still extremely limited. Evidence for the role of phytohormones in ectomycorrhiza ontogenesis came from the phenotype of an auxin-overproducing mutant of *Hebeloma cylindrosporum*. *Pinus pinaster* inoculated with this mutant strain produced an increased number of ectomycorrhizal roots (Gay et al. 1994, Gea et al. 1994) with a highly developed Hartig net (Tranvan et al. 2000); genes identified as auxin-regulated genes were up-regulated (Charvet-Candela et al. 2002). These data indicated that some morphogenetic steps are dependent on indole-3-acetic acid (IAA) delivered by the fungus. In 1995, hypaphorine, a major indolic compound was purified for the first time from a micro-organism in pure culture, the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Beguiristain et al. 1995). While the authors were investigating the regulation of *Pisolithus tinctorius/Eucalyptus globulus* ectomycorrhizae development, they had no knowledge regarding the role of this abundant indole alkaloid.

Abbreviations – ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; IAA, indole-3-acetic acid.

Since 1995 the role of fungal hypaphorine in plants has been widely investigated and its IAA antagonist activity recognized. Evidence of antagonism includes organ development, gene expression or molecule–molecule interaction levels. Such evidence will be reviewed here and a new hypothesis proposed with regard to the ways hypaphorine might contribute to fine tuning of ectomycorrhizal ontogenesis as well as plant development.

Indole alkaloid hypaphorine in plants and fungi

Hypaphorine was first isolated from seeds of *Erythrina hypaphorus* by Greshoff in 1890 and later hypaphorine was shown to be the betaine of tryptophan (Romburgh and Barger 1911). This small indole alkaloid (MW: 246.3 $g\,mol^{-1}$) is a weak acid with a carboxylic function (pKa = 1.79), sharing an indole ring with IAA (Fig. 1). Since then, hypaphorine has been detected in several other higher plants: *Desmodium trifolium* (Ghosal et al. 1971), *Desmodium girans* (Ghosal et al. 1972), *Sida cordifolia* (Ghosal et al. 1975), *Lens culinaris* (Hofinger et al. 1975), *Pterocarpus officinalis* (Janzen et al. 1982), South American Moraceae (Shrestha and Bisset 1991), *Abrus precatorius* (Dimetry et al. 1992), *Glycyrrhiza yunnanensis* (Ohtani et al. 1992) or Caragana species (Chen et al. 2001). Recently, we detected hypaphorine in *Eucalyptus globulus* seedling shoot but not in roots (detection limit: 0.001 $nmol\,g^{-1}$ FW) (unpublished data).

Among fungi, hypaphorine has been reported in *Agaricus arvensis* fruit-bodies (Marklova and Hais 1986) and purified from *Pisolithus tinctorius* hyphae (Beguiristain et al. 1995). Although hypaphorine concentration in *P. tinctorius* colonies varies 18-fold depending on strain, hypaphorine accumulation seems to be a characteristic of *P. tinctorius* since hypaphorine could not be detected in four other ectomycorrhizal species analysed, including the tryptophan- and IAA-overproducing mutants of *Hebeloma cylindrosporum* (Beguiristain et al. 1995). It is noteworthy that the hypaphorine concentration in a *P. tinctorius* strain (approximately 5 $\mu mol\,g^{-1}$ FW) can be 1000 times higher than the IAA concentration (Beguiristain et al. 1995). Hypaphorine concentration in *P. tinctorius* colonies follows a gradient with approximately 10-fold higher concentrations in the youngest hyphae at the end of the colony (Beguiristain and Lapeyrie 1997).

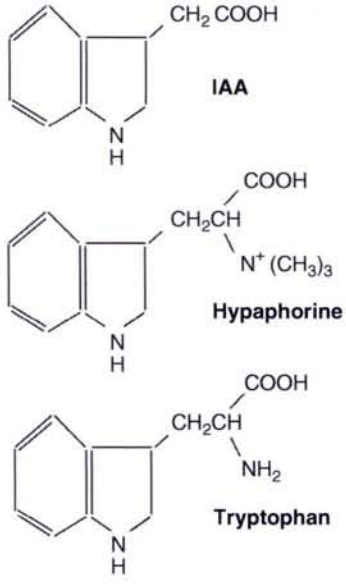


Fig. 1. Structures of IAA, hypaphorine and tryptophan.

Hypaphorine and molecular cross-talk between plant roots and fungal hyphae

In search for the key molecules involved in plant-ectomycorrhizal fungus cross talk, a rapid increase of hypaphorine concentration in hyphae colonizing host plant roots has been considered promising (Beguiristain and Lapeyrie 1997). Furthermore seedlings of non-host, plants known to form only endomycorrhiza, were unable to induce such hypaphorine accumulation in *P. tinctorius* hyphae. A high hypaphorine concentration in symbiotic hyphae, those forming the mantle and Hartig net, is regarded as a juvenility character maintained under root control, since (1) hypaphorine concentration is high in hyphal tips, and (2) the juvenile stage of colonizing hyphae has been repetitively attested by ultrastructural investigations (Kottke and Oberwinkler 1986, Dexheimer and Pargney 1991).

Accumulation of hypaphorine can be induced in vitro by treating *P. tinctorius* hyphae with root exudates, zeatin (Lagrange et al. 2005, unpublished data) or jasmonic acid (Jambois and Lapeyrie 2005, unpublished data). In vivo colonizing hyphae might respond to these, or related, plant growth regulators transferred from the root tips. In return, the supply of synthetic hypaphorine to roots, as well as root colonization by *P. tinctorius,* both result in hypaphorine accumulation in seedling shoots (unpublished data), demonstrating that fungal hypaphorine is taken up by the roots and translocated throughout the plants.

There is some evidence that fungal hypaphorine transferred to the host plant shoot is active there. While the immediate precursor of ethylene, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), induces the persistence of a typical apical hook on *Eucalyptus* seedling hypocotyls, exogenous hypaphorine supply or root colonization by the hypaphorine producer *P. tinctorius,* allows early hook opening and hypocotyl elongation (Ditengou and Lapeyrie 2000). Such hypaphorine activity opposing ACC might be a consequence of hypaphorine interaction with IAA since the apical hook has been attributed to ethylene-dependent distortion of IAA transport and consecutive IAA over-accumulation (Smalle et al. 1997, Ditengou and Lapeyrie 2000).

To summarize, the host plant, *Eucalyptus globulus* would stimulate the production of hypaphorine by *P. tinctorius* hyphae via compounds such as cytokinins and jasmonates, then take up fungal hypaphorine at the

mycorrhizal interface and translocate it to various organs, including in the shoot, where it may regulate endogenous auxin activity.

Competitive antagonism between IAA and hypaphorine: the case of root hairs

The inhibition of root hair elongation by hypaphorine treatments was observed very early (Beguiristain and Lapeyrie 1997). Since ectomycorrhizae are characterized by the absence of root hairs, while epidermal cells instead of bearing hairs elongate radially, the activity of hypaphorine on these tip growing cells has been deeply investigated.

Rhizodermic root hairs are considered to be biosensors allowing plants to perceive environmental signals (Peterson and Farquhar 1996). The tubular shape of these cells originates from a growth localized at the tip of the cell called tip growth. Hypaphorine inhibits elongation of root hairs in a concentration-dependent manner in all species tested, *Lycopersicon esculentum* (unpublished data), *Populus tremula* × *alba* (Fig. 2), *Arabidopsis thaliana* (Reboutier et al. 2002) or *Eucalyptus globulus* (Ditengou et al. 2000, Dauphin et al. 2005a, unpublished data), within a few minutes following treatments. Cases of apical swelling associated with growth arrest have been reported in *Eucalyptus globulus* (Ditengou et al. 2000) and *Arabidopsis thaliana* (Reboutier et al. 2002). Therefore root hairs have been considered as the first target of hypaphorine during the plant/fungus interaction (Ditengou et al. 2000). Subsequent substitution of hypaphorine treatment by IAA treatment in a concentration range from 0.01 to 1 μ*M* fully restores *Eucalyptus* or *Arabidopsis* hair growth rate in about 20 min (Ditengou et al. 2000, Reboutier et al. 2002), even though *Eucalyptus* seedling hairs, as opposed to *Arabidopsis* ones, are not responsive to IAA applied alone.

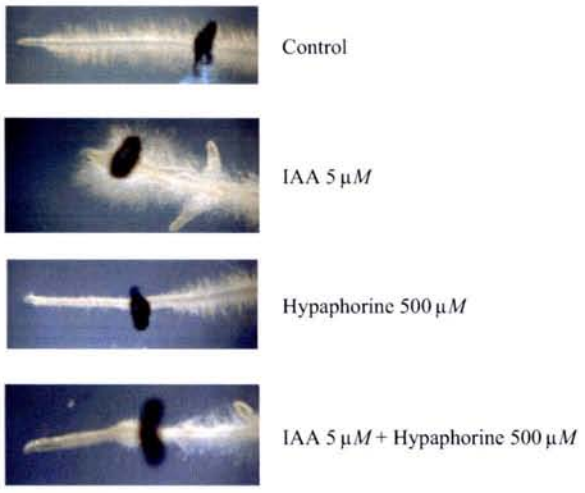


Fig. 2. Two week old cuttings of the poplar hybrid *Populus tremula* L. × *Populus alba* L. cv 717–1-B4 were treated with hypaphorine (0–500 μM in agar medium) and/or IAA (0–5 μM in agar medium) 7 days after treatment. Black mark indicates time of the treatment. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine. Tap root inhibition by IAA is restored by hypaphorine. Bar equals 2 mm.

The antagonist activities of hypaphorine and IAA on root hair elongation could be interpreted as a case of competitive interaction between both molecules. Lineweaver–Burk analysis originally designed for enzyme kinetics (Dixon and Webb 1979) is often applied to study interactions between two different plant growth substances, or between an active plant-growth substance and its inactive analogues (Christianson 2000, Zhong et al. 2001, Kawano et al. 2003). The double reciprocal plotting [1/IAA dependent hair elongation stimulation (% of control) against 1/IAA concentrations (μ*M*)] of previously published data of *Arabidopsis* root hair growth (from Fig. 2D in Reboutier et al. 2002) support this hypothesis. Graphic analysis (Fig. 3A) of hypaphorine activity on prevention of IAA-dependent hair growth stimulation shows that the apparent K_m value for IAA sharply increased from 45 n*M* in control medium to 180 n*M* in medium supplemented with hypaphorine, without the predicted V_{max} value being significantly affected (from 909% IAA stimulation of root hair elongation to 625% in hypaphorine supplemented medium). Thus, the present re-examination of earlier data clearly suggests that IAA and hypaphorine interact competitively to regulate *Arabidopsis* root hair elongation.

