



HAL
open science

Contrôle de l'auxine dans les modifications du développement racinaire du peuplier en réponse au champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

Alice Vayssières

► **To cite this version:**

Alice Vayssières. Contrôle de l'auxine dans les modifications du développement racinaire du peuplier en réponse au champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0017 . tel-01750675

HAL Id: tel-01750675

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750675>

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>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**



Université de Lorraine, Collegium Sciences et Technologies
Ecole Doctorale « Ressources Procédés Produit de l'environnement »

Unité Mixte de Recherche 1136 INRA/Université de Lorraine
Interaction Arbres/Microorganismes
Centre INRA de Nancy
54280 Champenoux

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de docteur
de l'Université de Lorraine en biologie végétale et forestière

Par Alice Vayssières

Contrôle de l'auxine dans les modifications d'architecture racinaire du peuplier en réponse au champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

Soutenance publique le 13 janvier 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

Laurent Laplaze, Directeur de Recherches, IRD, Montpellier
Catherine Perrot-Rechenmann, Directrice de Recherches, CNRS, Gif-sur-Yvette

Examineurs :

Sandra Bensmihen, Chargée de Recherches, CNRS, Toulouse
Yves Jolivet, Professeur, Université de Lorraine (président du jury)
Valérie Legué, Professeur, Université de Clermont-Ferrand (co-directrice de thèse)
Francis Martin, Directeur de recherches, INRA de Nancy (co-directeur de thèse)

REMERCIEMENTS,

Je tiens tout d'abord à remercier Catherine Perrot-Rechenmann, Sandra Bensmihen, Laurent Laplaze et Yves Jovilet, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie, les dirigeants successifs de l'unité « Interactions Arbres/Microorganismes » ainsi que de l'équipe « Ecogénomique des Interactions ».

Valérie, merci de m'avoir donnée l'opportunité de réaliser cette thèse avec un bilan carbone complètement exorbitant !

Francis, merci d'avoir suivi mon travail au cours de ces trois années.

Je remercie Irène Hummel, Sandra Bensmihen et Franck Ditengou pour avoir participé à mon comité de thèse.

Je remercie Franck Ditengou pour m'avoir accueillie à Freiburg dans son laboratoire.

Je remercie Karin Ljung pour avoir été intéressée par notre projet de recherche et Ales Pěňčík pour avoir analysé mes échantillons.

Je remercie Manon Boudin qui a participé à la longue tâche de traçage de racines au cours de son stage de Master 1. Merci aussi à Céline Cottier, en stage avec Valérie et moi, dont le travail n'est pas présenté ici, mais dont les réflexions complexes nous ont donné beaucoup/trop de perspectives de travail.

Jean Pierre Lecler, merci beaucoup pour le suivi de nos peupliers de stock et pour m'avoir toujours trouvée un petit panier pour les situations de crise.

Je souhaite aussi remercier Claire Veneault-Fourrey et Annegret Kohler pour nos discussions techniques et scientifiques au quotidien.

Encore merci Irène pour les discussions que nous avons eues.

Merci à Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot pour les discussions « Racine », ainsi qu'à tous les membres du « Root club ».

Agnès, un grand merci pour ton soutien professionnel, actuellement semi-professionnel et personnel (et merci Manu).

Merci Jean-Louis, Patrice, Joëlle, Nicolas, Christine, Jonathan, Nicole, Emilie, Manue, Vincent, Laura, Rita, Béatrice, Marie-Claude et toutes les autres personnes non citées ici... pour votre travail au quotidien et vos aides ponctuelles.

Merci Adeline pour le peuplier... et l'auxine...

... et le JAF+K → for helpful discussions.

Table des matières

AVANT PROPOS.....	4
INTRODUCTION.....	5
Etude bibliographique.....	6
1 Les symbioses ectomycorhiziennes.....	6
1.1 L’ectomycorhize, une interaction bénéfique parmi beaucoup d’autres au sein de la rhizosphère	6
1.2 Aspects phylogénétiques et évolutifs de la symbiose ECM	7
1.3 Les effets bénéfiques de la symbiose sur la plante hôte : des échanges nutritifs mais pas seulement.....	8
1.4 Le développement de la mycorhize	9
1.4.1 Structure des racines ectomycorhizées.....	9
1.4.2 Les modifications du système racinaire.....	10
1.5 Le dialogue moléculaire lors de la formation de la mycorhize.....	10
1.5.1 Les signaux de pré-colonisation entre les deux partenaires.....	11
1.5.2 Les signaux symbiotiques au cours du contact entre les deux partenaires.....	12
2 Importance de l’auxine dans les modifications de l’architecture racinaire	15
2.1 Importance de la régulation des gradients auxiniques dans la plante	15
2.2 Les acteurs qui participent à la réponse à l’auxine.....	17
2.2.1 Perception et signalisation de l’AIA.....	17
2.2.2 L’homéostasie de l’AIA	19
2.2.3 Le transport polarisé de l’auxine	23
2.2.4 Régulation de l’homéostasie de l’auxine par sa compartimentation intracellulaire	26
2.3 Croissance et développement racinaire.....	27
2.3.1 La croissance racinaire.....	28
2.3.2 Les différents stades de la formation de la RL.....	28
2.4 L’auxine régule la croissance racinaire.....	29
2.4.1 L’auxine régule positivement la division cellulaire dans la zone méristématique.....	30
2.4.2 L’auxine régule l’élongation cellulaire	31
2.4.3 Les voies qui régulent la transition division/élongation cellulaire	32
2.5 L’implication de l’auxine dans la formation de la RL	33
3 L’auxine dans les interactions plantes-microorganismes.....	35
3.1 Implication des voies de l’auxine dans les modifications de l’architectures racinaires en réponse aux micro-organismes bénéfiques	35
3.2 L’auxine dans l’infection de la plante par les pathogènes	43
3.3 Implication de l’auxine dans la formation de la racine ECM	44
Objectifs de la thèse.....	46

RESULTATS.....	48
Partie I : La colonisation de <i>L. bicolor</i> sur la racine de peuplier modifie la réponse à l’auxine, la signalisation auxinique et le métabolisme de l’auxine.....	49
Partie II : L’arrêt de la croissance racinaire de peuplier est observé en absence de formation du réseau de Hartig.....	78
1 Introduction	78
2 Matériels et méthodes	79
3 Résultats	80
3.1 L’inhibition de la croissance racinaire semble précéder la formation du réseau de Hartig.....	80
3.2 L’inhibition de la croissance racinaire de la plante hôte est observée en absence du réseau de Hartig	81
3.3 L’absence du réseau de Hartig ne modifie pas la diminution de la réponse auxinique dans la mycorhize.....	80
3.4 L’application du peptide MISSP7 ne modifie pas la réponse auxinique à l’apex racinaire du peuplier.....	80
4 Discussion et perspectives	83
Partie III : Implication de PtaPIN9 dans les modifications du développement racinaire du peuplier en réponse à <i>L. bicolor</i>.....	85
1 Introduction	85
2 Matériels et Méthodes	86
2.1 Caractérisation du matériel végétal et du système de culture	86
2.2 Immunolocalisation de PtaPIN9	86
2.2.1 Obtention des anticorps	86
2.2.2 Protocole d’immunolocalisation.....	87
2.3 Observation du réseau de Hartig après coloration avec l’iodure de propidium	88
3 Résultats	88
3.1 PtaPIN9 est homologue de AtPIN2 de par sa localisation racinaire	88
3.2 La modification de l’expression de <i>PtaPIN9</i> ne conduit pas à une stimulation des RLS en réponse à <i>L. bicolor</i>	89
3.3 La localisation de PtaPIN9 en réponse à <i>L. bicolor</i> dans les phases précoces ne semble pas être affectée	90
3.4 L’expression et la localisation de PtaPIN9 semblent être affectées dans la mycorhize mature	90
3.5 Les modifications de l’expression de <i>PtaPIN9</i> n’affectent pas l’arrêt de la croissance racinaire lors de la formation de la mycorhize	91
3.6 Les modifications de l’expression de <i>PtaPIN9</i> n’affectent pas la formation de la mycorhize	92
4 Discussion et perspectives	93
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	96
1 Arrêt de la croissance racinaire de la plante hôte dans le contexte ECM	98
1.1 Cinétique de l’arrêt de la croissance racinaire	98

1.2	L'arrêt de la croissance racinaire est elle dépendante de la colonisation de la racine par le partenaire fongique?	99
1.3	Quels sont les mécanismes de l'équilibre division-élongation/différentiation impliqués dans l'inhibition de croissance racinaire ?	100
2	Les changements de l'homéostasie auxinique dans la mycorhize expliquent ils le phénotype d'arrêt de la croissance racinaire ?	101
2.1	Le gradient auxinique à l'apex racinaire est-il modifié dans la mycorhize?.....	101
2.2	L'environnement auxinique est-il affecté en contact avec <i>L. bicolor</i> ?	103
2.3	Comment estimer la quantité et la localisation de l'auxine dans la mycorhize ?	104
2.4	Comment expliquer la double réponse auxinique dans la mycorhize ?	105
3	L'auxine fongique : une molécule signal ?	106
3.1	L'auxine fongique est-elle responsable de l'arrêt de croissance racinaire ?	106
3.2	Rôle de l'auxine fongique dans la colonisation de la plante par le champignon	107
4	Un réseau complexe de la régulation des voies hormonales dans la racine ectomycorhizée	108
5	Vers la compréhension des mécanismes moléculaires de la régulation de la croissance racinaire du peuplier	109
	COMPLEMENT D'EDUDE.....	110
	Analyse transcriptomique des racines de peuplier au cours de la formation de la mycorhize.....	111
1	INTRODUCTION	112
2	RESULTATS ET DISCUSSION.....	113
2.1	Analyse des gènes différentiellement exprimés lors de la formation de la mycorhize	113
2.2	Identification de gènes marqueurs de la symbiose ECM peuplier- <i>L. bicolor</i>	114
2.3	Gènes dont l'expression est uniquement induite dans la mycorhize mature.....	117
2.4	L'analyse des données transcriptomiques suggère des interactions hormonales dans la mycorhize mature.....	117
	REFERENCES BIBLIIOGRAPHIQUES.....	118

AVANT PROPOS

Ma thèse a été réalisée au centre INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Nancy, au sein de l'Unité Mixte de Recherche « Interaction Arbres/Micro-Organismes » (I.A.M). Les recherches menées au centre portent sur le fonctionnement des écosystèmes forestiers. L'UMR IAM, rattachée à l'INRA et à l'Université de Lorraine, s'intéresse plus particulièrement aux relations entre les arbres, les champignons et les bactéries, qu'elles soient à bénéfices réciproques ou pathogènes (Read and Perez-Moreno, 2003). Mon projet de thèse s'intègre dans une des cinq thématiques du laboratoire, qui concerne l'étude des mécanismes moléculaires des interactions arbres-champignons-bactéries du sol. Plus particulièrement, il vise à comprendre l'implication des voies de l'auxine dans les modifications de l'architecture racinaire observées dans l'interaction ectomycorhizienne (ECM) entre le peuplier et le champignon ECM *Laccaria bicolor*. Ma thématique de recherche s'inscrit donc à l'interface de deux disciplines : les interactions plantes-microorganismes et le développement racinaire.

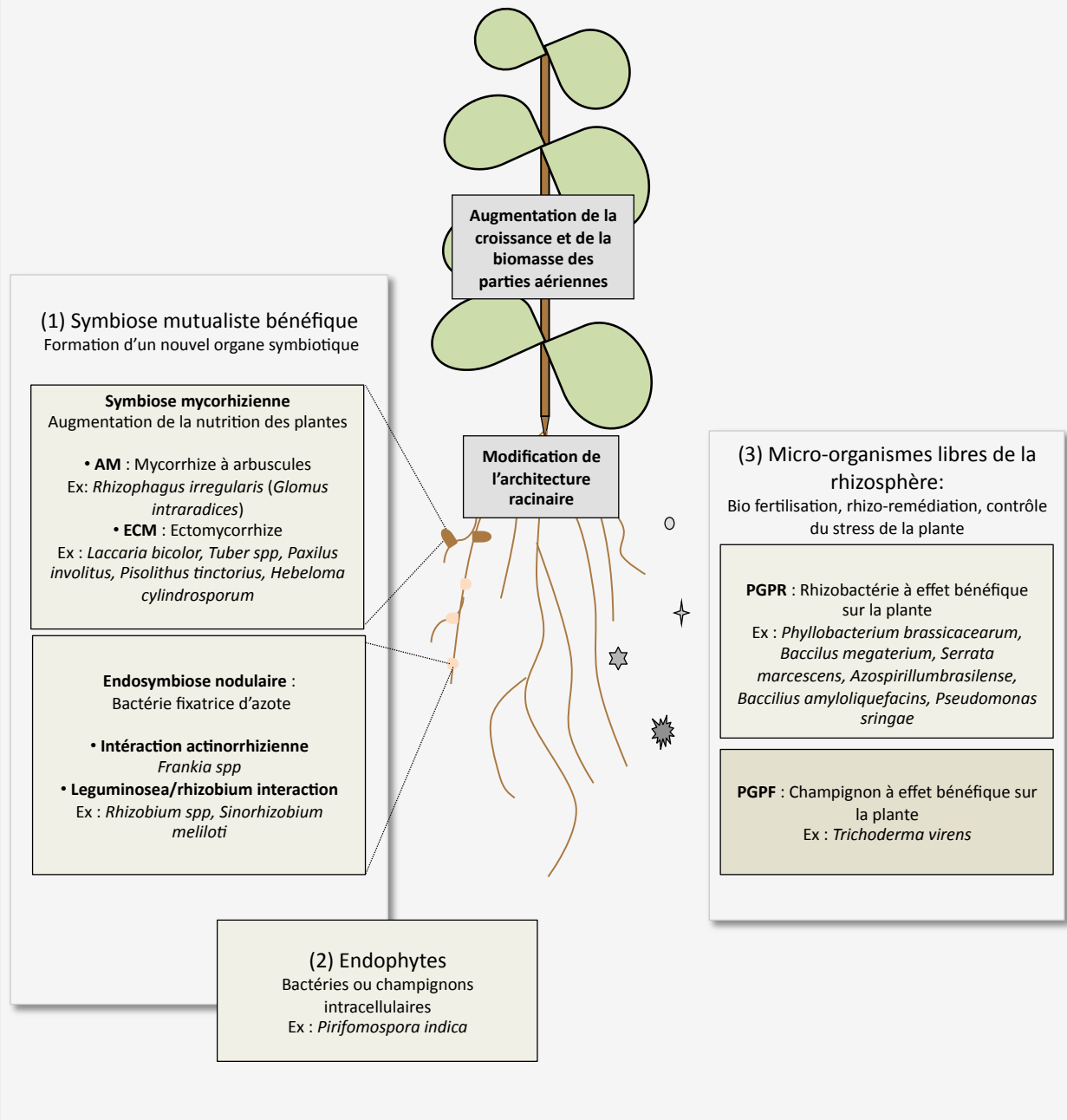
INTRODUCTION

L'introduction de ce document est constituée de deux parties. La première concerne un état de l'art des connaissances nécessaires à la compréhension des résultats obtenus au cours de la thèse. Une synthèse des données acquises sur les mécanismes d'interactions ECMs, le développement de l'organe symbiotique ainsi que le dialogue moléculaire connu lors de l'interaction est présentée. Deuxièmement, le rôle de l'auxine dans la mise en place du système racinaire est décrit. Par la suite, je reviendrai sur le rôle de l'auxine dans les interactions pathogènes et bénéfiques pour la plante. Ce paragraphe inclut un article de revue publié dans « *Plant Cell and Environment* » (Sukumar *et al.*, 2013) et auquel j'ai participé. L'élaboration de la revue repose sur la collaboration avec l'équipe de G. Tuskan à l'ORNL (Oak Ridge National Lab, Etats Unis), mise en place dans le cadre du projet de collaboration « Plant-Microbe Interface ».

A la suite de l'état de l'art, j'exposerai les objectifs de la thèse. Parallèlement, des encadrés illustreront les modèles utilisés ainsi que des outils décrits dans la littérature et utilisés au cours de la thèse.

Encadré 1 : Classification des microorganismes capables d'interagir avec les racines des plantes hôtes

Cette figure illustre les différents groupes de microorganismes du sol établissant des interactions mutualistes avec différentes espèces de plantes. Un certain nombre d'organismes modèles sont cités pour permettre une meilleure compréhension de cet état de l'art. Les principaux effets observés sur la plante hôte sont présentés.