Ion fluxes regulation by hypaphorine in root hairs

As any weak acid, hypaphorine has two forms, protonated (Hypa-H) and anionic ($Hypa^-$). The protonated form being more lipophilic can penetrate through the plasmamembrane (PM) by diffusion, whereas the anionic form should be taken up via carriers. Hypaphorine is a small molecule and its penetration by diffusion could occur even though at nutrient medium pH the anionic form will be by far dominant. Since absorption of protonated weak acid induces cytosolic acidification due to subsequent H^+ liberation, the possibility that hypaphorine acts in this way on signal transduction pathways, as reported for salicylic acid (Lebrun-Garcia et al. 2002) has been raised. Tip-growth, for example in the pollen tube, is highly dependent on the apical proton gradient, a gradient controlled by H^+ flux across the plasma membrane (Feijo et al. 1999). Such an interpretation can be ruled out, since root hair elongation inhibition by tryptophan (related structure, pKa = 2.38) was shown to be 10-fold lower than hypaphorine-dependent inhibition (Ditengou et al. 2000).

Ion fluxes through the PM of root hairs are a motor of turgor regulation allowing tip growth. Ion fluxes are, as well, among the earliest events involved in plant signalling following plant–microbe interactions. While hypaphorine inhibits root hair tip growth, is it through alteration of cell turgor or does it involve an anion flux-related signalling pathway? Hypaphorine induces a rapid transient depolarization of the PM in *A. thaliana* root hairs and suspension cells (Reboutier et al. 2002).

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

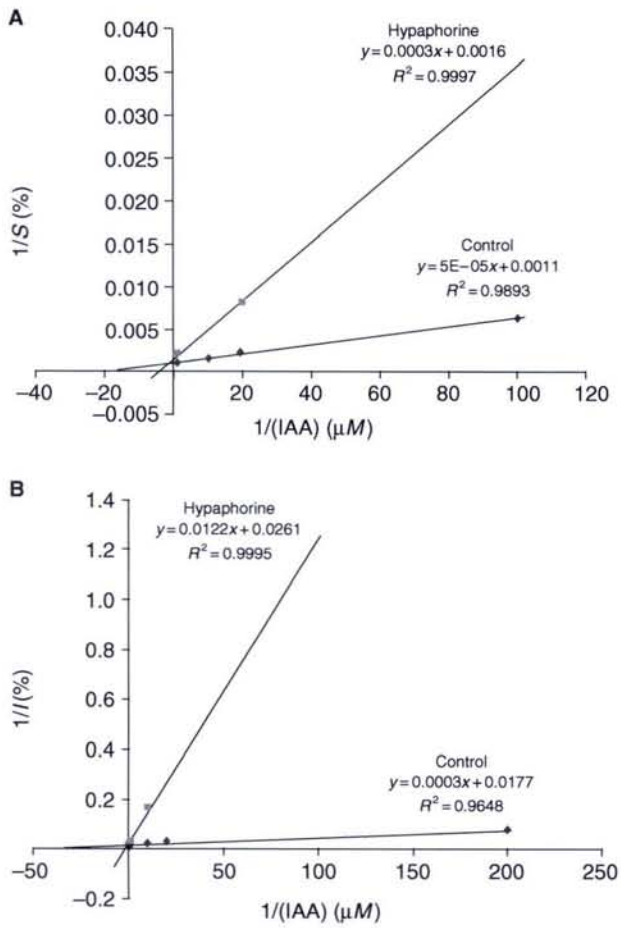


Fig. 3. Assessment (Lineweaver-Burk kinetic analysis) of the interaction between hypaphorine (100 μM) and IAA. (A) Prevention of IAA-dependent elongation stimulation of *Arabidopsis thaliana* root hairs. Stimulation of root hair growth by IAA is expressed as a percentage of the shortest root-hair length: S percentage = 100* ($L_S - L_I$)/L_I where L_S and L_I are the length of root-hairs in the presence of IAA and the length of the shortest root hair recorded in the presence of hypaphorine and IAA, respectively. The reciprocal data points of IAA-dependent root-hair growth stimulation (1/S%) are plotted against the reciprocals of IAA concentrations (1/[IAA], μM). Mean values recorded on at least 12 seedlings. (B) Prevention of IAA-dependent growth inhibition of *Arabidopsis thaliana* primary roots. Inhibitory effect of IAA on root growth is expressed as a percentage of the control root growth: I percentage = 100* ($L_C - L_I$)/L_C where L_C and L_I are the length of roots in the absence of IAA and that in the presence of IAA, respectively. The reciprocal data points of IAA-dependent root growth inhibition (1/I%) are plotted against the reciprocals of IAA concentrations (1/[IAA], μM). Mean values recorded on at least 12 seedlings.

Unlike hypaphorine, micromolar IAA induces a hyperpolarization (Felle et al. 1986) due to PM-associated H^+-ATPase activation (Bates and Goldsmith 1983) involving PM-localized auxin binding protein (Jones and Prasad 1991, Rück et al. 1993). However, the hypaphorine-induced depolarization seems not to involve the regulation of H^+-ATPase activity, but rather K^+ and anion channel regulation (Reboutier et al. 2002). During depolarization, hypaphorine transiently increases anion currents and reduces the K^+ outward rectifying currents (KORC) (Reboutier et al. 2002). Interestingly, IAA and NAA induce outward K^+ currents in guard cells (Blatt and Thiel 1994), thus playing a role that is opposite to that of hypaphorine. Taken together, hypaphorine seems to act opposite to IAA on PM polarization and K^+ currents, but the transient trait of hypaphorine activity on PM voltage, K^+ current and anion current variations suggest their involvement more in a transduction pathway than in perturbation of ion flux-sustaining tip growth.

Regarding cytosolic calcium concentration, rapid changes in free calcium concentration occurs during the transduction of a very wide range of abiotic and biotic signals (review in Sanders et al. 2002). Furthermore tip growth requires a cytosolic calcium gradient, characterized by a higher free Ca^{2+} concentration at the tip ($> 1\,\mu M$) (Bibikova et al. 1997, Wymer et al. 1997). At the tip of elongating cells the Ca^{2+} influx is activated by hyperpolarization (Foreman et al. 2003). Since hypaphorine induces a PM depolarization, Ca^{2+} influx at the tip was expected to be down-regulated by hypaphorine, leading to a lower apical Ca^{2+} concentration and arrest of elongation. Recent results brought the opposite evidence: hypaphorine increased the cytosolic free calcium concentration in *Eucalyptus globulus* root hairs, and thus abolished the hair tip calcium gradient (Dauphin et al. 2005b, unpublished data). It should be noted that similarly, following addition of Nod factors, an elevation of free cytosolic calcium level has been reported in alfalfa root hairs and thought to be indispensable for the transduction of the Nod factor signal (Pingret et al. 1998, Felle et al. 1999).

A model for hypaphorine activity on ionic currents can be proposed based on Nod factor signalling pathways (Fig. 4). Hypaphorine, as a Nod factor, induces (1) an elevation of free cytosolic calcium (Felle et al. 1999, Dauphin et al. 2005b, unpublished data), and (2) a transient PM depolarization due to reduced K^+ efflux and increased anion efflux (Felle et al. 1998, Kurkdjian et al. 2000, Reboutier et al. 2002). The observation that Nod-induced Ca^{2+} influx precedes and seems to be required for the subsequent PM depolarization to occur (Felle et al. 1998, Kurkdjian et al. 2000) leads us to make the hypothesis

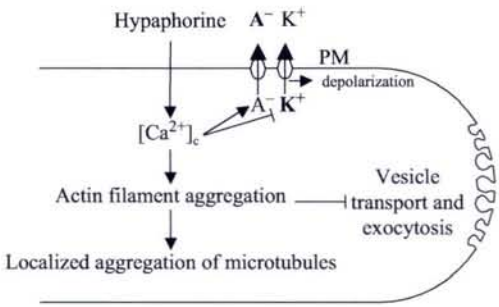


Fig. 4. Regulation, by hypaphorine, of ion fluxes, cytoskeleton organization and elongation at root hair tip; hypothesis.

that a similar sequence of events could be involved in response to hypaphorine (Fig. 4).

Root hair cyto-architecture and cytoskeleton organization in response to hypaphorine

Like pollen tubes, moss or fern protonemata and fungal hyphae, root hairs are tip growing, they are therefore polarized cells. Golgi vesicles containing cell wall precursors are delivered to the root hair tip (Sherrier and VandenBosch 1994) allowing cell elongation (review in Geitmann and Emons 2000). Growth arrest induced by hypaphorine results in an altered root hair polarized cyto-architecture only a few minutes after treatment. The subapical region is reduced in length, the central vacuole reaches the apex of the cell (Dauphin et al. 2005a, unpublished data) and swelling of some root hair tips may occur (Ditengou et al. 2000).

The cytoplasmic polarity of root hair is linked to the actin cytoskeleton. In the basal part of growing root hairs, longitudinal bundles of actin filaments run along the central vacuole (Braun et al. 1999, Miller et al. 1999). The subapical region contains thinner bundles of actin filaments whereas filamentous actin is either absent from the apical area (Miller et al. 1999) or forms an actin cap at the tip (Braun et al. 1999). Golgi vesicles would be driven by actin filaments to the root hair tip (Miller et al. 1999, Ketelaar et al. 2003). Hypaphorine treatment induces aggregation of actin filaments all along root hairs and disruption of most of the apical actin caps (Ditengou et al. 2003). Actin filament aggregation in the subapex of hypaphorine growth-arrested hairs is characteristic and distinct from the actin organization in full-grown root hairs (Dauphin et al. 2005a, unpublished data). The IAA/hypaphorine antagonism has been confirmed at the cytoskeleton level. Indeed, an apical actin cap can be restored on hypaphorine-treated hairs by a subsequent IAA treatment (Ditengou et al. 2000). Such IAA-driven debundling of actin filaments has been reported as well in epidermal cells of maize and rice coleoptiles (Wang and Nick 1998, Waller et al. 2002).