Etude bibliographique

1 Les symbioses ectomycorhiziennes

1.1 L'ectomycorhize, une interaction bénéfique parmi beaucoup d'autres au sein de la rhizosphère

De Bary, définit en 1887 la symbiose mutualiste comme une interaction bénéfique pour les deux partenaires. Au sein de la rhizosphère, trois types d'interactions mutualistes peuvent être rencontrés avec la racine des plantes ([Encadré 1](#)) (1) celles impliquant la formation de nouvelles structures symbiotiques dans lesquelles a lieu l'échange de nutriments entre les deux partenaires (Smith & Read, 2008), (2) les interactions avec des micro-organismes dits endophytes de la racine, conduisant à la pénétration du micro-organismes au sein de l'organe (Kageyama *et al.*, 2008) et (3) les interactions entre des bactéries ou des champignons libres du sol appelées respectivement PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ; Lugtenberg & Kamilova, 2009) ou PGPF (Plant Growth Promoting Fungi). Il a été mis en évidence que l'ensemble de ces interactions se traduit par un effet bénéfique sur la croissance de la plante hôte et induit des modifications de l'architecture racinaire ([Encadré 1](#) ; Sukumar *et al.*, 2013).

Parmi les interactions qui induisent la formation d'un nouvel organe symbiotique, nous pouvons distinguer : les endosymbioses dans lesquelles le microorganisme est présent à l'intérieur de la cellule de la plante hôte et, les ectosymbioses ou les échanges se déroulent au sein de l'apoplaste. Les endosymbioses nodulaires fixatrices d'azote intègrent les interactions entre les légumineuses et des *Rhizobium* ainsi que les interactions entre les plantes actinorhiziennes avec des bactéries du genre *Frankia* (Pawlowski & Demchenko, 2012). D'autre part, les symbioses mycorhiziennes à arbuscules, qui concernent plus de 90% des plantes terrestres et des champignons de l'ordre des *Glomales*. Enfin, les symbioses dites ectomycorhiziennes (ECMs) développent aussi des structures symbiotiques particulières ; ce sont celles-ci qui vont nous intéresser par la suite (Smith & Read, 2008).

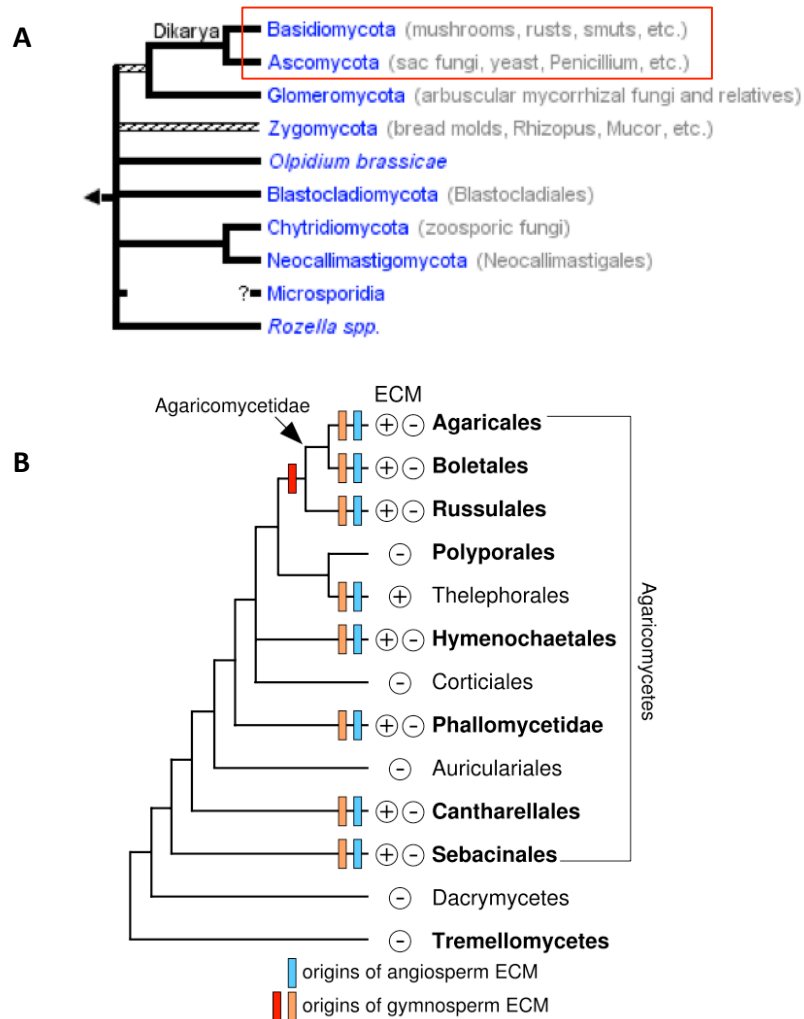


Figure 1 : Origines diverses des ECMs parmi les Basidiomycotes et les Ascomycotes

A ; Les organismes de la lignée des champignons capables de former des ECM font partie principalement des divisions des *Basidiomycota* et des *Ascomycota*, encadrés en rouge (<http://tolweb.org/Fungi/2377> ; TREE of LIFE web project). B ; Apparitions polyphylétiques des ECMs, 6 à 8 fois chez les *Agaricomycotina* sous groupe des *Basidiomycota* comportant le plus de champignons ECM (Extrait de Hibbet & Matheny , 2009).

1.2 Aspects phylogénétiques et évolutifs de la symbiose ECM

Les symbioses ECM concernent seulement 3% des phanérogames (plantes à graines) mais 70% des espèces forestières des régions tempérées, boréales, méditerranéennes et subtropicales. Ces plantes hôtes sont principalement des espèces ligneuses pérennes, parmi lesquelles une majeure partie des *Pinaceae* (gymnospermes) ainsi que 33 familles d'angiospermes dont les *Betulaceae*, *Cistaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Fagaceae*, *Myrtaceae*, *Salicaceae* et *Fabaceae* (Wang & Qiu, 2006). Les champignons impliqués dans les ECMs concernent environ 5000 à 6000 espèces, qui appartiennent principalement au phylum des basidiomycètes ainsi qu'à celui des ascomycètes ([Figure 1A](#) ; Molina *et al.*, 1992).

L'origine des ECMs est estimée entre 130 et 180 millions d'années, proche de l'origine des angiospermes (estimée à 200 millions d'années) ainsi que celle des basidiomycètes. Cette datation suggère que l'ECMs représentent une symbiose « jeune » en regard de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, datée entre 460 et 350 millions d'années (Simon *et al.*, 1993). Les analyses phylogénétiques décrivent l'origine des ECMs en plusieurs fois et indépendamment au cours de l'évolution, six à huit fois chez les gymnospermes et huit fois chez les angiospermes, suggérant qu'elles ne sont pas toutes issues d'un ancêtre commun identique ([Figure 1B](#) ; Hibbett *et al.*, 2000 ; Hibbett & Matheny, 2009). Par ailleurs, une faible spécificité de la plante hôte pour le partenaire fongique est observée. Il est estimé que pour une même espèce d'arbre située à des géolocalisations différentes, des milliers d'espèces différentes de champignons ECMs sont associées (Trappe & Fogel, 1977). De plus, de nombreuses espèces de champignons ECMs ont été identifiées sur le système racinaire d'un même individu (Bruns, 1995).

Dans l'étude des ECMs par la communauté scientifique, de nombreux couples d'interactions sont utilisés dont *Eucalyptus sp.-Pisolithus tinctorius*, *Pinus sp.-Hebeloma cylindrosporum*, *Quercus robur-Piloderma croceum*. Au sein de notre laboratoire, l'utilisation du couple *Populus sp.-Laccaria bicolor* a été privilégié comme modèle d'étude ([Encadré 2](#)).

Encadré 2 : Peuplier-*Laccaria bicolor* : une interaction ECM modèle

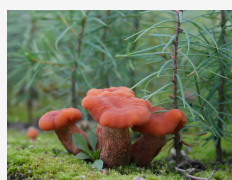
Le peuplier appartient à la famille des *Salicaceae* dont les plus répandus sont des genres *Salix* (saule) et *Populus* (tremble et peuplier). Avec le peuplier noir (*P. nigra*), le tremble (*P. tremula*) et le peuplier blanc (*P. alba*) composent les trois espèces endémiques de peupliers européens. Le peuplier utilisé au sein du laboratoire est un hybride *P. tremula* x *P. alba*, clone INRA 717-1-B4.

Les hybrides de peupliers sont devenus des arbres modèles à 2 niveaux :

(1) Modèle de laboratoire : Le génome du peuplier originaire d'Amérique du nord *P. trichocarpa* (clone Nisqually-1) a été séquencé en 2006 par l'équipe de G. Tuskan et ses collaborateurs (Tuskan *et al.*, 2006). Le génome du peuplier est décrit de petite taille 520Mb et a subi une duplication. La séquence génomique de *P. trichocarpa* est donc disponible [A] et est continuellement annotée [B], ce qui a permis le développement récent de nouvelles bases de données utilisées pour visualiser les méta données par gènes cibles [C] ; Sjödin *et al.*, 2009).

La transformation génétique est le problème majeur de l'étude fonctionnel de gènes chez les arbres. La transgénése du peuplier a été rapportée pour plusieurs hybrides du genre *Populus* tels que *P. tremula* x *P. tremuloides* (clone T89), *P. canescens* x *P. grandidentata* et *P. tremuloides* x *P. davidiana* (Busov *et al.*, 2010). L'hybride le plus utilisé pour la transformation reste l'hybride *Populus tremula* x *P. alba*, (clone INRA 717-1-B4 ; Leplé *et al.*, 1992).

(2) Modèle d'intérêt économique : Le bois de peuplier est utilisé pour confectionner des emballages légers de forme et de capacités très diverses ainsi que des panneaux de contreplaqués. Il est l'un des arbres principalement cultivé en France [D]. De plus, le bois est maintenant apparu comme une source d'énergie renouvelable, qui pourrait être utilisée comme alternative au pétrole. Le peuplier est actuellement cultivé en courtes rotations. De part la croissance rapide, ces cultures permettent de produire de la biomasse rapidement et ainsi d'utiliser la cellulose du bois pour produire du bioéthanol (Dickmann, 2006).



Martin *et al.*, 2008

L. bicolor est un champignon basidiomycète de la famille des Lacaires largement répandu. Le génome de *L. bicolor* a été séquencé par l'équipe de F. Martin et ses collaborateurs en 2008 (Martin *et al.*, 2008, [E]). Les annotations associées ont permis d'identifier des petites protéines secrétées (nommées MISSP) qui pourraient jouer un rôle dans l'interaction symbiotique avec la plante hôte.

En utilisant *Agrobacterium tumefaciens*, il est difficile mais possible de le transformer génétiquement (Kempainen *et al.*, 2009).

Le modèle d'interaction peuplier-*L. bicolor* :

De par la disponibilité de leur génome respectif, ainsi que de la capacité de les cultiver en système de culture *in vitro*, ces deux partenaires ont été choisis comme interaction ECM modèle. Leur co-culture en condition *in vitro* conduit à la colonisation du champignon autour de la racine, puis à la formation d'un réseau de Hartig entre les cellules de l'épiderme (Images ci-contre ; Felten *et al.*, 2009). A ce jour, à l'ère génomique, le génome d'autres arbres dont l'épicéa et l'Eucalyptus sont disponibles (Nystedt *et al.*, 2013; <http://www.phytozome.net/>). Ces espèces sont aussi utilisées dans les études sur les symbioses ECMs. Parallèlement, le séquençage de nombreux champignons ECMs a été initié. Les données obtenues faciliteront l'utilisation d'autres modèles d'un point de vue moléculaire.

Références et outils disponibles sur ce modèle :

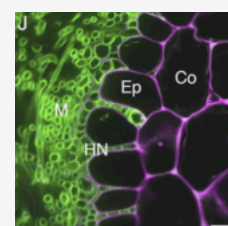
[A] http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html

[B] http://www.phytozome.net/search.php?method=Org_Ptrichocarpa

[C] <http://www.popgenie.org/>

[D] www.peupliersdefrance.org

[E] <http://genome.jgi.doe.gov/Lacbi2/Lacbi2.home.html>



Felten *et al.*, 2009

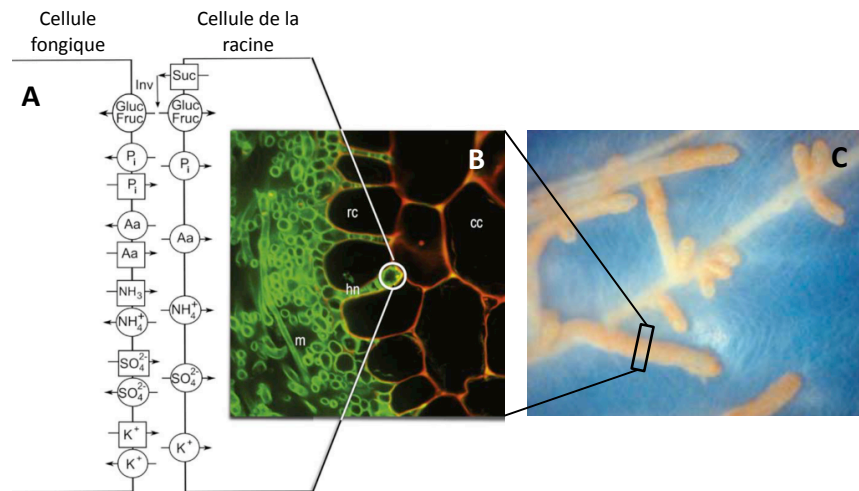


Figure 2 : Principaux échanges entre le champignon ECM et la plante hôte

(A) Schématisation des échanges trophiques qui ont lieu au sein du réseau de Hartig (B) dans la mycorhize mature (C). Les importeurs sont notés dans des ronds et les exporteurs dans des carrés. Suc : saccharose; Fruc: fructose; Inv : invertase ; Pi : phosphate inorganique; Aa: acides aminée ; NH₃: ammonia; NH₄⁺: ammonium; SO₄²⁻: sulfate, K⁺: potassium. B; Observation microscopique d'une coupe transversale de mycorhize (C) formée entre le peuplier et *L. bicolor*. rc: cellules du rhizoderme, cc: cellule du cortex, m: manteau fongique, hn: réseau de Hartig. (D'après Martin et Nehls 2009)

1.3 Les effets bénéfiques de la symbiose sur la plante hôte : des échanges nutritifs mais pas seulement

L'azote et le phosphate sont considérés comme les principaux facteurs limitant de la croissance de la plante (Marschner, 1995 ; Gojon *et al.*, 2009 ; Maathuis, 2009). Dans les forêts boréales et tempérées de l'hémisphère nord à sols pauvres, les arbres interagissent principalement avec les champignons ECMs, qui peuvent fournir jusqu'à 70% des ressources en azote et phosphate (Smith & Read, 2008).

L'azote est majoritairement absorbable par la plante sous les formes inorganiques NO_3^- et NH_4^+ . Or, l'azote étant présent dans le sol majoritairement sous forme de polymères de composés azotés et d'acides aminés, il devient difficilement assimilable par la plante ([Figure 2](#) ; Xu *et al.*, 2012). Les champignons ECMs sont capables *via* l'activité de leurs transporteurs, d'absorber les composés azotés (Müller *et al.*, 2007 ; Plassard *et al.*, 2011). Une fois hydrolysés en ammonium, ces composés sont transportés vers l'apoplaste et assimilables par la plante hôte ([Figure 2](#) ; Chalot *et al.*, 2006 ; Casieri *et al.*, 2013). D'autre part, le phosphate, disponible proche de la racine, est rapidement absorbé par la plante sous sa forme inorganique HPO_3^+ , et devient un facteur limitant dans la croissance de la plante. Les champignons ECM favorisent l'assimilation du phosphate par le réseau d'hyphes extramatriciels (Plassard *et al.*, 2011). De plus, les champignons ECMs sont capables de mobiliser l'azote et le phosphate sous les formes organiques du sol grâce à un cocktail d'enzymes exportées dans le sol ([Figure 2](#) ; Müller *et al.*, 2007 ; Lucic *et al.*, 2008 ; Plassard *et al.*, 2011).

Il ne faut pas négliger la part essentielle du transfert d'autres nutriments, dont le sulfate (SO_4^-) et le potassium (K^+) du champignon vers la plante hôte ([Figure 2](#) ; Casieri *et al.*, 2013).

De son côté, la plante va fournir au champignon des éléments carbonés, produits de la photosynthèse. Dans les systèmes ectomycorhiziens, entre 2 à 30% des photosynthétats sont transportés de la plante hôte vers le partenaire fongique (Smith & Read, 2008). Curieusement, le saccharose considéré comme l'ose le plus transporté dans la plante, ne peut être assimilable par le champignon. Il est donc supposé que le saccharose est délivré dans l'interface plante-champignon, ensuite hydrolysé en hexoses, glucoses et fructoses par

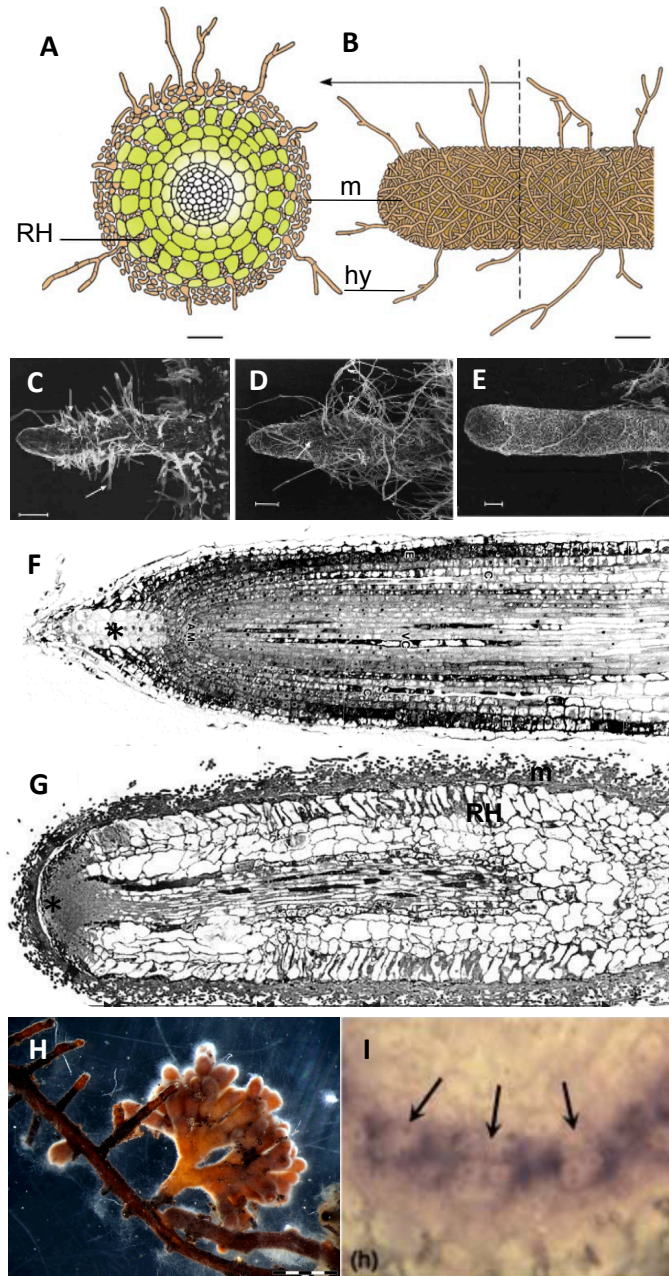


Figure 3 : Caractéristiques de la structure de l'organe symbiotique dans la symbiose ectomycorhizienne

A-B ; Schématisation en coupe transversale (A) des trois principales structures de la mycorhize (B) : le manteau fongique d'hyphes ramifiés, le réseau de Hartig ainsi que les hyphes extra matriciels qui explorent le sol (D'après Landeweert *et al.*, 2001). C-E ; Disparition progressive des poils absorbants dans la RL de *Betula alleghaniensis* en contact avec *Pisolithus tinctorius*, observées au microscope électronique à balayage, barres=100µm, (Massicotte *et al.*, 1990). F-G ; Comparaison de la structure racinaire de coupes longitudinales de RL d'*Eucalyptus pilularis* et d'une mycorhize formée avec le champignon ECM *Pisolithus tinctorius*. Noter la modification de la structure de la coiffe racinaire (*) ainsi que la croissance radiale des cellules de l'épiderme en contact avec les hyphes du champignon (Massicotte *et al.*, 1987)

H ; Observation de mycorhizes dioïques de structure coralloïde de racines de *Pinus sp* (<http://mykorhizy.webpark.cz/morphology.htm>) ; I, nouvelles divisions et formation de deux méristèmes indépendants de celui préformé (flèches, Laajanen *et al.*, 2007).

RH: Réseau de Hartig, m: manteau fongique, hy: hyphe extramatricielle,

des invertases directement dans l'apoplaste et ces composés sont transportés par le champignon ([Figure 2](#) ; Nehls *et al.*, 2001 ; Casieri *et al.*, 2013).

Il a été montré que les interactions ECMs n'ont pas seulement un effet sur la nutrition de la plante hôte mais aussi dans la réponse à des stress biotiques et abiotiques. Une meilleure résistance à certains pathogènes a été mise en évidence dans différents pathosystèmes lorsque la plante est mycorhizée (Pfabel *et al.*, 2012 ; Nagy and Fossdal, 2013). Une meilleure croissance des plantes mycorhizées, cultivées en condition de contraintes osmotiques est aussi décrite (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2004 ; Valdés *et al.*, 2006; Langenfeld-Heyser *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2009). De plus, la capacité du champignon à absorber les métaux lourds permet de créer une niche écologique qui favoriserait la croissance de la plante sur des sites pollués (Blaudez *et al.*, 2000).

1.4 Le développement de la mycorhize

1.4.1 Structure des racines ectomycorhizées

Il existe une diversité considérable de la structure du développement des ECMs qui est fonction des couples d'interactions concernés (Smith & Read, 2008). Néanmoins, la mycorhize mature est caractérisée par trois structures communes : la mise en place d'un manteau d'hyphes fongiques dense autour de la racine ([Figures 3A et 3B](#)), qui va conduire ensuite à la formation d'un réseau mycélien ramifié entre les cellules épidermiques et corticales de la racine, appelé le réseau de Hartig ([Figures 3A et 3B](#) ; Massicotte *et al.*, 1987). L'échange de nutriments entre le champignon et la plante est localisé au niveau de ce réseau à travers l'apoplasme ([Figure 2](#) ; Smith & Read, 2008). Il a été proposé que lors de l'interaction des racines de l'Eucalyptus avec *Pisolithus ssp.*, la colonisation de la racine débute par la colonisation des hyphes fongiques à l'apex de la racine qui envahissent progressivement l'ensemble de la racine (Horan *et al.*, 1988). Parallèlement, le réseau d'hyphes extramatriciels se développe. Ce réseau, élément majeur dans l'exploration du sol environnant, est responsable de l'absorption des nutriments, monnaie d'échange du champignon dans l'interaction ([Figures 2 et 3](#) ; Rousseau *et al.*, 1994)

1.4.2 Les modifications du système racinaire

Un système racinaire mycorhizien se caractérise par la présence de nombreuses racines courtes et gonflées résultant d'une stimulation de la formation des racines latérales (RLs) et d'un arrêt de croissance de celles-ci. La stimulation de la formation de RLs a été décrite chez de nombreuses plantes hôtes telles que *Pinus pinaster*, *Picea abies*, *Cistus incanatus* et *Populus tremula* x *P. alba* (Burgess *et al.*, 1996 ; Tranvan *et al.*, 2000 ; Niemi *et al.*, 2002 ; Rincón *et al.*, 2003 ; Felten *et al.*, 2009 ; Splivallo *et al.*, 2009). Bien que la mycorhize soit connue pour son phénotype de « racine courte », l'arrêt de croissance racinaire est mal caractérisé. Il a été montré que *Tuber ssp* inhibe la croissance racinaire de *Cistus incanatus* (Splivallo *et al.*, 2009), mais d'autres études observent une augmentation de la croissance racinaire de *Picea abies* et *Pinus pinaster* en présence du champignon *Laccaria bicolor* et *Hebeloma cylindrosporum* (Karabaghli *et al.*, 1998 ; Tranvan *et al.*, 2000).

Au cours de la colonisation de la racine par les hyphes fongiques, une modification des cellules de l'épiderme est observée, dont la disparition des poils absorbants et la croissance radiale des cellules de l'épiderme ([Figures 3C à 3G](#) ; Massicotte *et al.*, 1987 ; Ditengou *et al.*, 2000). Ces phénotypes sont accompagnés par une réduction de la coiffe racinaire et de la taille de la zone méristématique ([Figures 3F et 3G](#) ; Massicotte *et al.*, 1987 ; Horan *et al.*, 1988). Bien que ces modifications cytologiques soient bien connues, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ne le sont pas.

Lors de la mycorhization des espèces du genre *Pinus*, une dichotomisation de l'apex racinaire est observée ; elle peut atteindre jusqu'à 30 ramifications, ce qui forme une structure coralloïde des mycorhizes ([Figures 3H et 3I](#) ; Smith & Read, 2008).

1.5 Le dialogue moléculaire lors de la formation de la mycorhize

Les acteurs des voies de signalisation impliqués dans la formation de l'ECM sont peu connus. Le partenaire végétal étant pour la majorité un arbre, les études des voies de signalisation par voie génétique restent difficiles à réaliser. Par ailleurs, l'apparition à plusieurs reprises au cours du temps de la symbiose ECM réduit la possibilité de voies de signalisation communes. Cependant, certaines stratégies convergentes peuvent être

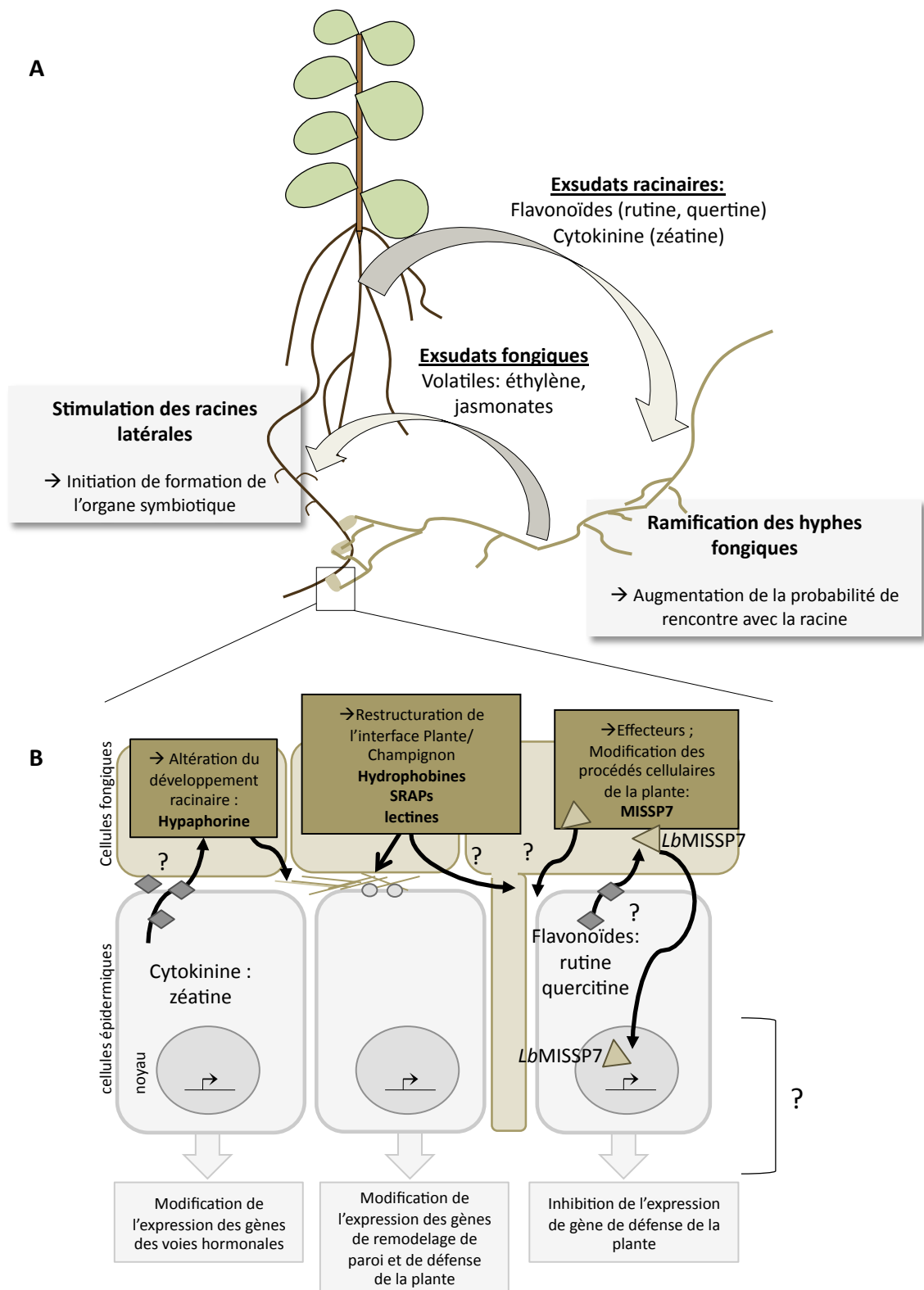


Figure 4 : Signaux symbiotiques identifiés lors de la formation de la mycorhize

A ; Signaux précoces de l'interaction. Des signaux tels que des flavonoïdes (rutines ou quertines) et des cytokinines (zéatine) émis par les racines induisent une ramification des hyphes fongiques. Des signaux fongiques volatiles tels que l'éthylène ou des jasmonates, émis par le champignon stimulent la formation des RLs dans la plante. B ; Signaux mis en place lors du contact entre les cellules fongiques et les cellules de l'épiderme de la plante qui vont induire des modifications du développement racinaire, restructurer l'interface entre les deux partenaires et modifier les processus cellulaires de défense et hormonale de la plante. *LbMISSP7*: effecteur de *L. bicolor* Mycorrhiza Mycorrhiza Induced Small Secreted Proteins 7. Voir Felten *et al.*, 2012

décrites. Deux types de signaux peuvent être distingués : 1) les signaux dit précoces, observés lors de la pré-colonisation du champignon sur le racine, 2) les signaux impliqués par la suite lors de la mise en place de l'organe symbiotique ([Figure 4](#)).

1.5.1 Les signaux de pré-colonisation entre les deux partenaires

Les signaux pouvant jouer un rôle dans les étapes précoces de l'interaction sont étudiés à travers deux phénotypes : la stimulation de la ramification des hyphes du partenaire fongique et la stimulation des RLs de la plante hôte ([Figure 4A](#)).

Les échanges de signaux entre les deux partenaires se traduisent par une stimulation de la ramification des hyphes fongiques, augmentant ainsi la probabilité de rencontre avec les racines de la plante hôte. Il a été mis en évidence que l'auxine, certaines cytokinines telles que la zéatine, ainsi que l'application d'exsudats racinaires, induisent la croissance, la ramification ainsi que la germination des spores des champignons ECMs ([Figure 4A](#) ; Gay & Debaut, 1987 ; Gogala, 1991). Les flavonoïdes, connues pour être impliquées dans les étapes précoces des interactions *Rhizobium*-Légumineuses et des mycorhizes à arbuscules (Aguilar *et al.*, 1988 ; Bécard *et al.*, 1992) ont aussi été identifiées comme régulatrices de la croissance des hyphes fongiques d'ECMs (Lagrange *et al.*, 2001). La rutine, une flavonole, identifiée dans les exsudats racinaires d'*Eucalyptus globulus*, induit la croissance de *Pisolithus sp.* ([Figure 4A](#) ; Lagrange *et al.*, 2001).

Du côté de la plante hôte, une stimulation de la formation de RLs a été décrite dans les étapes précoces de la mise en place de la mycorhize (Burgess *et al.*, 1996 ; Tranvan *et al.*, 2000 ; Niemi *et al.*, 2002 ; Rincón *et al.*, 2003 ; Felten *et al.*, 2009 ; Splivallo *et al.*, 2009), et ceci en absence de contact physique entre les deux partenaires (Felten *et al.*, 2009 ; Splivallo *et al.*, 2009 ; Felten *et al.*, 2010). De manière surprenante, une stimulation de la formation des RLs d'une plante non hôte, *Arabidopsis thaliana*, a été observée en réponse à *L. bicolor* et à *Tuber sp.* (Felten *et al.*, 2009 ; Splivallo *et al.*, 2009 ; Felten *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent la production et la libération de molécules volatiles par le champignon ([Figure 4A](#)). Une étude de Splivallo et ses collaborateurs a montré que l'éthylène serait à l'origine de cette stimulation. Le mutant *ein2*, d'*A. thaliana* affecté dans la signalisation de l'éthylène, est moins sensible à *Tuber ssp* en terme de stimulation des RLs, comparé aux plantes

sauvages (Splivallo *et al.*, 2009). Parallèlement, plusieurs études ont démontré la capacité de certains champignons ECMs à produire de l'éthylène, mais d'autres en sont incapables tels que *Pisolithus tinctorius* (Graham & Linderman, 1980 ; Rupp & Mudge, 1985 ; Splivallo *et al.*, 2009), suggérant un rôle important de l'éthylène comme molécule signal dans certaines interactions. D'autres études montrent que les jasmonates ou méthyljasmonates seraient impliquées dans les phases précoces de l'interaction (Figure 4A ; Regvar & Gogala, 1997). Ces deux phytohormones, appliquées de manière exogène sur la racine induisent la formation de nouvelles RLs (Swarup *et al.*, 2007 ; Ivanchenko *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2009).