At the cell tip, the cytosolic calcium concentration has been shown to mediate actin polymerization dynamics (Snowman et al. 2002), needed for vesicle targeting and exocytosis (Ketelaar et al. 2003). Therefore growth arrest and actin aggregation triggered by hypaphorine could result from cytosolic calcium concentration elevation induced by hypaphorine as described above (Fig. 4).

Root cell tip growth does not require any microtubule cytoskeleton since continuous growth occurs in the absence of a microtubule cytoskeleton (Baluska et al. 2000). Nevertheless orientation of root hair tip growth is likely regulated by the microtubule cytoskeleton (Bibikova et al. 1999). Hypaphorine treatment induces the formation of a microtubule patch by localized aggregation of microtubules in the subapical region of root hairs (Ditengou et al. 2003). As microtubule aggregation is delayed in comparison with actin response, hypaphorine activity on microtubules has been regarded as a consequence of the actin reorganization (Ditengou et al. 2003). That view is supported by reports that in *Arabidopsis* root hairs, the subapical actin instability and the free calcium gradient dictate the direction of microtubules (Bibikova et al. 1999, Ketelaar et al. 2003).

Competitive antagonism between IAA and hypaphorine: the case of primary root growth

Whereas inhibitory concentrations of auxins (IAA, 2,4-D, NAA) stop primary root growth, simultaneous addition of hypaphorine and IAA restores normal elongation of *Eucalyptus* (Ditengou et al. 2000), *Arabidopsis* (Reboutier et al. 2002), tomato (unpublished data) or poplar (Fig. 2) roots. In contrast, hypaphorine is inactive against inhibitions induced by synthetic non-indolic auxins, 2,4-D and NAA. The specificity of hypaphorine activity toward IAA implies that hypaphorine must block very early steps of IAA activity such as IAA perception, assuming that IAA, NAA and 2,4-D are not perceived by the same receptor(s) (Ditengou and Lapeyrie 2000). Evidence supporting this interpretation has been provided by Jambois et al. (2004) who showed that hypaphorine prevents the IAA-dependent *Eucalyptus* root growth inhibition in a typically competitive manner. Furthermore, the Lineweaver–Burk kinetic analysis of data published by Reboutier et al. (2002, Fig. 1A) [1/IAA-dependent root growth inhibition (% of control) against 1/IAA concentrations (μM)], allows extending this conclusion to the *Arabidopsis* model (Fig. 3B). Hypaphorine (100 µM) prevented the IAA-dependent root growth inhibition in a typically competitive manner: the apparent K_m value for IAA in *Arabidopsis* roots showed 27-fold increases from 16.9 to 467 nM, without the predicted V_{max} value being significantly affected.

Assuming that hypaphorine counteracts IAA during perception by some receptors, it might not be the only active molecule in vivo since more than 1200 indole alkaloids have been described so far in plants and fungi. Two such indole alkaloids, brucine and yohimbine have been shown to mimic the anti-IAA activity of hypaphorine on root elongation, further supporting the idea that hypaphorine competes with IAA on some auxin-binding proteins, due to a structural similarity (Jambois et al. 2004).

Hypaphorine does not alter auxin transport

Taking into consideration that hypaphorine and IAA are competitors, the idea that hypaphorine could inhibit IAA transport and thus regulates IAA activity emerged. Two sets of evidence support the opposite conclusion. Firstly, unlike known inhibitors of auxin transport, NPA or TIBA, hypaphorine does not delay the gravitropic response in *Eucalyptus* seedling primary root following 90° rotation (Jambois et al. 2004). The gravitropic response is known to be dependent on apical auxin transport (Rashotte et al. 2000). Secondly, accumulation

of radio-labelled 2,4-D and NAA in *Arabidopsis* cells was not regulated by an external supply of hypaphorine (Jambois et al. 2004). Thus, hypaphorine does not appear to interfere either with the IAA influx carrier or with the IAA efflux carrier activities since IAA is known to share influx carriers with 2,4-D and efflux carriers with NAA (Delbarre et al. 1996, Yamamoto and Yamamoto 1998).

Evidence of hypaphorine/IAA competition on a protein site

In the absence of a recognized IAA receptor, a peroxidase has been used to bring biochemical evidence of hypaphorine/IAA competitive interaction on a protein site (Kawano et al. 2001, 2002), thus supporting conclusions reached earlier in planta, through root hair or primary root growth analyses (Fig. 3). Horseradish peroxidase-C (HRP) shares some structural similarities with IAA binding domains of known auxin-binding proteins, ABP1 and ABP-4 from maize, T85 and T92 from *Nicotiana tabaccum*. In a highly specific reaction, IAA induces superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) generation in the presence of HRP and O_2 but in the absence of H_2O_2 (Kawano et al. 2001). This reaction is competitively inhibited by hypaphorine, leading to the conclusion that hypaphorine must competitively bind to the IAA-binding site on peroxidase. The same conclusion has been reached based on a different reaction. Indeed IAA acts as an irreversible POX inactivator by binding to HRP preformed Compound III. Hypaphorine competitively inhibits binding of IAA to HRP arrested at the temporal inactive form and prevents the irreversible decay of the protein (Kawano et al. 2002).

Such evidence of competition for an enzyme binding site can realistically be transposed to the binding site of a putative IAA receptor protein. This opens the way to new mechanisms of IAA activity regulation in planta that could be considered further by plant physiologists.

Gene expression regulation under hypaphorine control

Considering the results summarized above, it might be expected that some genes are regulated as a consequence of hypaphorine activity. The first evidence by Nehls et al. (1998) leads to the apparent paradox, discussed by Ditengou and Lapeyrie (2000), of an auxin-responsive gene being up-regulated by both an auxin (IAA) and an auxin antagonist (hypaphorine). The symbiosis-related *EgHypar* gene is up-regulated in *Eucalyptus* seedlings incubated with either hypaphorine, IAA, 2,4-D or *P. tinctorius* cell-free extracts, as well as during root colonization by *P. tinctorius* hyphae. The EgHypar polypeptide accumulates in ectomycorrhizae and the recombinant polypeptide, synthesized a few years later, possesses in vitro a glutathione-*S*-transferase (GST) activity (Tagu et al. 2003). This GST activity in vitro can be inhibited by IAA but not by the synthetic auxins 2,4-D, unlike other known plant GSTs, or by hypaphorine. Therefore, hypaphorine, as IAA, up regulates EgHypar gene expression but does not interfere with EgHypar polypeptide, unlike IAA. The function of auxin binding by GSTs is still obscure. Several hypotheses were proposed, such as temporary storage, transport or uptake of auxin (Tagu et al. 2003). At the current stage of knowledge, the involvment of EgHypar in some IAA activity regulation by hypaphorine cannot be excluded.

First evidence that hypaphorine counteracts auxin activity in gene expression came from *Arabidopsis thaliana* (Reboutier et al. 2002). Both auxins, IAA and NAA, up-regulate the primary auxin-responsive gene *IAA1*. While hypaphorine does not affect the *IAA1* RNA level, hypaphorine counteracts the up-regulation in the presence of exogenous IAA or NAA. Since here, in *Arabidopsis*, hypaphorine antagonizes NAA as well as IAA, opposed to observations on *Eucalyptus* elongating primary roots (cf. above), we might expect that both responses to auxin are not achieved via identical perception/transduction pathways.

A wider investigation, using a poplar micro array (i.e. a Unigene of 4608 cDNAs of *Populus trichocarpa* × *deltoides*), allowed us to discriminate between a few new hypaphorine-regulated genes among a vast majority of genes whose expression is not affected by hypaphorine treatment. An extensin-like protein coding gene is down-regulated by hypaphorine and up-regulated by IAA (unpublished data). It may be hypothesized that inhibition of root hair elongation by hypaphorine could be a consequence of lowered transcription of such genes since extensins regulate cell wall plasticity. However the localization of this hypaphorine-responsive extensin in root hair cell walls has not been demonstrated.

Discussion: signalling during competitive antagonism between IAA and hypaphorine

It has been suggested that during ectomycorrhiza ontogenesis IAA would contribute to Hartig net development by controlling root cortical cell plasticity and elongation (Gay et al. 1994, Gea et al. 1994). All the results summarized above converge to highlight evidence of cell elongation being regulated by hypaphorine/IAA competition, i.e. in root hair, primary root or hypocotyl. Conversely no experimental result support evidence of hypaphorine/IAA competition interfering with cell division. Therefore, based on present knowledge, three sites for hypaphorine/IAA competition and subsequent pathways, can be hypothesized (Kawano 2003b).