1.5.2 Les signaux symbiotiques au cours du contact entre les deux partenaires

- Signaux mis en place par le champignon

Au cours de la formation de la mycorhize, le partenaire fongique sécrète des molécules, induisant une structuration de l'interface plante-champignon et favorise ainsi la pénétration des hyphes fongiques entre les cellules racinaires (Figure 4B ; Plett & Martin, 2011 ; Felten *et al.*, 2012). Parmi celles décrites dans la littérature, de nombreuses molécules impliquées dans le remodelage de la paroi cellulaire ont été identifiées telles que les lectines, les protéines ou les glycoprotéines qui se lient spécifiquement à des résidus osidiques, des hydrophobines et des polypeptides acides appelées SRAPS (pour Symbiosis Related Acidic Polypeptides), dont l'expression est régulée au cours de la symbiose ECM (Figure 4B ; Martin & Nehls, 2009).

Lors des interactions pathogènes, il a été mis en évidence la présence de petites protéines sécrétées par le micro-organisme (Win *et al.*, 2012). Ces protéines, qui peuvent être « transloquées » à l'intérieur de la cellule hôte, interfèrent ensuite avec les mécanismes biologiques de la plante et sont ainsi appelées effecteurs. Lors du séquençage du génome de *L. bicolor* et des analyses de transcriptomique menées sur la symbiose peuplier-*L. bicolor* et sapin-*L. bicolor*, la présence de nombreux gènes codant des petites protéines sécrétées, appelées MISSP, pour Mycorrhiza Induced Small Secreted Proteins, a été identifiée (Martin *et al.*, 2008). La fonction de l'ensemble de ces protéines n'est pas clairement établie. Certaines auraient un rôle dans les mécanismes de reconnaissance entre les deux partenaires (C. Veneault-Fourrey, communications personnelles), d'autres interviendraient dans la formation de l'organe symbiotique, comme le suggère les études réalisées sur

LbMISSP7. En effet, *MISSP7* est fortement exprimé dans la mycorhize mature, la protéine est localisée dans le noyau des cellules de la racine en contact avec le réseau de Hartig (Plett *et al.*, 2011). De plus, les lignées d'interférence RNAi *MISSP7* de *L. bicolor* possédant une expression du gène *MISSP7* réduite, ne développent pas de réseau de Hartig (Figure 4B ; Plett *et al.*, 2011). De plus, *MISSP7* est induite dans les hyphes de *L. bicolor* en contact indirect avec la racine de peuplier, ainsi qu'en présence de flavonoïdes (rutine et quercitine ; Figure 4B ; Plett & Martin, 2012). Ces études suggèrent un rôle crucial de *MISSP7* comme effecteur fongique dans la formation de l'organe ECM. Lors de l'analyse du génome du deuxième champignon ECM séquencé, l'ascomycète, *Tuber melanosporum*, ce groupe de protéines effectrices, n'a pas été retrouvé (Martin *et al.*, 2010). Ce résultat révèle des différences, entre les différents couples d'interactions, dans les voies de signalisation lors de la mise en place de la mycorhize.

- Les réponses de la plante

Les analyses transcriptomiques menées sur le changement de l'expression globale des gènes de la plante hôte ont été menées afin de comprendre les différents signaux impliqués lors (1) de l'initiation et la reconnaissance entre les deux partenaires, (2) de la colonisation du champignon sur la racine et (3) dans la formation de l'organe symbiotique (Voiblet *et al.*, 2001 ; Johansson *et al.*, 2004 ; Duplessis *et al.*, 2005 ; Morel *et al.*, 2005 ; Le Quéré *et al.*, 2005 ; Wright *et al.*, 2005 ; Frettinger *et al.*, 2007 ; Heller *et al.*, 2008 ; Felten *et al.*, 2009 ; Sebastiana *et al.*, 2009 ; Flores-Monterroso *et al.*, 2013 ; Tarkka *et al.*, 2013). Duplessis et ses collaborateurs ont montré que la formation de la mycorhize entre *Eucalyptus globulus* et *Pisolithus tinctorius* s'accompagne de différents patrons d'expression de gènes. Dans les phases précoces de reconnaissance et d'adhésion du champignon, une modification des gènes codant des protéines liées au métabolisme de remodelage de la paroi cellulaire et de réponse au stress a été observée. Lors de la formation du manteau fongique, une modification de la voie des sucres et des voies hormonales de la plante est décrite. Lorsque la mycorhize est fonctionnelle, une modification des voies de biosynthèse des acides aminés et des acides gras s'opère (Figure 4B ; Duplessis *et al.*, 2005).

Certaines études montrent une augmentation transitoire de l'expression des gènes de défense de la plante dans les étapes précoces, suggérant une première réaction de défense comparable à celle observée dans les interactions plantes-pathogènes (Figure 4B ; Martin *et*

al., 2001 ; Duplessis *et al.*, 2005 ; Sebastiana *et al.*, 2009). D'autres études décrivent une diminution des gènes impliqués dans la défense de la plante suggérant ainsi un « laissez-passer » de la plante par une inhibition des voies de défense (Flores-Monterroso *et al.*, 2013 ; Tarkka *et al.*, 2013). Ces résultats décrivent donc une régulation complexe de la pénétration des hyphes fongique dans les cellules de l'épiderme et du cortex de la plante ([Figure 4B](#)).

En conclusion, contrairement à la voie de signalisation ligands/récepteurs et à la cascade de signalisation spécifique décrites dans les interactions nodulaires fixatrices d'azote et les endosymbioses à arbuscules (Oldroyd, 2013), aucune voie commune n'a été décrite dans l'établissement des ECMs. Du côté du partenaire fongique, les études actuelles ont montré que les molécules spécifiques à la symbiose ECM décrites (MISSP) semblent spécifiques à l'espèce de champignon et du couple d'interaction étudié. De plus, dans les échanges plante-champignon, le partenaire fongique semble détourner les voies de signalisation des jasmonates, des flavonoïdes, des cytokinines et de l'auxine de la plante. Ces molécules ne semblent pas être spécifiques au spectre hôte des ECMs et ne semblent pas être impliquées dans tous les couples d'interaction. Les phénotypes observés, ramification des hyphes du champignon et la stimulation de la formation des RLs ne sont pas spécifiques aux partenaires symbiotiques. Du côté de la plante hôte, les voies de réponse (défense, acteurs de modification des parois) sont identifiées mais les cascades de signalisation les régulant sont mal connues ([Figure 4B](#)).

La voie de signalisation de l'auxine est modifiée chez la plante hôte en réponse au champignon. L'auxine pourrait intervenir comme molécule signal dans les étapes précoces d'interaction et pourrait participer à la structuration de l'organe symbiotique. Ces études sont le fruit du questionnement sur les modifications du système racinaire observé, la stimulation de la formation des RLs et sur la présence de racines courtes des mycorhizes. Afin de comprendre le rôle joué par l'auxine dans ces interactions, une deuxième partie sur le rôle capitale de l'auxine dans l'architecture racinaire est maintenant argumentée.

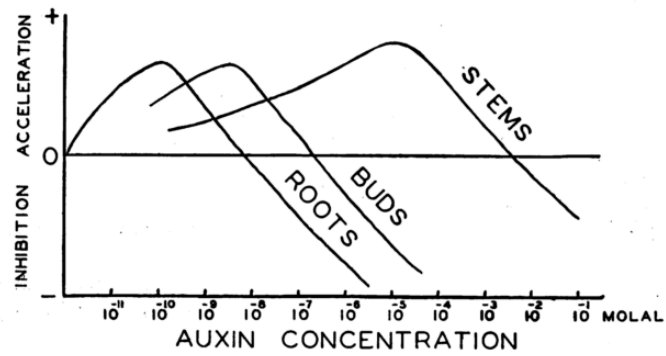


Figure 5 : Modèle de l'effet dose-réponse de l'auxine en fonction de l'organe étudié dans la plante

La croissance des organes de la plante (division et élongation) est fonction de la concentration de l'auxine.
 Roots, Racines ; Buds, Bourgeon ; Stems, Tige.

Thimann, 1938

2 Importance de l'auxine dans les modifications de l'architecture racinaire

2.1 Importance de la régulation des gradients auxiniques dans la plante

La phytohormone auxine a été identifiée dans de nombreuses espèces de la lignée verte (Johri, 2008). Elle est aussi étudiée en tant que métabolite secondaire dans les bactéries et les champignons et a été identifiée dans la lignée « animal », notamment dans certains nématodes (Gruen, 1959 ; De Meutter *et al.*, 2005 ; Johri, 2008 ; Spaepen & Vanderleyden, 2011). L'acide indole-3-acétique (AIA) est l'auxine endogène majoritaire dans les plantules d'*A. thaliana* (Novák *et al.*, 2012). Néanmoins, d'autres molécules possèdent des effets auxiniques sur le développement de la plante, tels que l'acide indole-3-butyrique (AIB), l'acide phenylacétique (APA) et l'acide 4-chloroindole-3-acétique (4Cl-AIA). Des molécules synthétiques, plus stables, présentent un effet auxinique, dont l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D) et l'acide α -naphtalène acétique (ANA). Bien que leur effet de type auxinique soit reconnu, des modifications dans leur perception et leur transport ont été observées (Simon & Petrášek, 2011 ; Simon *et al.*, 2013).

L'auxine joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans les processus d'élongation et de différenciation cellulaires (Perrot-Rechenmann, 2010). De ce fait, elle est impliquée dans de nombreux processus développementaux, embryonnaires et post embryonnaires dont la croissance racinaire, la formation de nouvelles RLs, le développement du méristème caulinaire et le développement des tissus vasculaires de la feuille (Vanneste & Friml, 2009). L'auxine a aussi l'originalité d'avoir un effet de dose-réponse sur la régulation de la croissance. On constate que les effets induits par l'apport de l'auxine exogène ou par la concentration endogène de l'hormone au sein des tissus sont fonction de la concentration et de l'organe concerné suggérant des différences de sensibilité des tissus vis à vis de l'auxine ([Figure 5](#) ; Thimann, 1938 ; Evans *et al.*, 1994). Une inhibition de la croissance de la tige et de la racine est observée après application d'AIA à 10 mM ou 10

Encadré 3 : Les outils d'observation de la localisation tissulaire de l'auxine

Afin d'étudier la distribution tissulaire de l'auxine *in planta* différents outils ont été développés :

- **L'immunolocalisation *in situ* de la molécule d'AIA**

(Voir Benkova *et al.*, 2003)

- **Le suivi d'AIA radioactif *in planta***

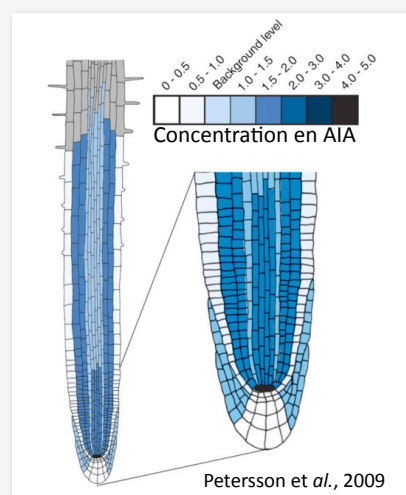
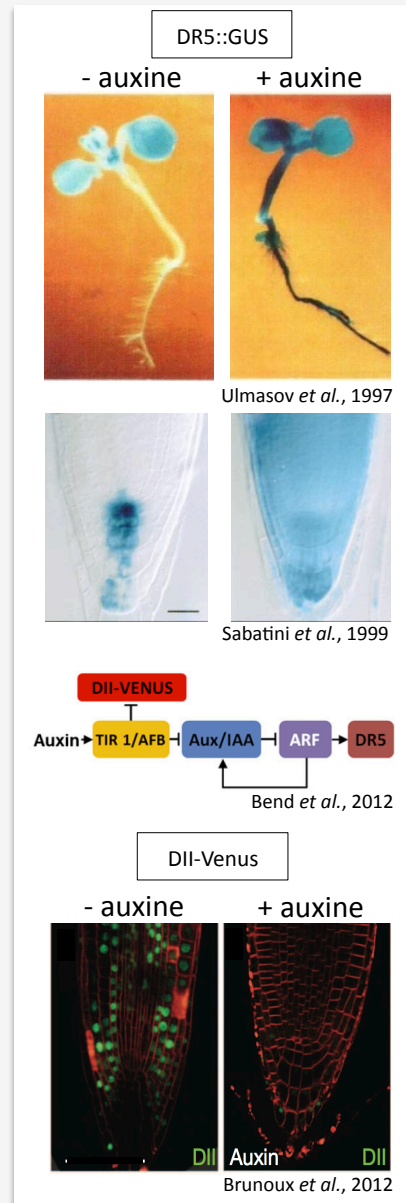
(Voir Tsurumi *et al.*, 1978)

- **L'utilisation de constructions « rapportrice » *in planta* de la signalisation auxinique**

Cette technique a beaucoup été utilisée pour examiner des modifications de gradient auxinique dans les processus développementaux ou en réponse à l'environnement. De nombreux promoteurs de gènes de la famille des AuxIAA et GH3 ont été utilisés. Avec la famille des SAUR, ces gènes ont été les premiers décrits pour leur sur-expression en présence d'AIA (Hagen et Guilfoyle 2002). Le plus utilisé est un promoteur chimérique appelé **DR5** (Direct Repeat 5), dérivé d'un promoteur d'un gène GH3 du Soja, il est constitué de plusieurs répétitions de la séquence consensus AuxRE (Auxin Response Element) TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1997). Ce promoteur est induit en présence d'auxine (image ci-contre; le promoteur DR5 est fusionné au gène rapporteur GUS, codant la β -glucuronidase), mais aussi à des auxines endogènes (PAA) et exogènes (2,4D, NAA). Ce promoteur peut donc être utilisé comme un indicateur indirect de la réponse à l'auxine endogène et exogène. L'activation du DR5 dépend de la capacité du tissu à répondre à la signalisation auxinique (schéma ci-contre) mais aussi aux acteurs de la transcription et de la traduction protéiques, ce qui lui confère une réponse de l'ordre de 1h30 à 2 heures. Récemment, pour parer à ces défauts, une nouvelle construction nommée **DII** utilisant comme séquence le domaine II d'un gène AuxIAA d'*A. thaliana* est disponible dans *A. thaliana*. Cette construction répond donc à l'auxine dans des temps très court de l'ordre des minutes (Brunoux *et al.*, 2012).

- **La quantification de l'IAA et ses métabolites associées dans les tissus de la plante**

En utilisant des techniques de spectrométrie de masse, il est possible de quantifier l'AIA dans les tissus végétaux. Une étude récente à montrer qu'avec une quantité faible de tissu (20mg), il est possible de quantifier simultanément 12 molécules de la voie métabolique de l'AIA (Novàk *et al.*, 2012). Cette technique a aussi permis de mettre en évidence, en utilisant des segments de l'ordre du millimètre, que l'AIA est localisé plus fortement concentré à l'apex de la racine (Ljung *et al.*, 2005). Récemment une étude réalisée par Petersson et ses collaborateurs (2009), a confirmé, en utilisant des lignées transgéniques d'*A. thaliana* possédant des constructions reportrices GFP des différentes lignées cellulaires de l'apex racinaire couplé à une technique de tri de cellules en cytométrie en flux, ainsi que la spectrométrie de masse en phase gazeuse, la localisation du gradient d'AIA à l'apex racinaire avec une concentration maximum dans les cellule du centre quiescent (Petersson *et al.* 2009).



nM, respectivement ([Figure 5](#); Thimann, 1938 ; Evans *et al.*, 1994). Bien que les concentrations en AIA dans les différents organes varient au cours de leur développement (Bhalerao *et al.*, 2002), il a été montré que la concentration endogène en AIA est de l'ordre de 300 pmol.g^{-1} (1,7 pM par mg de matière fraîche) dans la racine d'*A. thaliana* alors que celle des parties aériennes est estimée autour de 50 pmol.g^{-1} (0,3 pM par mg de matière fraîche ; Novák *et al.*, 2012). Ces données suggèrent donc une répartition hétérogène de cette hormone dans les différents organes.

Différents outils et méthodes ont été développés et ont mis en évidence l'existence dans les différents tissus, des zones restreintes, riches en auxine, appelées gradients ou maxima (voir [Encadré 3](#)). Au sein de la racine, l'activité du promoteur DR5, rapporteur de la signalisation en réponse à l'AIA, est très fortement localisée dans le centre quiescent, ainsi que dans les cellules de la région centrale la coiffe racinaire (Sabatini *et al.*, 1999). Des études de quantification de l'AIA dans l'apex racinaire ont confirmé une plus forte accumulation de celle-ci à l'apex de la racine (Ljung *et al.*, 2005 ; Petersson *et al.*, 2009). Nous pouvons aussi noter que le patron de répartition de l'auxine dans des lignées cellulaires de la racine est différent de celui observé avec le promoteur DR5 ([Encadré 3](#) ; Ljung *et al.*, 2005 ; Petersson *et al.*, 2009).

De nombreuses études montrent l'importance de l'existence de ces gradients auxiniques, maximum ou minimum dans le contrôle de la croissance et du développement des organes (Petersson *et al.*, 2009 ; Petrásek & Friml, 2009 ; Sorefan *et al.*, 2009). Il a été montré que les zones d'augmentation de la réponse à l'auxine, principalement dans les tissus en croissance et en différenciation (Tanaka *et al.*, 2006), sont corrélées avec la formation de nouveaux organes (Benková *et al.*, 2003 ; Heisler *et al.*, 2005).

En conclusion, la régulation fine de l'accumulation de l'auxine au niveau tissulaire est essentielle à la croissance et la formation de nouveaux organes. La plante a mis en place des mécanismes de perception de l'auxine et de réponse adaptées.

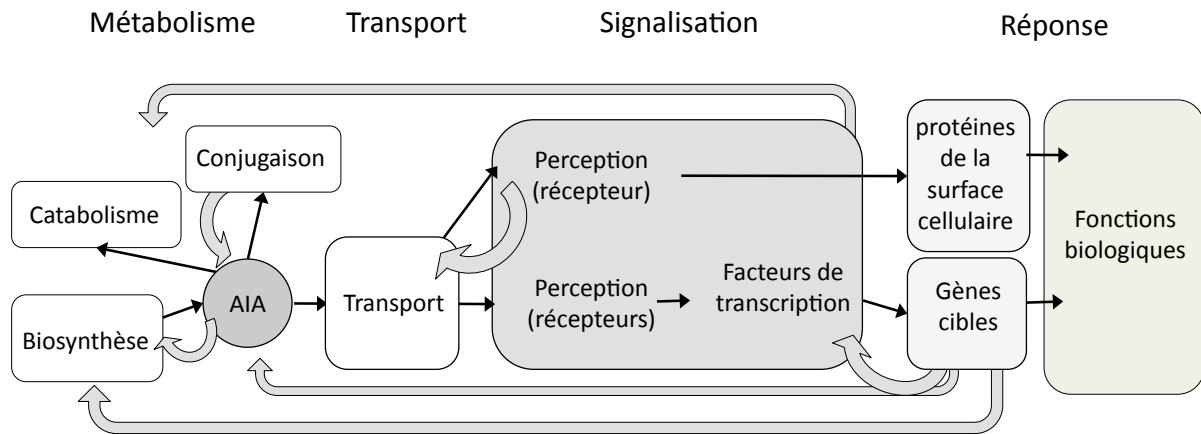


Figure 6 : Modèle schématique illustrant les voies impliquées dans l'homéostasie et la réponse à l'auxine

L'équilibre entre la biosynthèse, la conjugaison et le catabolisme de l'auxine contrôle la quantité d'auxine active au niveau cellulaire. Le transport de l'auxine régule aussi la quantité de l'hormone dans la cellule. La perception de l'auxine implique différents récepteurs qui régulent de nombreuses voies de réponse à l'auxine par l'activation de protéines de la surface cellulaire ou de gènes cibles. De nombreux mécanismes de « rétrocontrôle » de ces différentes voies sont décrites dans la littérature (flèches grises)

Pour revue et adaptée de Kieffer *et al.*, 2010

2.2 Les acteurs qui participent à la réponse à l'auxine

2.2.1 Perception et signalisation de l'AIA

La perception de l'auxine sous sa forme active est la première étape induisant une activation ou une répression des gènes cibles responsables des fonctions biologiques ([Figure 6](#)). A ce jour, trois types de molécules ont été identifiés comme capables de fixer l'auxine et de déclencher la signalisation auxinique (Hayashi, 2012a ; Sauer *et al.*, 2013).

(1) Perception et signalisation dans le même complexe : SCF^{TIR1/AFB}-AuxIAA-ARF

L'expression de gènes cibles de la réponse à l'auxine est dépendante de la régulation de l'expression des facteurs de transcription et des facteurs de régulation de la transcription des familles ARFs (pour Auxin Response Factors) et Aux/IAA. Les ARF sont reconnus comme des facteurs d'activation ou de répression de la transcription, qui ciblent des promoteurs contenant un ou plusieurs « Élément de réponse à l'AIA », identifiés par la séquence consensus TGTCNC (Ulmasov *et al.*, 1997a ; Ulmasov *et al.*, 1999). Les ARF possèdent un domaine N-terminal (domaine II), capable de se fixer à l'ADN et, un domaine C-terminal qui est la correspondance protéique des domaines III et IV des protéines Aux/IAA. Cette homologie permet ainsi la dimérisation avec les Aux/IAA ([Figure 7](#) ; Kim *et al.*, 1997 ; Ouellet *et al.*, 2001 ; Hardtke *et al.*, 2004 ; Tatematsu *et al.*, 2004 ; Fukaki *et al.*, 2005 ; Uehara *et al.*, 2008). Le domaine central de la protéine ARF pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité de répression ou d'activation des promoteurs de réponse à l'AIA ([Figure 7](#) ; Tiwari *et al.*, 2003). Des études ont montré que la répression de l'activité des ARF par les Aux/IAA est dépendante d'un autre facteur de la régulation de la transcription de la famille des TPL/TPR (pour TOPLESS/TOPLESS-Related) qui se fixe au domaine I des Aux/IAA ([Figure 7](#) ; Long *et al.*, 2006).

Les complexes SCF sont des complexes protéiques qui permettent l'ubiquitination et l'envoi de protéines cibles au protéasome et donc leur dégradation (Cardozo & Pagano, 2004). Le complexe SCF^{TIR1/AFB} est constitué de quatre sous unités, ASK (pour Arabidopsis SKP1-Like), RBX1 (pour Ring Box 1), CUL (pour Culline) et une F-Box protéine. La famille des F-box joue un rôle dans la fixation du substrat à ubiquitiner (Gray *et al.*, 1999) et *A. thaliana*

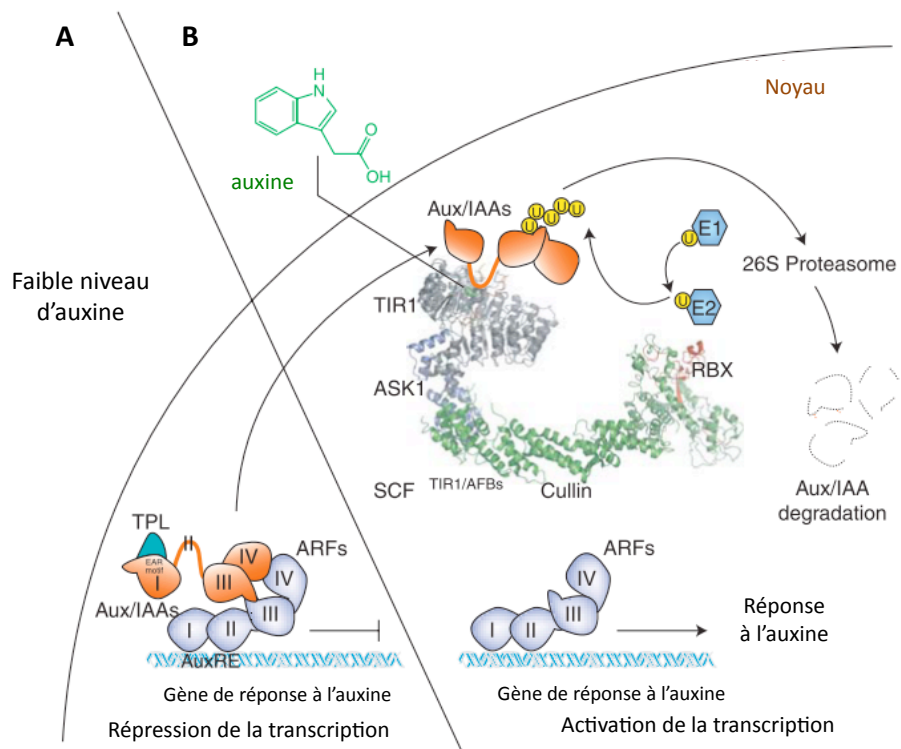


Figure 7 : SCF^{TIR1/AFB}-AuxIAA-ARF, perception et signalisation de l'auxine

Les domaines I et II des ARFs se fixe à l'ADN au niveau du domaine AuxRE des gènes de réponse à l'auxine. A ; En absence d'auxine, les AuxIAAs, se fixent aux ARFs au niveau des domaines III et IV. Cette interaction est favorisée par la fixation de protéines de la famille TPL/TLP sur le domaine I des AuxIAAs. Cette disposition inhibe la transcription des gènes de réponse à l'auxine. B ; En cas d'accumulation d'auxine dans la cellule, celle-ci est perçue dans le noyau par le complexe SCF^{TIR1/AFB}, la présence de l'auxine sur ce complexe va induire une fixation du domaine II des AuxIAAs sur TIR1. Les AuxIAAs vont être ubiquitinées et dégradées *via* le protéasome. Les ARFs libérées de leur répresseur peuvent donc induire (ou réprimer) la transcription des gènes de réponse à l'auxine.

(Figure extraite de Calderon-Villalobas *et al.*, 2009)

comporte plus de 700 membres dont six sont impliqués dans la signalisation auxinique, nommés TIR1 et AFB1 à 5 (pour Transport Inhibitor Resistant 1/Auxin Signalling F-Box ; Dharmasiri *et al.*, 2005a ; Kepinski and Leyser, 2005 ; Dharmasiri *et al.*, 2005b). TIR1 interagit directement avec le domaine II des Aux/IAA et que cette interaction est dépendante de la fixation de l'AIA sur TIR1 ([Figure 7](#) ; Dharmasiri *et al.*, 2005a ; Kepinski and Leyser, 2005 ; Tan *et al.*, 2007). L'interaction TIR1-Aux/IAA induit donc une « ubiquitination » puis une dégradation des l'Aux/IAA *via* le protéasome ([Figure 7](#) ; Maraschin *et al.*, 2009). Ainsi, en présence d'AIA, les ARF ainsi libérées de leur répresseur, activent ou répriment la transcription des gènes de réponse à l'AIA ([Figure 7](#) ; Okushima *et al.*, 2005). Ainsi, TIR1 et les AFB sont donc des acteurs clés dans la perception et la signalisation de l'auxine.

En conclusion, 6 membres de la famille TIR1/AFB, 5 membres de la famille TPL/TRP, 29 Aux/AIA et 23 ARF ont été identifiés chez *A. thaliana*, illustrant un grand nombre de combinaisons possibles ; ce qui pourrait expliquer la diversité des réponses à l'auxine (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010 ; Vernoux *et al.*, 2011). Chez le peuplier 35 membres de la famille des Aux/AIA et 39 membres de la famille des ARF ont été identifiés (Kalluri *et al.*, 2007).

Récemment SKP2A (pour S-Phase Kinase-Associated Protein 2A), une protéine F-box a été décrite comme capable de fixer l'AIA (Jurado *et al.*, 2010). SKP2A est une protéine qui régule des facteurs de division cellulaire (del Pozo *et al.*, 2006 ; Jurado *et al.*, 2008). Il a été démontré que la fixation de l'AIA à SKP2A est nécessaire à la régulation de ces facteurs, ce qui pourrait expliquer une partie de la réponse à l'AIA dans la régulation de la division cellulaire (Jurado *et al.*, 2010).

(2) Une signalisation rapide via ABP1

La signalisation dépendante de la voie SCF^{TIR1/AFB}-Aux/IAA-ARF ne peut pas expliquer l'ensemble des réponses vis-à-vis de l'auxine, par exemple, les réponses rapides (de l'ordre de la minute) telles que l'élongation cellulaire, les flux d'ions à travers la membrane plasmique ainsi que la régulation de la localisation des transporteurs d'auxine (Sauer & Kleine-Vehn, 2011 ; voir [Partie 2.4](#)).

ABP1 (pour Auxin Binding Protein 1) a été la première protéine décrite pour sa forte affinité vis à vis de l'AIA (Jones & Venis, 1989). Nous disposons de peu de données concernant le rôle de ABP1 dans le développement de la plante du fait que ABP1 est le seul

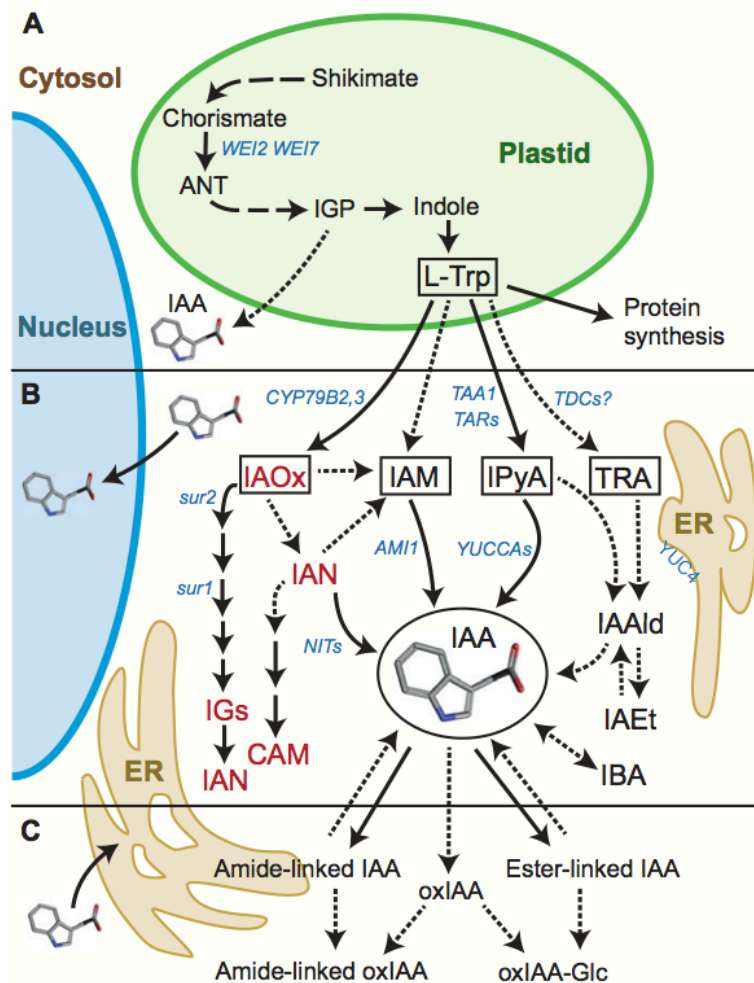


Figure 8 : Métabolisme de l'AIA

A ; Production du L-Tryptophane (L-Trp) dans les plastes à partir de la voie du shikimate, le chorismate produit de l'Anthrilate (ANT), précurseur de indole glyco protéine (IGP). L'IGP est aussi le précurseur de la voie de production de l'AIA indépendante du L-Trp. B ; La production de l'AIA à partir du L-Trp est réalisée dans le cytosol à travers 4 voies différentes nommées par le nom de l'intermédiaire utilisé : la voie de l'indole-3-acetaldoxime (IAOX), de l'indole-3-acétamine (IAM), de l'acide indole-3-pyruvique (IPyA), de la Tryptamine (TRA). Les enzymes connues dans ces voies sont indiquées en bleu. Les acteurs indiqués en rouge jouent un rôle dans la voie des camalexine (CAM) et des indoles glucosinolates (IGs), connues comme voies de défense de la plante. L'IAOx, l'IAN et leurs enzymes associées sont spécifiques de la biosynthèse de l'AIA chez les *Brassicaceae* et ne sont pas retrouvés chez d'autres espèces de plantes. La transformation de l'AIA en acide indole-3-butyrique (IBA), et inversement dans la régulation de l'homéostasie de l'AIA. C ; Les voies de dégradation et de conjugaison de l'AIA sont aussi localisées dans le cytoplasme, l'AIA est dégradé en acide 2-oxoindole-3-acétique (oxIAA), l'AIA est associé à des acides aminés, des esters, ou des protéines pour y être stocké ou dégradé.

Les flèches pleines indiquent les voies où les enzymes intermédiaires sont connues, les flèches en pointillées indiquent les voies ou les acteurs sont inconnus.

IAA : AIA; Glc : glucose; IAAld : indole-3-acétaldéhyde; IAET : indole-3-éthanol, IAN : indole-3-acétonitrielle; IGP : phosphate indole-3-glycérique; NITs : nitrilases; TDCs : tryptophane décarboxylases ; ER: Réticulum endoplasmique, Nucleus: noyau, Plastid : Plaste.

(Figure extraite de Ljung *et al.*, 2013)

membre de sa famille chez *A. thaliana* et qu'il est essentiel au développement embryonnaire (Chen *et al.*, 2001). Sa localisation n'est pas non plus clairement établie, ABP1 possède un domaine de rétention au réticulum endoplasmique et y a été localisée. Plus faiblement, ABP1 a aussi été observée dans la membrane plasmique ainsi que dans la paroi cellulaire (Jones & Venis, 1989). Des études suggèrent un rôle de ABP1 à la membrane plasmique (Sauer & Kleine-Vehn, 2011), régulant les canaux potassiques et l'accumulation des transporteurs d'AIA à la membrane plasmique (Robert *et al.*, 2010).