The transmembrane signalling pathway

Binding of IAA to ABP1, the likely auxin receptor located on the plasma membrane (review in Napier et al. 2002) may be the first step of a transmembrane pathway (Fig. 5). Since a competitive interaction occurs between IAA and hypaphorine on HRP that shares some similarity with ABP1 IAA-binding domain (Kawano

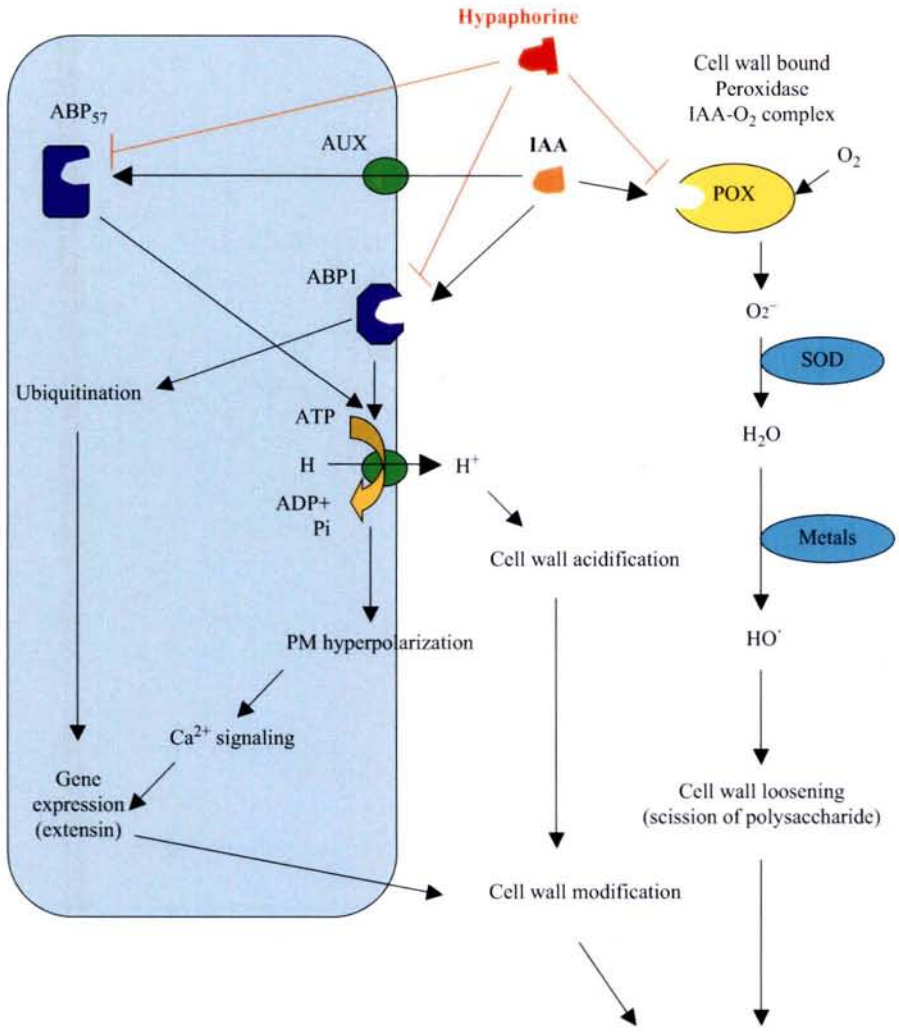


Fig. 5. Hypothetical sites for hypaphorine/IAA competition and resulting control of cell elongation.

et al. 2001), a similar molecular competition might exist on ABP1 in planta. ABP1 is thought to trigger two distinct immediate events: regulation of gene expression, such as extensin-like protein genes, involving ubiquitination control mechanisms (Gray and Estelle 2000), and PM-associated H^+-ATPase induction. Activation of H^+-ATPase results in hyperpolarization of PM and cell wall acidification, leading, respectively, to Ca^{2+}-dependent gene expression and the so-called acid growth. Reports that hypaphorine induces both PM depolarization in *Arabidopsis* cells (Reboutier et al. 2002) and free cytosolic calcium elevation in *Eucalyptus* root hairs (Dauphin et al. 2005b, unpublished data), support the latter hypothetical pathways.

The intracellular signalling pathway

A second IAA-signalling pathway, initiated by the influx of IAA into the cell has been proposed. It implies auxin-uptake carriers such as AUX1, involved on top, in root gravitropic response (Marchant et al. 1999), and putative soluble auxin receptors such as ABP57 (Kim et al. 2001) (Fig. 5). This pathway could be very short since ABP57 can directly bind and activate the PM H^+-ATPase (Kim et al. 2001). Hypaphorine does not interfere with the IAA influx or efflux carrier activities in *Arabidopsis* cells (Jambois et al. 2004) or gravitropic response in *Eucalyptus* seedlings (Jambois et al. 2004). It can therefore be assumed that hypaphorine does not interfere with the first step, the transport, of this intracellular signalling pathway. However hypaphorine is known to be absorbed by roots (unpublished data), and could compete with IAA on a soluble intracellular receptor such as ABP57.

The extracellular signalling pathway

Kawano (2003a) proposed a third mechanism for IAA signalling involving the cell-wall-bound peroxidase (POX), the most abundant auxin-binding protein in plants (Fig. 5). Such POX have been shown to be an active source of reactive oxygen species (ROS) such as

$O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $HO^{\cdot}$ that would mediate the IAA activity during elongation of root hairs and roots (Schopfer 2001, Foreman et al. 2003). In the presence of O_2, POX bound to IAA may generate $O_2^{\cdot -}$ leading to the $HO^{\cdot}$ required for the scission of polysaccharides, cell wall loosening and subsequent cell elongation (Schopfer et al. 2001, 2002). Hypaphorine has been shown in vitro to competitively inhibit the IAA-mediated ROS production by horseradish peroxidase (Kawano et al. 2001, 2002), and could therefore regulate in this way IAA induced cell elongation in planta.

Such an extracellular signalling pathway involving POXs could explain why, at the same concentration, IAA either stimulates cell elongation in root hair or inhibits cell elongation in the primary root elongation zone. In both case hypaphorine counteracts competitively IAA activity suggesting that the early step of inhibition and stimulation pathways could be shared. In root hairs IAA-induced cell elongation could be triggered by ROS as described above. In primary root, ROS production induced by IAA, would inhibit the recycling of vesicles that are assumed to be loading IAA with carriers such as PIN1 (Geldner et al. 2001, Baluska et al. 2003). Other carriers, such as multidrug resistance-like proteins (MRPs; ABC transporters) could contribute as well to vesicle loading (Noh et al. 2001, Geisler et al. 2003). This vesicle trafficking seems required for polar IAA transport (Geldner et al. 2001, 2003); disruption of their recycling by high IAA concentration would therefore inhibit IAA transport and elongation. In human fibroblasts inhibition of endocytosis by H_2O_2 has been reported (review in Smythies 2000) supporting this hypothesis.

Conclusion

Based on the experimental data reviewed, hypaphorine with other active indole alkaloids should be regarded as a new class of IAA antagonist. During certain steps of plant development or in certain cells, endogenous indole alkaloids such as hypaphorine could be regulating IAA activity besides other well-investigated regulatory mechanisms such as conjugation, degradation or flavonol-dependent IAA transport regulation (Murphy et al. 2000, Buer and Muday 2004, Peer et al. 2004). Furthermore hypaphorine might be a surprisingly useful tool to investigate IAA perception since it most probably competes with IAA on receptor proteins (Jambois et al. 2004). Looking further, a medicinal use of hypaphorine has even been proposed in combination with IAA and peroxidase for targeted cancer therapy (Kawano 2003a).

Acknowledgements – We would like to thank Dr Frantisek Baluska (University of Bonn) and Pr Alain Pugin (Université de Bourgogne) for extremely valuable discussions. A.D. was supported by Doctoral Fellowships from the CNES and the Région Lorraine.

References

Baluska F, Salaj J, Mathur J, Braun M, Jasper F, Samaj J, Chua NH, Barlow PW, Volkmann D (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. Dev Biol 227: 618–632

Baluska F, Samaj J, Menzel D (2003) Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? Trends Cell Biol 13: 282–285

Bates GW, Goldsmith HM (1983) Rapid response of the plasmamembrane potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids. Planta 159: 231–237

Beguiristain 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

Beguiristain T, Cote R, Rubini P, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (1995) Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry 40: 1089–1091

Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S (1999) Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 17: 657–665

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

Blatt MR, Thiel G (1994) K^+ channels of stomatal guard cells: bimodal control of the K^+ inward-rectifier evoked by auxin. Plant J 5: 55–68

Braun M, Baluska F, von Witsch M, Menzel D (1999) Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. Planta 209: 435–443

Buer CS, Muday GK (2004) The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. Plant Cell 16: 1191–1205

Charvet-Candela V, Hitchin S, Reddy MS, Cournoyer B, Marmeisse R, Gay G (2002) Characterization of a *Pinus pinaster* cDNA encoding an auxin up-regulated putative peroxidase in roots. Tree Physiol 22: 231–238

Chen G, Luo H, Ye J, Hu C (2001) Identification and determination of oligomeric stilbenes in the roots of *Caragana* species by capillary electrophoresis. Planta Med 67: 665–668

Christianson ML (2000) ABA prevents the second cytokinin-mediated event during the induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. Am J Bot 87: 1540–1545

Dean RA (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. Annu Rev Phytopathol 35: 211–234

Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphtalene-1-acetic acid, indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. Planta 198: 532–541

Dexheimer J, Pargney JC (1991) Comparative anatomy of the host–fungus interface in mycorrhizas. Experientia 47: 312–321

Dimetry N, El-Gengaihi S, Reda A, Amer S (1992) Biological effects of some isolated *Abrus precatorius* L. alkaloids towards *Tetranychus urticae* Koch. Anzeiger Fuer Schaedlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz 65: 99–101

Ditengou FA, Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. Mol Plant Microbe Interact 13: 151–158

Ditengou FA, Beguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211: 722–728

Ditengou FA, Raudaskoski M, Lapeyrie F (2003) Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinc*torius, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs. Planta 218: 217–225

Dixon M, Webb E (1979). Enzymes. Academic Press, New York, USA

Feijo JA, Sainhas J, Hackett GR, Kunkel JG, Hepler PK (1999) Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. J Cell Biol 144: 483–496

Felle H, Brummer B, Bertl A, Parish R (1986) Indole-3-acetic acid and fusicoccin cause cytosolic acidification of corn coleoptile cells. Proc Natl Acad Sci USA 83: 8892–8895

Felle H, Kondorosi A, Kondorosi E, Schultze M (1998) The role of ion fluxes in Nod factor signaling in *Medicago sativa*. Plant J 13: 455–463

Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M (1999) Elevation of the cytosolic free [Ca^{2+}] is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. Plant Physiol 121: 273–280

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422: 442–446

Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, 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, 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

Geisler M, Kolukisaoglu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee JJ, Murphy AS, Martinoia E, Schulz B (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. Mol Biol Cell 14: 4238–4249

Geitmann A, Emons AM (2000) The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. J Microscop 198: 218–245

Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jurgens G (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. Cell 112: 219–230

Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jurgens G, Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. Nature 413: 425–428

Ghosal S, Ballav R, Chauhan P, Mehta R (1975) Alkaloids of *Sida cordifolia*. Phytochemistry 14: 830–832

Ghosal S, Mazumder UK, Mehta R (1972) Indole bases of *Desmodium gyrans*. Phytochemistry 11: 1863–1864