2.2.2 L'homéostasie de l'AIA

La régulation de l'homéostasie de l'AIA implique des voies complexes : (1) la production *de novo* de l'AIA via les différentes voies de biosynthèse, (2) la conjugaison de l'AIA avec des acides aminés, des sucres, ou des protéines, (3) la dégradation de l'AIA et aussi (4) le transport polarisé de l'hormone dans les tissus de la plante (Figure 6).

(1) Les voies de la biosynthèse de l'AIA

L'AIA est produit par une voie dépendante du tryptophane (Trp) et une voie indépendante de tryptophane. Dans la plante, la voie dépendante du tryptophane est la voie majoritairement utilisée. Néanmoins, la voie indépendante n'est pas négligeable et l'importance de chacune de ces voies peut varier en fonction de l'espèce et de l'environnement étudiés (Rapparini *et al.*, 2002 ; Ljung, 2013). Une régulation de la voie indépendante du Trp par la voie dépendante a été mise en évidence (Ouyang *et al.*, 2000).

La synthèse du tryptophane, à partir de la voie du shikimate, est localisée dans les plastes (Figure 8 ; Rapparini *et al.*, 1999). La voie du shikimate permet la production de la synthèse de la tyrosine et de la phénylalanine qui rentre dans de nombreuses voies de métabolites secondaires (Maeda & Dudareva, 2012). Les intermédiaires de la voie de biosynthèse du tryptophane sont le chorismate, l'antranilate, le phosphate indole-3-glycerole (IGP) et l'indole (Figure 8). Deux cribles génétiques ayant comme critère l'insensibilité à l'éthylène et aux jasmonates ont permis d'identifier l'enzyme impliquée dans le catabolisme du chorismate en l'antranilate (Stepanova *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2009). Celle-ci possède deux sous-unités nommées ASA1 (pour Antranilate Synthase α1) et ASB1 (pour Antranilate Synthase β1 ; Stepanova *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2009).

Dans la voie indépendante du Trp, l'IGP est aussi l'intermédiaire ([Figure 8](#) ; Ouyang *et al.*, 2000). Peu d'enzymes ont été caractérisées dans cette voie.

La production de l'AIA à partir du tryptophane est réalisée dans le cytosol à travers 4 voies différentes, nommées par le nom de l'intermédiaire utilisé : la voie de l'indole-3-acetaldoxime (IAOX), de l'indole-3-acetamine (IAM), de l'acide indole-3-pyruvique (IPyA) et de la tryptamine (TRA ; [Figure 8](#) ; Ljung, 2013).

- **La voie de l'IPyA** a été décrite comme étant la voie la plus utilisée dans la biosynthèse de l'AIA (Zhao *et al.*, 2002 ; Novák *et al.*, 2012). Deux familles d'enzymes ont été identifiées : la famille nommée TAA1/TAR (pour Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis 1 / TAA1 Related) qui contient 3 membres TAA1, TAR1 et TAR2, responsables de la production d'IPyA à partir du Trp. La famille nommée YUCCA, catalyse la réaction de l'AIA à partir de l'IPyA (Tao *et al.*, 2008 ; Mashiguchi *et al.*, 2011 ; Stepanova *et al.*, 2011 ; Won *et al.*, 2011).
- **La voie de l'IAM** est la voie la plus utilisée et décrite chez les bactéries. Cette voie utilise une enzyme codant un orthologue au gène *iaaM/iaaH* connu chez les bactéries, IAM1. Cette hydrolase catalyse la réaction entre l'IAM et l'AIA (Pollmann *et al.*, 2006 ; Spaepen *et al.*, 2007). L'enzyme qui catalyse Trp en IAM n'est pas connue à ce jour.
- **La voie du TRA** semble la moins utilisée car ce métabolite est très peu abondant chez *A. thaliana* (Novák *et al.*, 2012). Nous disposons de peu de données dans les autres espèces végétales. Cette voie utiliserait comme intermédiaire l'indole-3-acétaldéhyde (IAAld) mais aucun acteur n'a été identifié dans cette voie (Ljung, 2013).
- **La voie de l'IAOx** est décrite comme spécifique de la famille des *Brassicaceae*, à laquelle appartient *A. thaliana*. Les métabolites associés à cette voie, IAOx et IAN ainsi que les gènes codant les enzymes qui catabolisent la réaction du tryptophane en IAOx, *CYP79B2* et *CYP79B3*, sont identifiés seulement chez *A. thaliana* et les espèces de la même famille tels que *Brassica napus* et non chez le maïs, le tabac et le riz (Sugawara *et al.*, 2009). L'IAOx a aussi été décrit comme précurseur des camalexines (CAM) et des indoles glucosinolates (IGs), acteurs des voies de défense de la plante (Ahuja *et al.*, 2012).

Il reste encore beaucoup d'acteurs inconnus dans la voie de biosynthèse de l'AIA ([Figure 8](#)) ainsi que des questionnements concernant la régulation des voies utilisées dans la synthèse d'autres métabolites secondaires. De plus, les voies IAM, IPyA et TRA semblent communes à toutes les plantes à fleurs mais elles ont été décrites chez peu d'espèces et non connues

dans le peuplier. Leurs spécificités dans le développement de la plante et en réponse à l'environnement sont encore méconnues.

La localisation des acteurs de la voie de biosynthèse au niveau tissulaire a été supposée comme un facteur important dans l'accumulation de l'AIA (Ljung *et al.*, 2005 ; Petersson *et al.*, 2009). L'activité des promoteurs *pTAA1*, *pCYP79B2*, *pCYP79B3* dans la racine est principalement localisée dans les cellules du centre quiescent et les cellules adjacentes (Ljung *et al.*, 2005 ; Stepanova *et al.*, 2008). De plus, les expressions de *ASA1* et *ASB1* sont localisées dans l'apex racinaire (Ikeda *et al.*, 2009). De même que chez le riz, l'expression de *OsYUCCA1* est localisée dans l'apex racinaire chevauchant la zone d'expression du promoteur DR5 (Yamamoto *et al.*, 2007). L'expression de ces gènes peut être corrélée avec la production *de novo* d'AIA à l'apex racinaire (Ljung *et al.*, 2005). La biosynthèse localisée dans la racine a été décrite comme participant à l'élongation racinaire, la position des poils absorbants et l'initiation des RLs (Casimiro *et al.*, 2001 ; Swarup *et al.*, 2007 ; Ikeda *et al.*, 2009).

Il est donc maintenant clairement décrit que l'AIA n'est pas seulement produit par les parties aériennes de la plante (organe puits) puis transportée dans la racine (organe source), mais il est aussi produit par la racine dont fortement à l'apex.

(2) La conjugaison et la dégradation de l'AIA

Les conjugaisons de l'AIA conduisent à une diminution du niveau de l'AIA et régulent ainsi son homéostasie. Les conjugués formés sont utilisés par la plante, en tant que molécules de stockage. Par exemple, dans la graine, de nombreux conjugués de l'AIA sont présents. Ils seront hydrolysés dans les premières phases de l'embryogénèse, libérant ainsi l'AIA actif, essentiel au développement embryonnaire (Bajguz & Piotrowska, 2009). De manière intéressante, il a été montré que l'AIA, conjugué au tryptophane (AIA-TRP), est un inhibiteur de l'action de l'AIA (Staswick, 2009).

Des conjugués d'AIA ont été identifiés dans toutes les plantes étudiées, du pin au soja ainsi que dans *Physcomitrella patens* (Staswick *et al.*, 2005 ; Paponov *et al.*, 2009). Trois groupes de conjugués d'AIA ont été identifiés, (1) les conjugués esters, issus de la conjugaison avec des sucres, (2) les conjugués amidés issus de la conjugaison avec des acides aminés ou (3) avec des peptides ou des protéines (Ludwig-Muller, 2011 ; Korasick *et al.*, 2013). Les composés AIA amidés représentent en moyenne 90% de l'AIA totale de la plante

alors que seulement 1 à 10% de composés AIA esters sont quantifiés (Ludwig-Muller, 2011 ; Korasick *et al.*, 2013). Mais cette proportion peut varier selon la plante et le tissu étudié (Bajguz & Piotrowska, 2009).

La conjugaison de l'AIA avec des sucres forme une liaison ester qui est catalysée par des UDP glucose transférases dont UGT84B1 et conduit à la formation de l'IAA-Glucose et l'IAA-*myo*-inositol (Jackson *et al.*, 2001).

La conjugaison de l'AIA avec des acides aminés se réalise *via* des enzymes de la famille des acyl amino- synthetase GH3 (pour Gretchen Hagen 3), prédites localisées dans le cytosol de la cellule (Ludwig-Muller, 2011). La famille des GH3 chez *A. thaliana* comporte 19 membres dont 7 sont capables de catalyser la réaction avec l'AIA *in vitro*. Phylogénétiquement, ces membres font tous partie des GH3 du clade II (Staswick *et al.*, 2005). D'autres membres de la famille du clade I, ont été décrits pour conjuguer le jasmonate avec des acides aminés (Staswick *et al.*, 2005). D'autres molécules comme l'IBA, le 4Cl-IAA et l'IPyA peuvent aussi se conjuguer avec des acides aminés *in vitro* (Staswick *et al.*, 2005).

Certaines de ces réactions de conjugaison dont celles produisant l'AIA-Ala (Alanine), l'AIA-Leu (Leucine) et l'AIA-Phe (Phénylalanine) sont réversibles et peuvent libérer l'AIA (Kai *et al.*, 2007). Les enzymes impliquées sont des amino hydrolases acides telles que IAR3/ILR1 (Davies *et al.*, 1999). D'autres composés ne sont pas hydrolisables en AIA dont IAA-Asp (Aspartate) et IAA-Glu (Glutamate) et sont donc décrits comme des intermédiaires de la dégradation de l'AIA.

Les mécanismes de dégradation de l'AIA sont assez mal connus. Néanmoins, l'acide 2-oxoindole-3-acétique (oxIAA) semble être le composé de dégradation de l'AIA le plus important, il s'accumule très rapidement après un apport d'AIA exogène (Ostin *et al.*, 1998 ; Novák *et al.*, 2012 ; Ljung, 2013). Par ailleurs, les composés AIA conjugués avec des acides aminés peuvent aussi subir une oxydation conduisant à une inactivité de l'AIA (Kai *et al.*, 2007). Aucun mécanisme de réversibilité n'a pu être observé dans ces réactions, ce qui soutient le fait que ces composés soient des composés de dégradation de l'AIA (Ostin *et al.*, 1998).

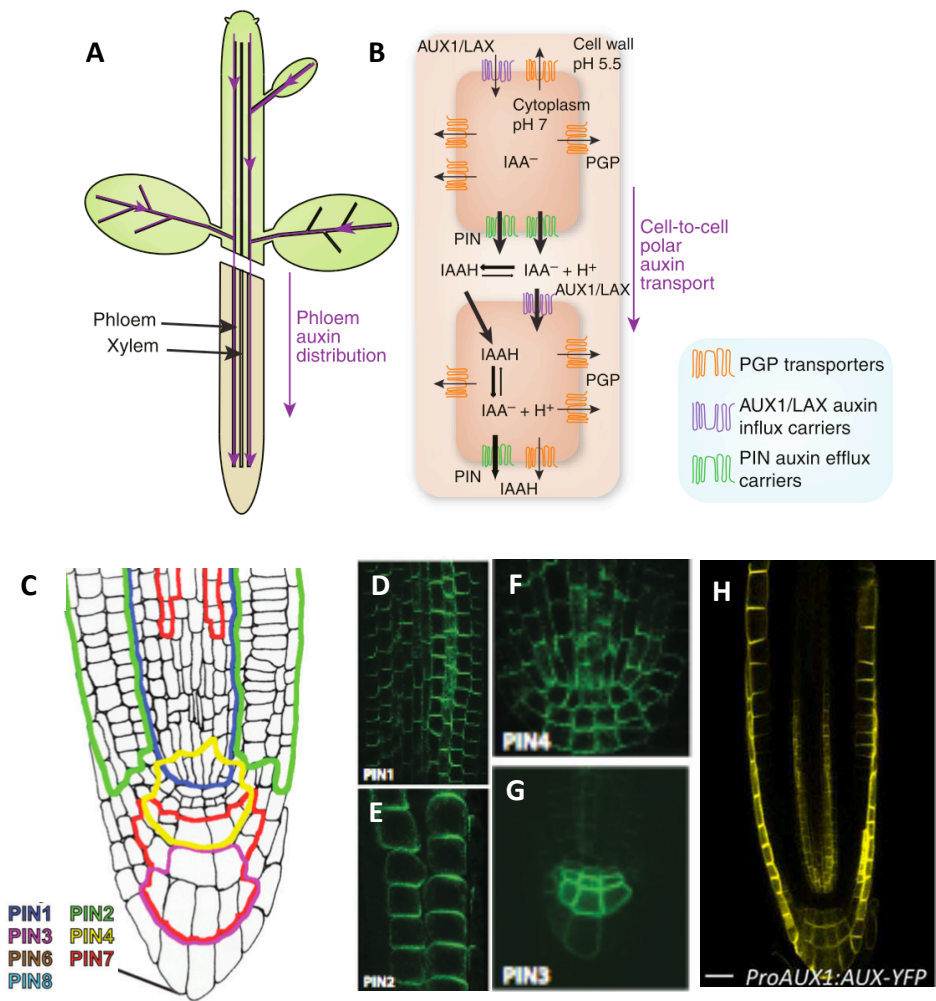


Figure 9 : Le transport de l'auxine au niveau de la plante entière, au niveau cellulaire et polarisé à l'apex racinaire

Le transport de l'auxine est composé du (A) transport de longue distance dans le phloème, des parties aériennes à l'apex de la racine et (B) transport de cellule à cellule par une voie passive d'import de l'AIA protonée de l'extérieur de l'apoplaste vers l'intérieur de la cellule et via des transporteurs d'influx de l'AIA de la famille des AUX/LAX. L'AIA sort de la cellule, où elle est piégée par sa forme non protonée, via des transporteurs d'efflux de type PIN ou certains membres de la famille des transporteurs ABCB/PGP localisés à l'autre face de la cellule, ce qui va conférer à ce transport de cellule à cellule un caractère polarisé dans la lignés cellulaires (D'après Robert et Friml 2009). C ; Représentation schématique de la localisation des transporteurs d'efflux, les PIN, dans l'apex racinaire d'*A. thaliana*. D à G ; Localisation membranaire de (D) PIN1, localisée dans le cylindre central dans la face basale de la cellule, (E) PIN2, localisée dans la coiffe latérale et dans l'épiderme dans la face apicale et basal des cellules, (F et G) PIN4 et PIN3, localisées proche du centre quiescent et dans la coiffe racinaire. (Images extraite de Blilou *et al.*, 2005). H ; Localisation du transporteur AUX1 dans l'apex racinaire d'*A. thaliana*. (Image extraite de Swarup & Péret, 2012).

Les voies complexes impliquées dans le métabolisme peuvent réguler en partie l'accumulation de l'auxine dans la cellule. Néanmoins, la formation des zones de maxima auxinique, comme observé à l'apex racinaire ([Encadré 3](#)), est majoritairement régulée par le transport polarisé de l'auxine.

2.2.3 Le transport polarisé de l'auxine

Le transport de l'auxine dans la plante combine un transport rapide (5-20 cm.h⁻¹) de longue distance à travers le phloème, des parties aériennes vers les racines ([Figure 9A](#) ; Cambridge & Morris, 1996) et un transport de cellule à cellule, plus lent (5-20 mm.h⁻¹ ; Cambridge & Morris, 1996). Ce transport de cellule à cellule est principalement directionnel et donc appelé « transport polarisé de l'auxine » ([Figure 9B](#) ; Petrásek & Friml, 2009). Celui-ci confère à l'auxine une spécificité parmi les autres phytohormones, où seul un transport à longue distance est connu à ce jour (Hirose *et al.*, 2008 ; Jiang & Hartung, 2008). Ces transporteurs sont localisés sur une face spécifique de la membrane plasmique, ce qui permet de diriger le transport dans les tissus de la plante et donc de réguler finement le maxima auxinique (Petrásek & Friml, 2009).

De part son caractère acide (pKa = 4,8), l'AIA est partiellement sous forme protonée (AIAH) dans l'apoplaste (pH 5,5) et peut ainsi diffuser à travers la membrane plasmique. En revanche, à l'intérieur de la cellule (pH 7), elle reste piégée sous sa forme anionique AIA⁻. La sortie de l'AIA nécessite l'intervention de transporteurs d'efflux de l'AIA hors de la cellule ([Figure 9B](#)).

Des cribles génétiques, utilisant une forte concentration d'auxine exogène ou l'observation de phénotypes développementaux, ont permis d'identifier des mutants d'*A. thaliana* pour des gènes codant des transporteurs d'auxine (Maher & Martindale, 1980 ; Bennett *et al.*, 1996). Plusieurs familles protéiques ont donc été identifiées comme transporteurs d'efflux de l'AIA. Parmi elles, les transporteurs PIN et certains membres de la famille des transporteurs ABCB (Zazimalová *et al.*, 2010).

Les protéines PIN (pour PIN-formed) ont été décrites comme des transporteurs d'efflux de l'auxine en système hétérologue et selon leurs localisations tissulaires et membranaires, un rôle dans le transport acropète et basipète de l'auxine (Petrásek & Friml, 2009). La famille

des PIN est composée de 8 membres chez *A. thaliana*. Les membres de la sous-famille PIN1-like comprenant PIN1 à PIN4 et PIN7 sont présents à la membrane plasmique (Křeček *et al.*, 2009). Leurs localisations asymétriques polarisées dans les différentes assises cellulaires de la racine ont permis de mettre en évidence le flux de l'auxine à l'apex de la racine. Ainsi de par sa localisation cellulaire sur la face basale de la cellule du cylindre central, PIN1 assure le transport acropète de l'auxine des parties aériennes à l'apex racinaire ([Figures 9C et 9D](#) ; Gälweiler *et al.*, 1998). PIN4 est observée dans le centre quiescent et les cellules adjacentes et crée un « puits » d'auxine; ([Figures 9C et 9F](#) ; Friml *et al.*, 2002), PIN3 localisée dans la coiffe racinaire, redistribue l'auxine dans cette zone avec PIN7 ([Figures 9C et 9G](#) ; Blilou *et al.*, 2005), PIN2 est localisée dans les cellules de la coiffe latérale et de l'épiderme de la racine, sur la face apicale de la cellule et assure donc le transport basipète de l'auxine. Au niveau de la zone méristématique dans les cellules corticales, il a été montré que PIN2 est aussi localisée sur la face basale des cellules corticales, ce qui crée une redistribution de l'auxine dans cette zone ([Figures 9C et 9E](#) ; Müller *et al.*, 1998). La modélisation du système de transport de l'auxine, par la localisation cellulaire et asymétrique à la membrane des protéines PIN à l'apex racinaire, suffit à expliquer l'existence du gradient de l'AIA et son *maxima* au niveau du centre quiescent (Grieneisen *et al.*, 2007). Les plantes mutées pour ces gènes sont affectées dans leur développement. *pin1* possède une inflorescence en tête d'épingle (« pin »), *pin2/eir1* a été décrite pour son phénotype agravitropique. Il a été montré une redondance de la localisation protéique des PIN dans la racine, ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype de certains mutants dont le mutant *pin4* (Chen *et al.*, 1998 ; Gälweiler *et al.*, 1998 ; Luschnig *et al.*, 1998 ; Friml *et al.*, 2002 ; Blilou *et al.*, 2005).

L'activité des transporteurs PINs est permise à travers la régulation complexe de l'expression des gènes *PIN*, leurs modifications post-transcriptionnelles, leurs localisations polarisées à la membrane plasmique, ainsi que leurs interactions avec d'autres protéines à la membrane plasmique (Petrásek & Friml, 2009). Il a été montré que la régulation de la localisation des PIN1 et PIN2 au sein de la membrane plasmique est réalisée à travers les mécanismes d'endocytose, contrôlés par des protéines clathrines et des stéroles associés à la membrane plasmique (Willemsen *et al.*, 2003 ; Dhonukshe *et al.*, 2007 ; Men *et al.*, 2008 ; Dhonukshe *et al.*, 2010). Parallèlement l'état de phosphorylation des PIN *via* les protéines PINOID contrôle l'adressage et l'activité des PIN à une face spécifique de la cellule (Michniewicz *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2010a). De plus, l'ubiquitination de PIN2 joue un

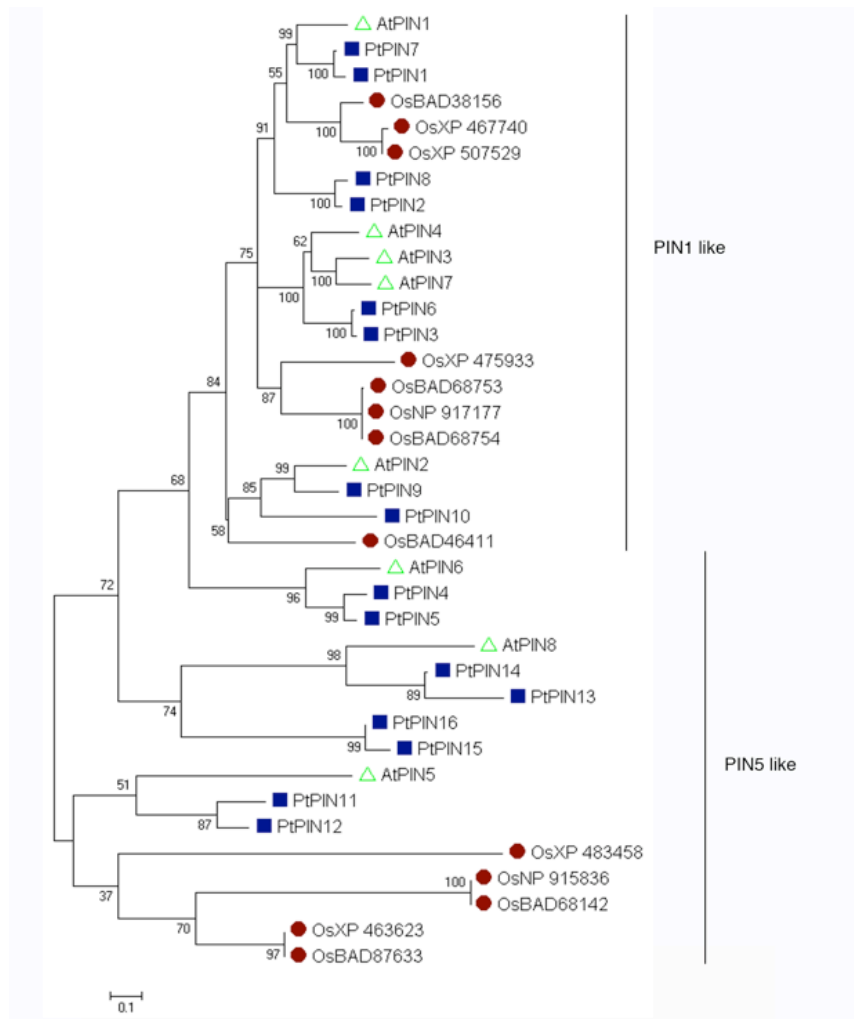


Figure 10 : Arbre phylogénétique représentant la classification des protéines PIN d'*A. thaliana*, du peuplier (*Populus trichocarpa*) et du riz (*Oryza sativa*)

Classification en deux sous groupe « PIN1-like » et « PIN5-like » des protéines de la famille des PIN chez *A. thaliana*, *Populus trichocarpa* et *Oryza sativa*.

(Image extraite de Felten *et al.*, 2009)

rôle dans la localisation à la membrane plasmique (Abas *et al.*, 2006). L'interaction de PIN1 avec ABCB19 a aussi montré une augmentation de la stabilité des protéines PIN1 à la membrane plasmique (Titapiwatanakun *et al.*, 2009). En système hétérologue, l'activité de transport d'efflux de PIN1 est augmentée par la présence de ABCB19 et ABCB1 et différentes approches ont montré l'interaction entre ces deux protéines (Petrášek *et al.*, 2006 ; Blakeslee *et al.*, 2007).

Les gènes codant les protéines PINs ont été retrouvés chez toutes les espèces de plantes à fleurs dont le génome a été décrypté (Paponov *et al.*, 2005) et leur localisation polarisée dans la racine a été décrite pour certaines d'entre elles (Carraro *et al.*, 2006). Chez le peuplier, 16 membres de la famille PIN ont été décrits, dont huit dans le clade des PIN1-like ([Figure 10](#) ; Carraro *et al.*, 2012). Néanmoins leur localisation cellulaire et tissulaire n'est pas connue.

Certains membres de la famille des ABCB/PGP chez *A. thaliana* (pour : ATP Binding Cassette/P-glycoprotein ; Kang *et al.*, 2011), classés parmi les MDR (pour : Multi Drug Resistance), sont capables de transporter l'AIA. ABCB1, ABCB4, ABCB19 ont été identifiées comme des transporteurs d'efflux de l'AIA ([Figure 9B](#) ; Geisler *et al.*, 2005). Dans certaines conditions, ABCB4 a été aussi décrite comme transporteur d'influx (Terasaka *et al.*, 2005 ; Kubeš *et al.*, 2012). Comme les PINs, ces transporteurs ont des zones spécifiques de localisation dans l'apex racinaire. ABCB1 est localisée dans les tissus centraux de la racine et ABCB19 est localisée dans l'épiderme. ABCB4 participe au transport basipète de l'auxine (Terasaka *et al.*, 2005). ABCB19 est localisée uniformément sur la périphérie de la cellule (Wu *et al.*, 2007). De manière intéressante, il a été montré que ABCB1 et ABCB19 interagissent avec les PIN, et suivant l'interaction, jouerait un rôle dans la stabilisation des PINs à la membrane plasmique (Noh *et al.*, 2003 ; Blakeslee *et al.*, 2007 ; Rojas-Pierce *et al.*, 2007 ; Titapiwatanakun *et al.*, 2009).

Malgré l'entrée de l'AIA dans la cellule puisse se faire par diffusion passive, une famille de transporteurs d'influx d'AIA a été identifiée ([Figure 9B](#)). La petite famille des AUX/LAX (pour Auxin Permease/Like AUX1) contient quatre membres : AUX1 et 3 protéines nommées LAX 1 à 3 (Parry *et al.*, 2001). L'expression de ces protéines est répartie dans les différents tissus de la plante et varie au cours du développement (Swarup & Péret, 2012). Les fonctions

des transporteurs d'influx d'AIA, associés aux membres de cette famille, sont étayées par les phénotypes des mutants, la localisation de la protéine polarisée à la membrane plasmique, ainsi que des études de transport de l'AIA en système hétérologue (Bennett *et al.*, 1996 ; Yamamoto and Yamamoto, 1998 ; Swarup *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2006). Dans la racine d'*A. thaliana*, AUX1 est localisée dans les cellules du cylindre central, dans la coiffe, dans les cellules de la coiffe latérale ainsi que dans l'épiderme de l'apex racinaire. La protéine est localisée sur la partie apicale des cellules du protophloème et dans la partie basale dans les cellules de la coiffe latérale (Figure 9H ; Swarup *et al.*, 2001). Ainsi AUX1 participe au transport acropète et basipète de l'AIA.

Dans certaines conditions, il a aussi été montré que NRT1.1 (pour Nitrate Transportor 1), historiquement décrit comme un transporteur de nitrate (Tsay *et al.*, 1993), est aussi capable de transporter l'AIA à l'intérieur de la cellule (Krouk *et al.*, 2010). Cette activité du transporteur participerait à l'émergence des *primordia* racinaires en présence de nitrate (Krouk *et al.*, 2010).

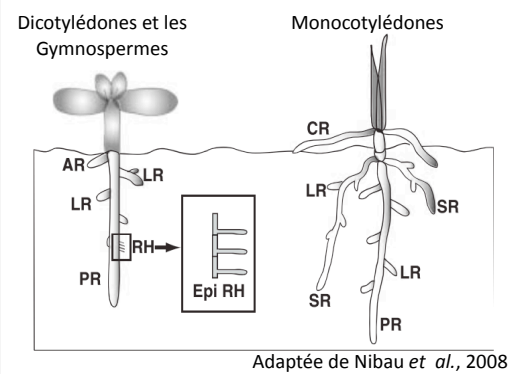
2.2.4 Régulation de l'homéostasie de l'auxine par sa compartimentation intracellulaire

Parmi les protéines de la famille des PIN, certaines jouent un rôle dans l'homéostasie intracellulaire de l'auxine et régulent la quantité d'auxine disponible à sa perception par la voie de signalisation localisée dans le noyau (TIR/AFB). Alors que les protéines PIN1 à 4 et 7, localisées à la membrane plasmique possèdent une longue boucle hydrophobe centrale dans leurs séquences protéiques prédites, PIN6 possède une plus petite boucle et PIN5 et PIN8 n'en possèdent pas. Ces trois derniers membres sont décrits pour appartenir à la sous famille PIN5-like (Mravec *et al.*, 2009 ; Zazimalová *et al.*, 2010). Il a été mis en évidence que PIN5 et PIN8 sont localisées au sein de la membrane du réticulum et pourraient jouer un rôle dans le transport de l'AIA du cytosol de la cellule vers la lumière du réticulum (Mravec *et al.*, 2009 ; Dal Bosco *et al.*, 2012 ; Ding *et al.*, 2012). PIN5 est localisée dans la plupart des organes de la plante, en revanche PIN8 est localisée spécifiquement dans le grain de pollen (Mravec *et al.*, 2009 ; Dal Bosco *et al.*, 2012 ; Ding *et al.*, 2012). PIN6 a récemment été décrite pour son rôle dans certaines étapes du développement de la plante et semble aussi

Encadré 4 : Complexité et caractérisation des systèmes racinaires

• Complexité des systèmes racinaires

L'ensemble des racines forme le système racinaire. Le système racinaire se met en place généralement à partir de la croissance d'une **racine primaire (PR)** issue de embryogénèse. Dans certains cas, le système racinaire débute par la formation d'une ou plusieurs racines sur la tige (où sûr d'autres organes) qui sont appelées **racines adventives (AR)**. Dans la culture du peuplier, la propagation des hybrides d'intérêt se fait par la formation de racines adventives le long de l'entre-noeud (Rigal, 2012).



La croissance de la racine est ensuite accompagnée par la formation de nouvelles racines (secondaires, puis tertiaires, etc.) appelées **racines latérales (LR)**. Le système racinaire pivotant, ce qui est principalement le cas chez toutes les dicotylédones et les gymnospermes est constitué d'une racine principale, voir adventive et de racines latérales. Le système racinaire des monocotylédones, plus particulièrement celui des céréales dont le maïs et le riz est plus complexe. Ce système est appelé fasciculaire (ou chevelu), c'est à dire qu'il n'a pas de prédominance d'une racine principale. Au cours du développement de la plantule, plusieurs racines vont se former en haut de la racine principale nommées racines séminales (SR). De plus, des racines d'encrage (CR) en couronne à la base de la tige se forment au cours du développement de la plante. Celles-ci stabilisent la plante et limite la verse.

De nombreuses racines spécialisées ont été décrites et répondent à une demande adaptative des plantes à leur environnement: [A] les racines tubérisées (en tubercule) pour l'accumulation de réserves dans les différents tissus des racines, [B] les racines succulentes, adaptées au stockage de l'eau, [C] des racines aériennes, développées par les plantes épiphytes et absorbent l'humidité atmosphérique, [D] les racines suçoirs, observées chez les plantes parasites comme le gui. D'autres traits du système racinaire tels que greffes ou fusion entre les racines de différents arbres dans les forêts (DesRochers, 2013) [E].



• Caractérisation du système racinaire

L'architecture du système racinaire se définit par la longueur des racines, par le nombre et le positionnement des racines latérales le long de la racine principale (De Smet et al., 2012). Pour une caractérisation complète de l'architecture, l'angle d'implantation des racines latérales ainsi que la surface racinaire sont aussi des paramètres à prendre en compte. Même si le système racinaire est composé de racines, les **poils absorbants (RH)** sont de bons indicateurs de l'architecture racinaire, leur formation ont lieu lors de la différenciation cellulaire de l'épiderme de la racine et leur croissance est régulé par de nombreux facteurs du sol (Bibikova et al., 2003).

être localisée dans le réticulum (Mravec *et al.*, 2009 ; Bender *et al.*, 2013 ; Cazzonelli *et al.*, 2013).

Une nouvelle famille de transporteurs d'AIA, les PILS (pour PIN-LikeS) a été identifiée. Cette famille comporte 7 membres et les protéines présentent une structure protéique comparable aux protéines PINs (Barbez *et al.*, 2012). Ces membres sont aussi localisés à la membrane du réticulum et pourraient intervenir dans la régulation de l'homéostasie intracellulaire de l'auxine (Barbez *et al.*, 2012).

2.3 Croissance et développement racinaire

Le système racinaire participe à l'absorption de l'eau et des nutriments ainsi qu'à l'ancrage de la plante à son substrat. Comprendre les mécanismes qui régulent le développement racinaire est donc un objectif majeur des recherches agronomiques et forestières.

L'architecture racinaire définit l'organisation spatiale d'un système racinaire d'une plante. Une grande variété de systèmes racinaires est observée chez les plantes terrestres (Osmont *et al.*, 2007). Une description non exhaustive des racines composant l'architecture racinaire est développée dans l'[encadré 4](#).