Ghosal S, Srivastava RS, Banerjee PK, Dutta SK (1971) Alkaloids of *Desmodium triflorum*. Phytochemistry 10: 3312–3313

Gray W, Estelle M (2000) Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. Trends Biol Sci 25: 133–138

Hahn M (2000) The rust fungi. Cytology, physiology and molecular biology infection. In: Fungal Pathology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 267–306

Hofinger M, Monseur X, Pais M, Jarreau F (1975) Further confirmation of the presence of indolylacrylic acid in lentil seedlings and identification of hypaphorine as its precursor. Phytochemistry 14: 475–477

Jambois A, Ditengou FA, Kawano T, Delbarre A, Lapeyrie F (2004) The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid-specific competitors which do not alter auxin transport. Physiol Plant 120: 501–508

Janzen D, Lynn D, Fellows L, Hallwachs W (1982) The indole alkaloïd, hypaphorine and *Pterocarpus* seed protection. Phytochemistry 21: 1035–1037

Jones AM, Prasad P (1991) Auxin-binding proteins and their possible roles in auxin-mediated plant growth. Bioessays 14: 43–48

Kawano T (2003a) Possible use of indole-3-acetic acid and its antagonist tryptophan betaine in controlled killing of horseradish peroxidase-labeled human cells. Med Hypotheses 60: 664–666

Kawano T (2003b) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Rep 21: 829–837

Kawano T, Kawano N, Hosoya H, Lapeyrie F (2001) Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. Biochem Biophys Res Commun 288: 546–551

Kawano T, Kawano N, Lapeyrie F (2002) A fungal auxin antagonist, hypaphorine prevents the indole-3-acetic acid-dependent irreversible inactivation of horseradish peroxidase: inhibition of Compound III-mediated formation of P-670. Biochem Biophys Res Commun 294: 553–559

Kawano N, Kawano T, Lapeyrie F (2003) Inhibition of the indole-3-acetic acid-induced epinastic curvature in tobacco leaf strips by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Ann Bot (Lond) 91: 465–471

Ketelaar T, de Ruijter NC, Emons AM (2003) Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. Plant Cell 15: 285–292

Kim YS, Min JK, Kim D, Jung J (2001) A soluble auxin-binding protein, ABP57. Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H^+-ATPase. J Biol Chem 276: 10730–10736

Kottke I, Oberwinkler F (1986) Mycorrhiza of forest trees-structure and function. Trees 1: 1–24

Kurkdjian A, Bouteau F, Pennarun AM, Convert M, Cornel D, Rona JP, Bousquet U (2000) Ion currents involved in early Nod factor response in *Medicago sativa* root hairs: a discontinuous single-electrode voltage-clamp study. Plant J 22: 9–17

Lebrun-Garcia A, Chiltz A, Gout E, Bligny R, Pugin A (2002) Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogein in tobacco cells. Planta 214: 792–797

Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. Microbiol Mol Biol Rev 64: 746–785

Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. EMBO J 18: 2066–2073

Marklova E, Hais IM (1986) Metabolism of indolylacrylic acid. I. Hypaforin. Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralovesupplement 29: 435–442

Miller DD, De Ruijter NCA, Bisseling T, 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: 141–151

Murphy A, Peer W, Taiz L (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. Planta 211: 315–324

Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C (2002) A short history of auxin-binding proteins. Plant Mol Biol 49: 339–348

Nehls U, Beguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F, Martin F (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Planta 207: 296–302

Noh B, Murphy AS, Spalding EP (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. Plant Cell 13: 2441–2454

Ohtani K, Ogawa K, Kasai R, Yang CR, Yamasaki K, Zhou J, Tanaka O (1992) Oleanane glycosides from *Glycyrrhiza yunnanensis* roots. Phytochemistry 31: 1747–1752

Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SN, Chen RJ, Masson PH, Murphy AS (2004) Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 16: 1898–1911

Peterson RP, Farquhar ML (1996) Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. Bot Rev 62: 1–39

Pingret JL, Journet EP, Barker DG (1998) *Rhizobium* nod factor signaling. Evidence for a g protein-mediated transduction mechanism. Plant Cell 10: 659–672

Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. Plant Physiol 122: 481–490

Reboutier D, Bianchi M, Brault M, Roux C, Dauphin A, Rona JP, Legue V, Lapeyrie F, Bouteau F (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Interact 15: 932–938

Romburgh PV, Barger G (1911) Preparation of the betaine of tryptophan and its identity with the alkaloid hypaphorine. J Am Chem Soc 99: 2068–2070

Rück A, Palme K, Venis M, Napier R, Felle H (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the

auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. Plant J 4: 41–46
Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. Plant Cell 14: 401–417
Schopfer P (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. Plant J 28: 679–688
Schopfer P, Liszkay A, Bechtold M, Frahry G, Wagner A (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. Planta 214: 821–828
Schopfer P, Plachy C, Frahry G (2001) Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. Plant Physiol 125: 1591–1602
Sherrier DJ, VandenBosch KA (1994) Secretion of cell wall polysaccharides in *Vicia* root hairs. Plant J 5: 185–195
Shrestha T, Bisset N (1991) Quaternary nitrogen compounds from the South American Moraceae. Phytochemistry 30: 3285–3287
Smalle J, Haegman M, Kurepa J, Van Montagu M, Straeten DV (1997) Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. Proc Natl Acad Sci USA 94: 2756–2761
Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, San Diego, USA
Smythies J (2000) What is the function of receptor and membrane endocytosis at the postsynaptic neuron? Proc R Soc Lond B Biol Sci 267: 1363–1367
Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Franklin-Tong VE, Staiger CJ (2002) Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. Plant Cell 14: 2613–2626
Tagu D, Palin B, Balestrini R, Gelhaye E, Lapeyrie F, Jacquot J, Sautière P, Bonfante P, Martin F (2003) Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-*S*-transferase from *Eucalyptus globulus* roots. Plant Physiol Biochem 41: 611–618
Tranvan H, Habricot Y, Jeannette E, Gay G, Sotta B (2000) Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum and Pinus pinaster*. Tree Physiol 20: 123–129
Waller F, Riemann M, Nick P (2002) A role for actin-driven secretion in auxin-induced growth. Protoplasma 219: 72–81
Wang QY, Nick P (1998) The auxin response of actin is altered in the rice mutant Yin-Yang. Protoplasma 204: 22–33
Wymer CL, Bibikova TN, Gilroy S (1997) Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 12: 427–439
Yamamoto M, Yamamoto KT (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
Zhong G, Huberman M, Feng X, Sisler E, Holland D, Goren R (2001) Effect of 1-methylcyclopropene on ethylene-induced abscission in citrus. Physiol Plant 113: 133–141

Edited by C. Bellini

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'activité de l'acide jasmonique sur le champignon ectomycorhizien *Pisolithus microcarpus* : L'acide jasmonique, tout comme le methyl jasmonate, stimule la production d'hypaphorine. Cette stimulation s'ajoute à celle produite par la zéatine. Les jasmonates et la zéatine des exsudats racinaires pourraient agir de concert et préparer le champignon à l'infection.

Toutefois, la synthèse et l'excrétion de jasmonates par les plantes hôtes, eucalyptus ou peuplier, doit être mis en évidence. Un de nos objectifs consistera à vérifier et quantifier la présence de jasmonates dans les exsudats racinaires.

Nous avons également montré qu'un faible pourcentage de gènes était régulé par la présence des deux médiateurs chimiques l'AIA et l'hypaphorine. De nombreux gènes codant pour des protéines pariétales, dont les "Extensin-like-protein", semblent êtres régulés, ce qui doit être rapproché des conclusions d'études précédentes portant sur la cinétique de mycorhization : l'expression des gènes codant pour des protéines pariétales du partenaire fongique varie dans les toutes premières phases de l'ontogenèse.

Il reste à déterminer si le clone d'extensine régulé de manière antagoniste par l'hypaphorine et par l'auxine est préférentiellement exprimé au niveau des poils absorbants (cellules cibles de l'hypaphorine) et / ou au niveau de la racine principale. Nous suivrons notamment par RT-PCR l'expression d'un gène d'extensine LeExt1 connu pour être spécifique des poils absorbants chez la tomate (Bucher et al. 1997), puis par western blot, nous vérifierons l'expression de la protéine LeExt1. Dans un second temps, une approche par hybridation *in Situ* et immunolocalisation devrait permettre d'étudier le cas des plantes hôtes, l'eucalyptus et le peuplier.

Enfin, l'étude des mécanismes d'action de l'hypaphorine et des alcaloïdes indoliques, ont permis de déceler une nouvelle classe de régulateur de l'activité auxinique: les alcaloïdes indoliques, des antagonistes compétitifs de l'AIA. Ceci suggère un rôle prépondérant du noyau indole lors de la compétition entre l'AIA et les alcaloïdes indoliques. Ces molécules pourraient se révéler très utiles pour comprendre les modes d'action de l'auxine.

Deux hypothèses principales ont émergé quant aux bases biochimiques de l'antagonisme entre ces deux molécules: d'une part, une compétition sur un récepteur tel qu'ABP1, d'autre part, un antagonisme hypaphorine / AIA agissant par l'intermédiaire des ROS sur le recyclage cellulaire.

On tentera d'étudier la première hypothèse en utilisant la protéine ABP1, le récepteur potentiel de l'AIA le mieux caractérisé à ce jour, en examinant l' interaction de l'hypaphorine et de l'AIA sur cette protéine. Par ailleurs, pour aborder la seconde hypothèse, du BFA (brefeldine A), connu pour interrompre l'exocytose et bloquer le recyclage cellulaire, sera utilisé afin de suivre l'activité de l'hypaphorine et de l'AIA sur le recyclage cellulaire.

Avec l'hypaphorine et certains alcaloïdes indoliques, s'ouvre un champ nouveau d'étude des modes d'action des auxines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

A

Abuzinadah RA, Read DJ (1986) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I.Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. New Phytol 103: 481-493

Albrecht C, Asselin, A, Piche, Y, Lapeyrie F (1994) Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization. Physiol Plantarum 91: 104-110

Arshad M, Frankenberg WT (1998) Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. Advances in Agronomy 62: 45-151

B

Baar J, Ozinga WA, Sweers IL Kuyper TW (1994) Stimulatory and inhibitory effect of needle litter and grass extracts on the growth of some ectomycorrhizal fungi. Soil Biol & Bioch 26: 1073-1079

Baluska F, Samaj J, Menzel D (2003) Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? Trends Cell Biol 13: 282-285

Barker SJ, Tagu D (2000) The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. J Plant Growth Regulation 19: 144–154

Barker SJ, Tagu D, Delp, G (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. Plant Physiol. 116: 1201-1207

Bartel B, LeClere S, Magidin M, Zolman BK (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid ß oxidation. J Plant Growth Regul 20: 198-216

Bauly JM, Sealy IM, Macdonald H, Brearley J, Droge S, Hillmer S, Robinson DG, Venis MA, Blatt MR, Lazarus CM, Napier RM (2000) Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. Plant Physiol 124: 1229–1238

Becard G, Doubs DD, Pfeffer PE (1992) Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO and flavonol. Appl & Env Microbiol. 58: 821-825

Béguiristain T, Coté 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

Benjamins R, Quint A, Weijers D, Hooykaas P, Offringa R (2001) The PINOID

protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. Development 128: 4057-4067

Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schultz B, Feldmann KA (1996) Arabidopsis AUXl gene: a permease-like regulator of root gravitropism. Science 273: 948-950

Beyrle H (1995) The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. In: Varma A, Hock B, eds. Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 365–390

Blaudez D, Chalot M, Dizengremel P, Botton B (1998) Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* and *Betula pendula*. II. Metabolic changes during mycorrhiza formation. New Phytol 138: 543-552

Bonfante P, Balestrini R, Martino E, Perotto S, Plassard C, Mousain D (1998) Morphological analysis of early contacts between pine roots and two ectomycorrhizal *Suillus* Strains. Mycorrhiza.8: 1-10

Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normlanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. Plant Physiol 126: 524-535

Brunner I, Scheidegger C (1992) Ontogeny of synthesized *Picea abies* (L.) Karst. -*Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex St Amans) Quél. ectomycorrhizas. New Phytol 120: 359-369

Bucking H, Heyser W (2001) Microautoradiographic localization of phosphate and carbohydrates in mycorrhizal roots of *Populus tremula* x *Populus alba* and the implications for transfer processes in ectomycorrhizal associations. Tree Physiol 21: 101-107

Bucking H, Kuhn AJ, Schroder WH, Heyser W (2002) The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? J of Exp Botany. 53: 1659-1669

Burgess T, Dell B, Malajczuk N (1996) In vitro synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhiza: synchronisation of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. Mycorrhiza 6: 189-196

Burgess T, Laurent P, Dell B, Malajczuk N, Martin F (1995) Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. Planta 195: 408-417

C

Cairney JWG, Alexander IJ (1992) A study of ageing of spruce (*Picea sitchensis* Bong. Carr.) ectomycorrhizas. II. Carbon allocation in ageing *Picea sitchensis/Tylosporafibrillosa* (Burt.) Donk ectomycorrhizas. New Phytol 122: 153-158

Carnero Diaz E, Martin F, Tagu D (1996) Eucalypt a-tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. Plant Mol Biol 31: 905-910

Chaboud A, Lalonde M (1983) Lectin binding on surfaces of Frankia strains. Can. J. Bot 61: 2889- 2897

Chamarro J, Ostin A, Sandberg G (2001) Metabolism of indole-3-acetic acid by orange (*Citrus sinensis*) flavedo tissue during fruit development. Phytochem 57: 179-187

Chen G, Luo H, Ye J, Hu C (2001) Identification and determination of oligomeric stilbenes in the roots of *Caragana* species by capillary electrophoresis. Planta Med 67: 665-668

Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A, Bush DR (2001) ANT1, an aromatic and neutral amino acid transporter in Arabidopsis. Plant Physiol 125: 1813-1820

Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar, Masson PH (1998) The Arabidopsis thaliana AGRAVITROPIC1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. Proc Natl Acad Sci USA 95: 15112-15117

Cheong JJ, Do Choi Y (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. Trends in Genetics 19: 409-413

Cleland RE (1995) Auxin and cell elongation. In: Davies JP (Eds.) Plant hormones. kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland, pp 214-227

Clowes FAL (1981) Cell proliferation in ectotrophic mycorrhizas of *Fagus sylvatica* L. New Phytol 87: 547-555

Colon-Carmona A, Chen DL, Yeh KC, Abel S (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. Plant Physiol 124:1728-1738

Cooney TP, Nonhebel HM (1991) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: measurement, mass spectral identification and incorporation of H2 from H2O2 into indole-3-acetic acid, d- and l-tryptophan, indole-3-pyruvic acid and tryptamine. Planta 184: 368-376

Crawford NM, Arst HN (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. Annual Review of Genetics 27: 115-146

Cumming JR, Weinstein LH (1990) Nitrogen source effects on Al toxicity in nonmycorrhizal and mycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings. I. Growth and nutrition. Canadian Journal of Botany *68: 2644-2652*

D

Delbarre A, Muller P, Guern J (1998) Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not to influx, of auxin in suspension-cultured tobacco cells. Plant Physiol 116: 833-844

Deruere J, Jackson K, Garbers C, Soll D, DeLong A (1999) The RCN1-encoded subunit of the naphthylphthalamic acid-binding protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. Plant J 20: 389-399

Dexheimer J, Gerard J, Genet P (1994) Study of the transformations of the root system *of Eucalyptus globulus* associated with *Pisolithus tinctorius*. I. Aptitude for mycorrhization of different kinds of roots. Phytomorphology 44: 235-245

Dexheimer J, Pargney J (1991) Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. Experientia 47: 312-321

Ditengou FA, Beguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211: 722-728

Ditengou FA, Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus Pisolithus *tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. Mol Plant Microbe Interact 13: 151-158

Ditengou FA, Raudaskoski M, Lapeyrie F (2003) Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinc*torius, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs. Planta 218: 217–225

Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Annual Review of Phytopath 32: 479-501

Duchesne LC (1989) Protein synthesis in *Pinus resinosa* and the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* prior to ectomycorrhiza formation. Trees 3: 73-77

Duddridge JA, Read DJ (1984) The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. II. Ectomycorrhizal development on pine in vitro. New Phytol 96: 575-582

Duplessis S, Courty PE, Tagu D, Martin F (2004) Transcript Patterns Associated with Ectomycorrhiza Development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytol (sous presse)

Duplessis S, Sorin C, Voiblet C, Martin F, Tagu D (2001) Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete Pisolithus. Current Genetics 39: 335-339

F

Fries N (1988) Specific effects of diterpene resin acids on spore germination of ectomycorrhizal basidiomycetes. Experientia 44: 1027-1030

Fries N, Serck-Hanssen K, Dimberg LH, Theander O (1987) Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). Exp Mycol 11: 360-363

Friml J, Palme K (2002) Polar auxin transport - old questions and new concepts? Plant Mol Biol 49: 273-284

G

Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K

(1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. Science 282: 2226-2230

Garbaye J (2000) The role of ectomycorrhizal symbiosis in the resistance of forests to water stress. Outlook on Agriculture 29: 63-69

Garbaye J, Guehl JM (1997) Le rôle des ectomycorhizes dans l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers.Revue Forestière Française, XLIX, 110-120

Garbers C, DeLong A, Deruere J, Bernasconi P, Soll D (1996) A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit affects auxin transport in *Arabidopsis*. Embo J 15: 2115-2124

Garnier F, Carpin S, Label P, Creche J, Rideau M, Hamdi S (1996) Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light-inducible *ipt* gene. Plant Sc 120: 47-55

Gay G, Gea L (1994) Role of fungal IAA in ectomycorrhiza formation. Acta Botanica Gallica 141: 491-496

Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud J (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. New Phytol 128: 645-657

Gea L, Normand L, Vian B, Gay G (1994) Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. New Phytol 128: 659-670

Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jurgens G, Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. Nature 413: 425-428

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

Goeschl JD, Pratt HK, 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 (1991) Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. Experimentia 47: 331–339

Graham JH, Liderman 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 of Microbiol 26: 1340-1347

Gray W, Estelle M (2000) Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. Trends Biol. Sci. 25: 133-138

Guilfoyle TJ, Hagen G (2001) Auxin response factors. J Plant Growth Regul 20: 281-291

Guillot J, Giollant M, Damez M, Dusser M (1994) Intervention des lectines

fongiques dans les événements précoces de reconnaissance arbre/champignon au cours de la formation des ectomycorhizes. Acta bot. Gallica 141: 443-447

Guttenberger M, Hampp R (1992) Ectomycorrhizins-symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas. Planta 188: 129-136

H

Hampp R, Schaeffer C, Wallenda T, Stülten C, Johann P, Einig W (1995) Changes in carbon partitioning or allocation due to ectomycorrhiza formation: biochemical evidence. Can J of Botany 73: S548–S556

Harley JL, Smith SE (1983) The causal anatomy of ectomycorrhizas. In "Mycorrhizal Symbiosis", Academic Press, pp 299-316

Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. Plant Physiol 130: 1213-1220

Hilbert JL, Costa G, Martin F (1991) Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during early stage of eucalypt mycorrhiza development. Plant Physiol 97: 977-984

Hilbert JL, Martin F (1988) Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. New Physiol 110: 339-346

Horan DP (1991) The infection process in eucalyptus mycorrhizas. Ph-D Thesis, Australian National University, Camberra Australia

Horan DP, Chilvers GA (1990) Chemotropism: the key to ectomycorrhizal formation? New Phytol 116: 451-458

Hull AK, Rekha V, Celenza JL (2000) Arabidopsis cytochrome P450s that catalyse the first step of the tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 97: 2379-2384

I

Imhoff V, Muller P, Guern J, Delbarre A (2000) Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. Planta 210: 580-588

J

Jacobs PF, Peterson R, Massicotte HB (1989) Altered fungal morphogenesis during early stages of ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus pilularis*. Scanning Microscopy 3: 249-255

Johansson T, Le Quéré A, Ahren D, Söderström B, Erlandsson R, Lundeberg J, Uhlen M, Tunlid A (2004) Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. Mol Plant-Microbe Interact 17: 202-215

K

Karabaghli-Degron C, Sotta B, Bonnet M, Gay G, LeTacon 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, Myllylä R, Cooper JB (1999) Auxin transport inhibitors act through ethylene to regulate dichotomous branching of lateral root meristems in pine. *New Phytol* 142: 49–58

Kershaw MJ, Talbot NJ (1998) Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. Fungal genet biol 23: 18-33

Kim YS, Min JK, Kim D, Jung J (2001) A soluble auxin-binding protein, ABP57. Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H+-ATPase. J Biol Chem 276: 10730-10736

Kohler A, Delaruelle C, Martin D, Encelot N, Martin F (2003) The poplar root transcriptome: analysis of 7,000 expressed sequence tags. FEBS Lett 542: 37-41

Koide RT, Suomi L, Stevens CM, McCormick L (1998) Interactions between needles of *Pinus resinosa* and ectomycorrhizal fungi. New Phytol 140: 539-547

Koske RE, Gemma JN (1992) Fungal reactions to plants prior to mycorrhizal formation. Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. Chapman & Hall, London, United Kingdom, pp 3-36

Kottke I (1997) Fungal adhesion pad formation and penetration of root cuticule in early stage mycorrhizas of *Picea Abies* and *Laccaria amethystea*. Protoplasma 196: 55-64

Kottke I, Oberwinkler F (1986) Mycorrhiza of forest trees-structure and function. Trees 1: 1-24

Kowalczyk M, Sandberg G (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in Arabidopsis. Plant Physiol 127:1845-1853

L

Lagrange H (2001) Identification de signaux racinaires régulant l'accumulation d'hypaphorine et la croissance du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy, France

Lagrange H, Jambois A, Lapeyrie F (2004) Zeatin, a cytokinin from *Eucalyptus* seedling root exudates, controls hyphal branching and hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. Submitted

Lagrange H, Jay-Allemand C, Lapeyrie F (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. New Phytol 149: 349-355

Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, Van Breeman N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. Trends in Ecol & Evolut 16: 248-254

Lapeyrie F (1990) The role of ectomycorrhizal fungi in calcareous soil tolerance by 'symbiocalcicole' woody plants. Annales des Sciences Forestieres. 47: 579-589

Lapeyrie F, Mendgen K (1993) Quantitative estimation of surface carbohydrates of ectomycorrhizal fungi in pure culture and during *Eucalyptus* root infection. Mycological Research 97: 603-609

Laurans F, Pepin R, Gay G (2001) Fungal auxin overproduction affects the anatomy of *Hebeloma cylindrosporum-Pinus pinaster* ectomycorrhizas. Tree Physiol 21: 533-540

Laurent P, Voiblet C, Tagu D, De Carvalho D, Nehls U, De Bellis R, Balestrini R, Bauw G, Bonfante P, Martin F (1999) A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. Mol Plant-Microbe Interac 12: 862-871

Laurent, P (1995) Contribution à l'étude des protéines régulées par la symbiose chez l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius*. Caractérisation des mannoprotéines pariétales chez le basidiomycète *Pisolithus tinctorius*. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy, France

Le Tacon, F (1985) Les mycorhizes: une coopération entre plantes et champignons. La recherche 166: 624-632

Lei J, Becard G, Catford JG, Piché Y (1991) Root factors stimulate P uptake and plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New Phytol 118: 289-294

Lei J, Ding H, Lapeyrie F, Piché Y, Malajczuk N, Dexheimer J (1990a) Ectomycorrhizal formation on the roots of Eucalyptus globulus and pinus caribea with two isolates of *Pisolithus tinctorius:* structural and cytochemical observations. Dans Endocytobiology IV, Nardon P, Gianinazzi-Pearson V, Grenier AM, Margulis L and Smith DC Eds, INRA Editions, Paris France, pp 123-126

Lei J, Lapeyrie F, Malajczuk N, Dexheimer J (1990b) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake *in vitro*. III. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhizal formation. New Phytol 116: 115-122

Leyser HMO (2001) Auxin signalling: the beginning, the middle and the end. Curr Opin Plant Biol 4:382-38

Ljung K, Bhalerao R, Sandberg G (2001a) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. Plant J 28:465-474

Ljung K, Ostin A, Lioussane L, Sandberg G (2001b) Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. Plant Physiol 125:464-475

Luschni C, Fink GR (1999) Two pieces of the auxin puzzle. Trends Plant Sci 4: 162-164

Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR (1998) EIR1, a rootspecific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. Genes Dev 12: 2175-2187

M

Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklof J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating IAA distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. Plant Cell 14: 589-597

Marschner H, Romheld V (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. Plant & Soil. 165: 261-274

Martin F, Botton B (1993) Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. In Advances in Plant Pathology, Academic Press. 9: 83-102

Martin F, Diez J, Dell B, Delaruelle C (2002) Phylogeography of ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. New Phytol 153: 345-358

Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F (2001) Developmental Cross Talking in the Ectomycorrhizal Symbiosis: Signals and Communication Genes. New Phytol 151: 145-154

Martin F, Laurent P, De Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, Bonfante P, Tagu D (1999) Cell wall Proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: Identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genetics & Biology* 27: 161-174

Martin F, Ramstedt M, Soderhall K (1987) Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. Biochimie 69: 569-581

Marx DH (1973) Mycorrhizae and feeder root diseases. Ectomycorrhizae, Their Ecology & Physiol. 351-382

Massicotte HB, Melville LH, Peterson RL (1987a) Scanning electron microscopy of ectomycorrhizae, potential and limitations. Scan. Microscop. 1: 1439-1454

Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Piche Y (1986) Structure and ontogeny of *Alnus crispa-Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. Canadian Journal of Botany. 64: 177-192

Massicotte HB, Peterson RL, Ashford AE (1987b) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis - Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and

scanning electron microscopy. Canadian Journal of Botany. 65: 1927-1939

Melin E, Rama Das VS (1954) Influence of root-metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. Physiol Plant 7: 851-858

Mendgen K, Schneider A, Sterk M, Fink W (1988) The differentiation of infection structures as a result of recognition events between some biotrophic parasites and their hosts. J. Phytopathology 123: 259-272

Menke FL, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, and Memelink J (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid byosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. Plant Physiol 119: 1289-1296

Muday GK, Peer WA, Murphy AS (2003) Vesicular cycling mechanisms that control auxin transport polarity. Trends Plant Sc .8: 301-304

N

Nair MG, Safir GR, Siqueira JO (1991) Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. Applied & Env Microb 57: 434-439

Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C (2002) A short history of auxin-binding proteins. Plant Mol Biol 49: 339-348

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

Nguyen C, Yan W, Le Tacon F, Lapeyrie F (1992) Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monokaryotic and dikaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. Plant & Soil. 143: 193-199

Niemi K, Vuorinen T, Ernstsen A, Häggman H (2002) Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. Tree Physiol 22: 1231-1239

Niini SS, Tarkka MT, Raudaskoski M. (1996) Tubulin and actin protein patterns in Scots pine (*Pinus sylvestris*) roots and developing ectomycorrhiza with *Suillus bovinus*. Physiologia Plant 96: 186-192

Nylund JE (1988) The regulation of mycorhiza formation - carcohydrate and hormone theories reviewed. Scan J of Forest Research 3: 465-479

Nylund JE, Kasimir A, Arbevy A (1982) Cell wall penetration and papilla formation in senescent cortical cells during ectomycorrhiza synthesis in vitro. Physiol Plant Pathol 21: 71-73

O

Ohtani K, Ogawa K, Kasai R, Yang CR, Yamasaki K, Zhou J, Tanaka O (1992) Oleanane glycosides from *Glycyrrhiza yunnanensis* roots. Phytochem 31: 1747-1752

Olsen RA, Odham G, Lindenberg G (1971) Aromatic substances in leaves of *Populus tremula* as inhibitors of mycorrhizal fungi. Physiologia Plant 25: 122-129

P

Palme K, Gälweiler L (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. Current Opinion in Plant Biol 2 :375-381

Parry G, Delbarre A, Marchant A, Swarup R, Napier R, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. Plant J 25: 399-406

Peipp H, Maier W, Schmidt J, Wray V, Strack D (1997). Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. Phytochem 44: 581-587

Pellissier F (1993) Allelopathic effect of phenolic acids from humic solutions on two spruce mycorrhizal fungi: *Cenococcum graniforme* and *Laccaria Laccata*. J. Chem Ecol 19: 2105-2114

Peter M, Courty PE, Kohler A, Delaruelle C, Martin D, Tagu D, Frey-Klett P, Duplessis S, Chalot M, Podila G, Martin F (2003) Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytol 159: 117-129

Peters NK, Frost JW, Long SR (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science 233: 977-980

Peterson RL, Farquhar ML (1994) Mycorrhizas. Integrated development between roots and fungi. Mycologia 86: 311-326

Peterson RP, Farquhar ML (1996) Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. Bot Rev 62: 1-39

Petit P, Lallemant R, 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, Kapulnik Y (1995) Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts.Trends Microbiol 3: 58-64

Piché Y, Peterson RL, Howarth MJ, Fortin JAA (1983) Structural study of the interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* roots. Can J of Botany. 61: 1185-1193

Piche Y, Peterson RL, Massicotte H (1988) Host-fungus interactions in ectomycorrhizae. In Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis. Edited by S. Scannerini et al., NATO ASI Series, Vol. H17, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 55-71

Plassard C, Bonafos B, Touraine B (2000) Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. Plant Cell and Envir 23: 1195-1205

Pokojska A, Strzelczyk E, Li CY, Rozycki H, Szablewska M (1993) Effect of plant growth regulators on growth of ectomycorrhizal fungi. Cryptogamic Botany 4: 8-13

Polidori E, Agostini D, Zeppa S, Potenza L, Palma F, Sisti D, Stocchi V (2002) Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos-Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. Mol Gen Genom 266: 858-864

Poulin MJ, Bel-Rhlid R, Piché Y, Chenevert R (1993) Flavonoids released by carrot (Daucus carota) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in presence of optimal CO enrichment. J Chem Ecol 19: 2317-2327

R

Rashotte AM, DeLong A, Muday GK (2001) Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport,gravity response, and lateral root growth. Plant Cell 13:1683-1697

Regvar M, Gogala N (1996) Changes in root growth patterns of (*Picea abies*) spruce roots by inoculation with an ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and jasmonic acid treatment. Trees 10: 410-414

Regvar M, Gogala N, Znidarsac N (1997) Jasmonic acid affects mycorrhization of spruce seedlings with *Laccaria laccata*. Trees 11: 511-514

Rijhwani SK, Shanks JV (1998) Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. Biotechnol Prog 3: 442-449

Rincon A, Priha O, Sotta B, Bonnet M, Le Tacon F (2003) Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with Laccaria bicolor. Tree Physiology 23:785-791

Rose SL, Perry DA, Pilz D, Schoeneberger MM (1983) Allelopathic effects of litter on the growth and colonization of mycorrhizal fungi. Chem Ecol 9: 1153-1162

Rousseau JVD, Sylvia DM, Fox AJ (1994) Contribution of ectomycorrhizae to the nutrient absorbing surface area of pine. New Phytol 128: 639-644

Rück A, Palme K, Venis M, Napier R, Felle H (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. Plant J 4: 41-46

Rudawska M, Kieliszewska-Rokicka (1997) Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* strains in relation to their IAA-synthesizing activity. New Phytol 137:509-517

Rupp LA, Mudge KW (1985) Ethephon and auxin induce mycorrhiza-likechanges in the morphology of root organ cultures of Mugo pine. Physiol Plant 64:316-322

Rupp LA, Mudge KW, Negm FB (1989) Involvement of ethylene in ectomycorrhiza formation and dichotomous branching of roots of mugo pine seedlings. Can J Bot 67: 477-482

S

Salzer P, Hebe G, Hager A (1997) Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K+ and Cl- release, extracellular alkalinization and H_2O_2 synthesis of *Picea abies* cells. Planta 203: 470-479

Scherer GFE, Paul RU, Holk A (2000) Phospholipase A(2) in auxin and elicitor signal transduction in cultured parsley cells (Petroselinum crispum L.). Plant Growth Regul 32:123-128

Selosse MA, Bouchard D, Martin F, Le Tacon F (2000) Effect of Laccaria bicolor strains on Douglas fir (Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco) several years after nursery inoculation. Canadian Journal of Forest Research 30: 360-371

Selosse MA, Le Tacon F (1999) Les champignons dopent la forêt. La recherche 319:33-37

Seviour RJ, Chilvers GA (1972) Electrophoretic characterization of Eucalypt mycorrhizas. New Phytol 71: 1107-1110

Seviour RJ, Chilvers GA, Crow WD (1974) Characterization of eucalypt mycorrhizas by pyrolysis/gas chromatography. New Phytol 73: 321-332

Sherrier DJ, VandenBosch KA (1994) Secretion of cell wall polysaccharides in *Vicia* root hairs. Plant J 5: 185-195

Simoneau P, Viemont JD, Moreau JC, Strullu DG (1993) Symbiosis-related polypeptides associated with the early stages of ectomycorrhiza organogenesis in birch (Betula pendula Roth). New Phytol 124: 495-504

Sinclair WA, Sylvia DM, Larsen AO (1882) Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. Forest Sc 28:191-201

Siquiera JO, Nair MG, Hammerschmidt R, Safir GR (1991) Significance of phenolic compounds in plant-soilmicrobial systems. Critical Reviews in Plant Sciences. 10: 63-131

Slankis V (1971) Formation of ectendomycorrhizae of forest trees in relation to light, carbohydrates, and auxin, in E. Hacskaylo (ed.), Mycorrhizae, U.S. Dept. Agric., Misc. Publ. 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, Van Der Straeten D (1997) Ethylene and vegetative development. Physiol Plant 100: 593-605

Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego, US, Ed. 309p

Stachel SE, Messens E, Montagu M, van. 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

Strzelczyk E, 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 Soil 81: 185-194

Strzelczyk E, Pokojska A, Kampert M (1992) The effect of pH on production of plant growth regulators by mycorrhizal fungi. Symbiosis 14: 201-215

Sun YP, Fries N (1992) The effect of tree-root exudates on the growth rate of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. Mycorrhiza 1: 63-69

Surico G, Evidente A, Iacobellis NS, Randazzo G (1985) A cytokinin from the culture filtrate of *Pseudomonas syringae* pv. savastanoi. Phytochem 24: 1499-1502

Surico G, Sparapano L, Lerario P, Durbin RD, Iacobellis N (1975) Cytokinin-like activity in extracts from culture filtrates of *Pseudomonas savastanoi*. Experientia 31: 929-930

Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett MJ (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. Genes and Development 15: 2648-2653

Sztein AE, Cohen JD, Cooke TJ (2000) Evolutionary patterns in the auxin metabolism of green plants. Int J Plant Sci 161: 849-859

T

Tagu D, Marmeisse R, Baillet Y, Riviere S, Palin B, Bernardini F, Mereau A, Gay G, Balestrini R, Bonfante P, Martin F (2002) Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus HydPt-1* gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. European journal of Histochemistry 46: 23-29

Tagu D, Martin F (1996) Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. New Phytol 133: 73-85

Tagu D, Nasse B, Martin F (1996) Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Gene 168: 93-97

Tagu D, Palin B, Balestrini R, Gelhaye E, Lapeyrie F, Jacquot JP, Sautière P, Bonfante P, Martin F (2003) Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-*S*-transferase from *Eucalyptus globulus* roots. Plant Physiol Biochem 41: 611–618

Tarkka MT, Niini SS, Raudaskoski M (1998) Developmentally regulated proteins during differentiation of root system and ectomycorrhiza in Scots pine (*Pinus sylvestris*) with *Suillus bovinus* . Physiologia Plant 104: 449-455

Tarkka MT, Vasara R, Gorfer M, Raudaskoski M (2000) Molecular characterization of actin genes from homobasidiomycetes: two different actin genes from *Schizophyllum commune* and *Suillus bovinus*. Gene 251: 27-35

Tranvan H, Habricot Y, Jeannette E, Gay G, Sotta B (2000) Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. Tree Physiol 20: 123-129

V

Venis MA, Napier RM (1995) Auxin receptors and auxin-binding proteins. Crit Rev Plant Sci 14: 27-47

Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. Plant J 25: 1-12.

W

Wallander H, Nylund JE, Sundberg B (1992) Ectomycorrhiza and nitrogen effects on root IAA: results contrary to current theory. Mycorrhiza 1: 91-92

Wallander H, Nylund JE, Sundberg B (1994) The influence of IAA, carbohydrate and mineral concentration in host tissue on ectomycorrhizal development on *Pinus sylvestris* in relation to nutrient supply. New Phytol 127: 521-528

Waller F, Riemann M, Nick P (2002) A role for actin-driven secretion in auxin-induced growth. Protoplasma 219: 72-81

Wang QY, Nick P (1998) The auxin response of actin is altered in the rice mutant Yin-Yang. Protoplasma 204: 22-33

Ward SP, Estelle M (2001) Auxin signalling involves regulated protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. J Plant Growth Regul 20:265-273

Wessels JGH (1996) Fungal hydrophobins;proteins that function at an interface. Trends in Plant Sc 1: 9-15

Wiemken V, Boller T (2002) Ectomycorrhiza: gene expression, metabolism and the wood-wide web. Curr Op Plant Biol 5: 355-361

Wong KKY, Fortin JA (1990) Root colonization and intraspecific mycobiont variation in ectomycorrhiza. Symbiosis. 8: 197-231

Woo EJ, Marshall J, Bauly J, Chen JG, Venis M, Napier RM, Pickersgill RW (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. EMBO J 21: 2877-2885

Wösten HAB, De Vries OMH, Wessels JGH (1993) Interfacial self-assembly of fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. The Plant Cell 5: 1567-1574

Wösten HAB, Wessels JGH (1997) Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. Mycoscience 38: 363-374

Z

Zazimalova E, Napier RM (2003) Points of regulation for auxin regulation Plant Cell Rep 21: 625–634

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

Mademoiselle **JAMBOIS Anne**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1

en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1013

Nancy, le 1er décembre 2004

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 ★ LE PRESIDENT

J.P. FINANCE

Université Henri Poincaré, Nancy I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY Cédex
Tél. : 03 83 68 20 00 - Fax : 03 83 68 21 00

Résumé :

Certaines étapes de l'ontogenèse ectomycorhizienne nécessiteraient un subtil équilibre entre des molécules actives telles que l'AIA et des molécules régulatrices telles que l'hypaphorine, un alcaloïde indolique synthétisé et accumulé en grande quantité dans les hyphes de *Pisolithus* au contact de la plante hôte. Ici, l'activité stimulatrice des jasmonates sur la synthèse d'hypaphorine a été mise en évidence ; une nouvelle classe d'antagonistes spécifiques et compétitifs de l'activité auxinique a été identifiée, les alcaloïdes indoliques. L'activité de l'hypaphorine et/ou de l'AIA sur l'expression de plus de 4000 gènes de peuplier a été suivie. Parmis les 121 transcrits différentiellement exprimés, un seul d'entre eux codant pour une Extensine-like-Protein est régulé de façon opposée par les deux molécules antagonistes.

Avec l'hypaphorine et certains alcaloïdes indoliques, s'ouvre un champ nouveau d'étude des modes d'action des auxines.

Mots clefs : Hypaphorine, AIA, alcaloïdes indoliques, signaux, ectomycorhize

Summary:

Some steps of the ectomycorrhizae ontogenesis would require a subtle balance between active molecules such as IAA and regulating molecules such as hypaphorine, an indolic alkaloid synthesised and accumulated in large quantities by *Pisolithus* in contact with the host plant. Here the up-regulating activity of jasmonates on hypaphorine synthesis in *Pisolithus* hyphae was evidenced; a new class of IAA competitive-antagonists has been identified, the indole alkaloids. The activity of hypaphorine or/and IAA on gene expression in poplar roots, has been folowed. Amongst121 EST differentially expressed, only one coding for an extensin-like protein was regulated the opposite ways by both antagonist molecules.

With hypaphorine, and some indole alkaloids, opens a new range of investigation of IAA activities.

Key words : Hypaphorine, IAA, Indole alkaloid, signals, ectomycorrhiza