La structure de la racine est facilement identifiable car les lignées cellulaires suivent l'axe longitudinal et sont organisées d'un point de vue transversal de façon concentrique. Une racine est composée d'un cylindre central contenant les tissus vasculaires, puis une assise cellulaire de péricycle, une assise endodermique et d'un cortex. *A. thaliana* possède une seule assise de cortex mais chez certaines espèces telles que le maïs, le cortex peut être constitué de 10 à 15 assises cellulaires. Chez une même espèce telle que le peuplier, une grande variation du nombre d'assises peut être observée selon le mode de culture et les hybrides étudiés. En condition *in vitro* utilisée au sein du laboratoire, les plants de peupliers possèdent seulement une à deux assises. L'assise la plus externe est l'épiderme, importante pour son rôle d'échange avec le milieu extérieur ([Figure 11](#)). L'ensemble des assises cellulaires dérive des cellules initiales qui entourent le centre quiescent. La coiffe racinaire, composée des cellules de la columelle et de la coiffe latérale, permet la protection de la racine et la perception de la gravité ([Figure 11](#) ; Dolan *et al.*, 1993 ; Baum *et al.*, 2002).

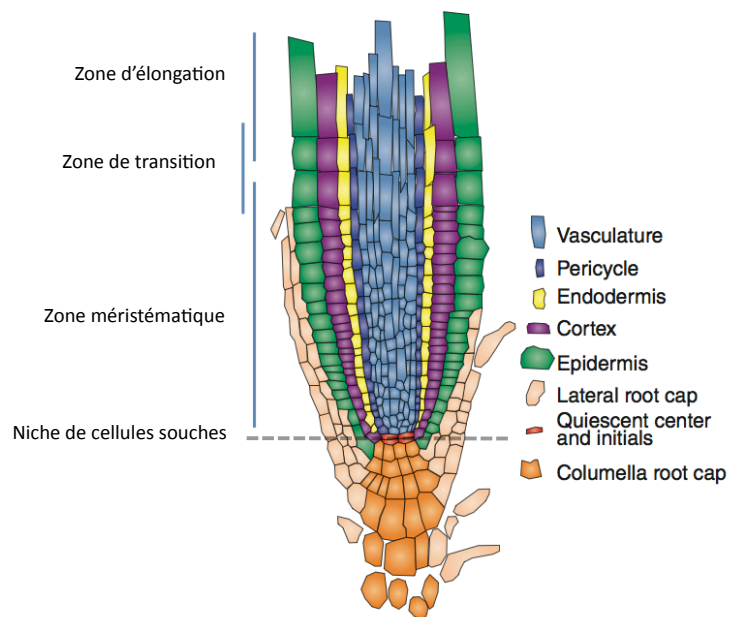


Figure 11 : Organisation de l'apex racinaire

La racine est composée du cylindre central, de tissus vasculaire, du péricycle, de l'endoderme, du cortex et de l'épiderme racinaire. Le centre quiescent est entouré des cellules souches (cellules initiales). Celles-ci vont se diviser et composer le méristème racinaire. Progressivement, les cellules méristématiques vont s'allonger (zone d'élongation). L'équilibre division/élongation va ainsi contrôler la croissance racinaire. La coiffe racinaire composée des cellules de la columelle et de la coiffe latérale permet la protection de la racine et la perception de la gravité.

(Image extraite de Jaillais *et al.*, 2010)

2.3.1 La croissance racinaire

La longueur de la racine est déterminée par le nombre de cellules nouvellement formées à l'apex racinaire ainsi que leurs tailles finales (Beemster & Baskin, 1998). La racine est ainsi formée de zones développementales consécutives, le long de l'axe longitudinal : une zone méristématique, lieu des divisions cellulaires suivie d'une zone d'élongation/différentiation. Dans la zone méristématique il est possible de distinguer deux sous zones, la zone méristématique apicale, dans laquelle les cellules se divisent à un fort taux et leurs tailles ne varient pas, et une zone méristématique basale, appelée aussi zone de transition, où les cellules commencent à s'allonger ([Figure 11](#) ; Jung & McCouch, 2013).

2.3.2 Les différents stades de la formation de la RLs

La formation de la RL a été décrite en huit étapes morphologiquement différentes en fonction du nombre d'assises cellulaires formées dans la nouvelle structure (Malamy & Benfey, 1997). Une des premières étapes visibles est une division anticlinale qui a lieu dans le péricycle (Malamy & Benfey, 1997). Après plusieurs divisions anticlinales successives (stade I), une première division périnclinale est observée et caractérise le stade II. La formation du *primordium* racinaire est le résultat d'une suite de divisions anticlinales et périnclinales (stade III à VII). Le stade VIII résulte de l'émergence du *primordium* racinaire hors des tissus de la racine primaire ([Figure 12A](#) ; Péret *et al.*, 2009).

En utilisant la lignée rapportrice de la signalisation auxinique DR5::GUS d'*A. thaliana* (voir [encadré 3](#)), une activité GUS dans les tissus en division est observable à partir de l'initiation jusqu'au stade V (Benková *et al.*, 2003), illustrant la présence d'un gradient à l'apex du *primodium* formé entre le stade II et V. A partir du stade V, le *primodium* est maintenant indépendant dans la régulation locale de l'accumulation d'auxine ([Figure 12B](#) ; Laskowski *et al.*, 1995 ; Benková *et al.*, 2003 ; Ljung *et al.*, 2005). L'observation des plantules DR5::GUS ou GFP (pour Green Fluorescent Protein, protéine rapportrice fluorescente) a permis de mettre en évidence une première étape avant l'initiation, une étape d'activation de cellules prédisposées à s'initier, appelées cellules fondatrices. Une réponse maximum à l'auxine a été décrite dans certaines cellules du cylindre central, proches du péricycle et localisées dans la zone de transition ([Figure 12C](#) ; De Smet *et al.*, 2007 ; Dubrovsky *et al.*, 2008). Il a été

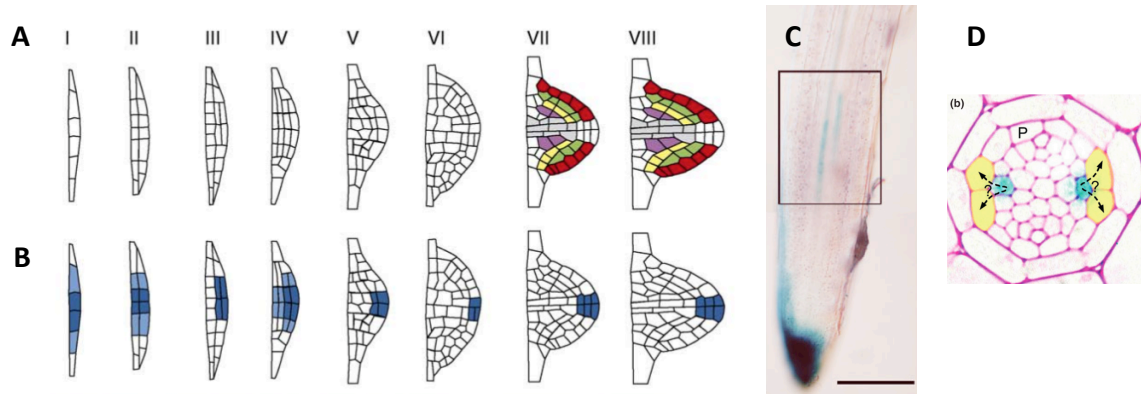


Figure 12 : Modification de la structure et de l'accumulation de l'auxine dans les différentes étapes de la formation de la racine latérale

A ; Schématisation des stades successifs de formation du *primordium* racinaire, dès les premières divisions anticlinales dans les cellules du péricycle de la racine parent stade I à l'organisation du *primordium* en tissus qui constitue la racine, l'épiderme (rouge), le cortex (vert), l'endoderme (jaune) et le péricycle (violet), stade VII. Le stade VIII constitue l'émergence du *primordium* hors de la racine parent. B ; Représentation par stade de la localisation du rapporteur GUS (bleu) sous le contrôle du promoteur de la réponse auxinique, DR5. Notez la formation d'un nouveau méristème indépendant entre les stades II et V. (Images extraites de Péret *et al.*, 2009). C ; Observation de l'apex racinaire DR5::GUS, notez l'activation des cellules du cylindre central dans la zone de transition. Deux cellules opposées semblent accumuler l'auxine, les cellules du péricycle accolées à cette cellule sont appelées cellules fondatrices de la racine latérale. D ; Coupe transversale de la racine dans la zone de transition au niveau des cellules fondatrices (en jaune; P: Péricycle). Le signal qui active les cellules de péricycle n'est pas connue (?). (Images extraites de De Smet *et al.*, 2007 et De Smet *et al.*, 2012)

montré que les RLs s'initient toujours dans une cellule du péricycle voisine de cellules qui se sont différenciées en pôle de protoxylème. Ce sont ces cellules du péricycle qui sont nommées cellules fondatrices. Le signal permettant aux cellules du cylindre central d'activer ces cellules du péricycle est encore méconnu ([Figure 12D](#) ; De Smet *et al.*, 2007).

A travers ces observations il est maintenant possible de déterminer quatre phases de la formation des RLs :

- L'activation de cellules fondatrices dans la zone de transition
- L'initiation de la RL
- La régulation de l'organisation du *primordium*
- L'émergence du *primordium*

De manière intéressante, il a été montré que les cellules activées dans la zone de transition seront initiées et formeront un *primordium* racinaire. En revanche, l'ensemble des *primordia* racinaires ne vont pas émerger de la racine (Dubrovsky *et al.*, 2006 ; De Smet *et al.*, 2007 ; Marhavý *et al.*, 2013). Un *primodium* non émergé au cours du développement intrinsèque de la plante, peut émerger plus tard, en réponse à un facteur environnemental (Nibau *et al.*, 2008). Une partie de la modulation du système racinaire se réalise donc par la régulation de l'émergence (Péret *et al.*, 2009). Il a aussi été montré qu'il existe une corrélation positive entre le nombre de sites d'initiation et le nombre d'émergence de RLs (Lucas *et al.*, 2008).

2.4 L'auxine régule la croissance racinaire

L'auxine conditionne la croissance racinaire en régulant (1) la division cellulaire, localisée dans la zone méristématique, (2) l'allongement des cellules, au sein de la zone d'élongation/différentiation (Vanneste & Friml, 2009 ; Perrot-Rechenmann, 2010). De plus, la régulation de la quantité d'auxine à l'apex racinaire, détermine la transition entre les deux processus cellulaires (dans la zone de transition ; [Figure 13](#) ; (Depuydt & Hardtke, 2011 ; Garay-Arroyo *et al.*, 2012 ; Jones & Ljung, 2012).

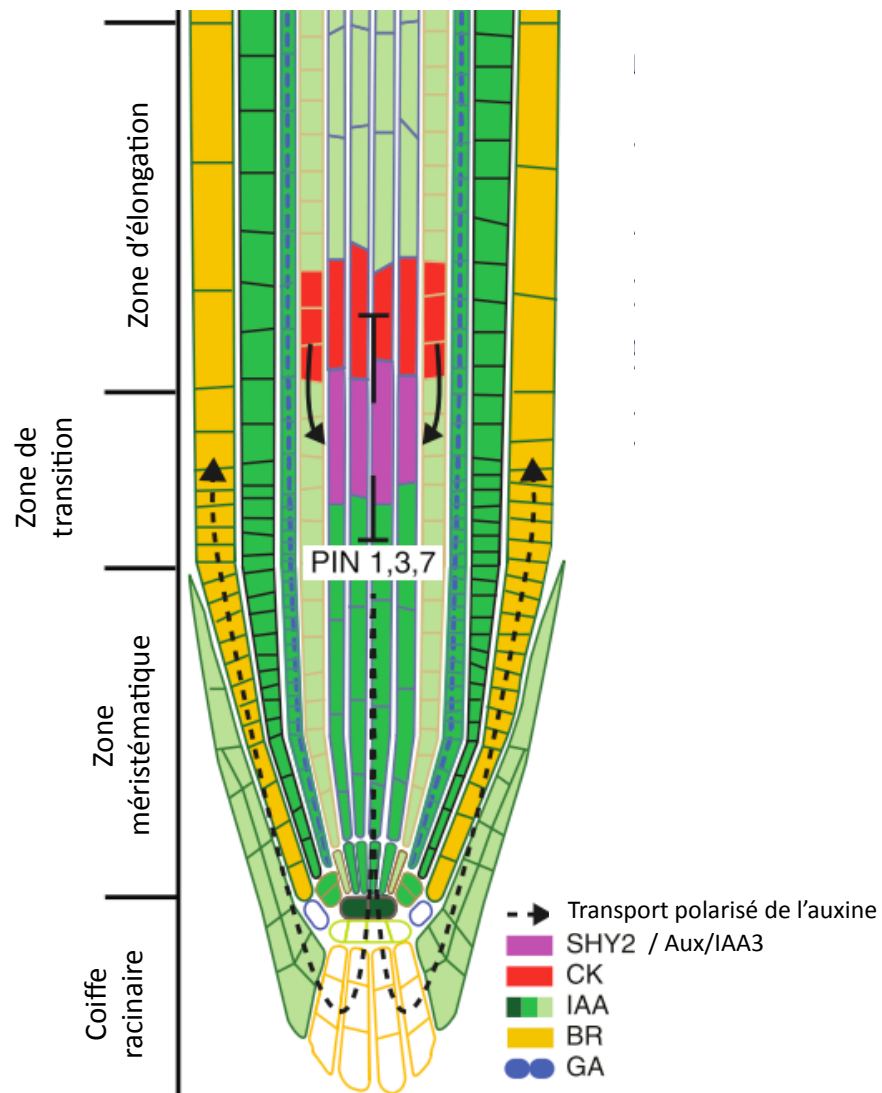


Figure 13 : Importance de la régulation du gradient de l'auxine dans la zone de transition

L'interaction auxine (IAA) / gibbérelline (GA) / brassinostéroïde (BR)/ cytokinine (CK) influence le transport polarisé de l'auxine dans la zone de transition à l'apex racinaire. Un complexe d'interactions a lieu dans cette zone, régulant l'équilibre de la division cellulaire et la différenciation/élongation cellulaire. On peut noter un rétrocontrôle de BRX et SHY2 sur l'expression des MP/ARF. Il a donc été supposé que l'importance des voies est dépendante de la biosynthèse des hormones, qui peut favoriser ou non l'expression de *PIN3* au dépend des autres acteurs (*BRX*, *SHY2*). Image extraite de Jones & Ljung 2012

2.4.1 L'auxine régule positivement la division cellulaire dans la zone méristématique

A travers les études qui permettent la culture cellulaire des tissus végétaux, il est reconnu que l'auxine est un facteur pouvant induire la division cellulaire. Mais il a aussi été montré que la présence de cytokinines est essentielle à l'activation du cycle cellulaire.

Certaines données montrent que l'auxine intervient dans la régulation du cycle cellulaire (Perrot-Rechenmann, 2010). Ainsi, l'auxine induit l'expression de facteurs régulant la progression du cycle cellulaire telles que des cyclines dépendantes kinases de la famille des CDKA et CDKD (Hemerly *et al.*, 1993 ; Ferreira *et al.*, 1994). Il a aussi été mis en évidence l'accumulation spécifique de gènes codant pour des Aux/IAA et ARF dans des phases spécifiques du cycle cellulaire (Breyne *et al.*, 2002). De plus, ABP1 est essentielle dans le maintien de la division cellulaire à travers la régulation d'acteurs du cycle cellulaire (Braun *et al.*, 2008 ; Tromas *et al.*, 2009), conférant à ABP1 un rôle essentiel dans la régulation du gradient de la zone de transition (Tromas *et al.*, 2009). Ces données, suggèrent un rôle de l'auxine dans la progression du cycle cellulaire et ainsi la maintenance de la division cellulaire de la zone méristématique racinaire.

Au niveau tissulaire, une corrélation peut être faite entre le niveau d'auxine et la prolifération cellulaire dans la zone méristématique (Grieneisen *et al.*, 2007). En effet, la position du niveau d'auxine le plus faible est corrélée avec une diminution de la prolifération cellulaire le début de l'élongation/différentiation ([Figure 13](#) ; Grieneisen *et al.*, 2007). Il a donc été supposé que les transporteurs PIN, plus particulièrement, la boucle de reflux de l'auxine *via* les transporteurs PIN2/PIN1/PIN3/PIN7 régule la position du gradient et ainsi la position de la zone de transition. Cette hypothèse est soutenue par le phénotype des triples mutants *pin*, qui possèdent une diminution de la zone méristématique (Blilou *et al.*, 2005 ; Vieten *et al.*, 2005).

Dans l'apex racinaire, les gènes PLT (pour PLETHORA), facteurs de transcription de la famille des AP2/ERF), sont nécessaires à la spécification du centre quiescent et à la maintenance de la totipotence des cellules du centre quiescent (Aida *et al.*, 2004). Les PLT présentes aussi un maximum d'expression dans le centre quiescent et leur expression est corrélée avec la zone de gradient d'auxine (Galinha *et al.*, 2007). L'activité mitotique des PLT a été montrée à plusieurs reprises (Aida *et al.*, 2004 ; Galinha *et al.*, 2007). Les mutants *plt*

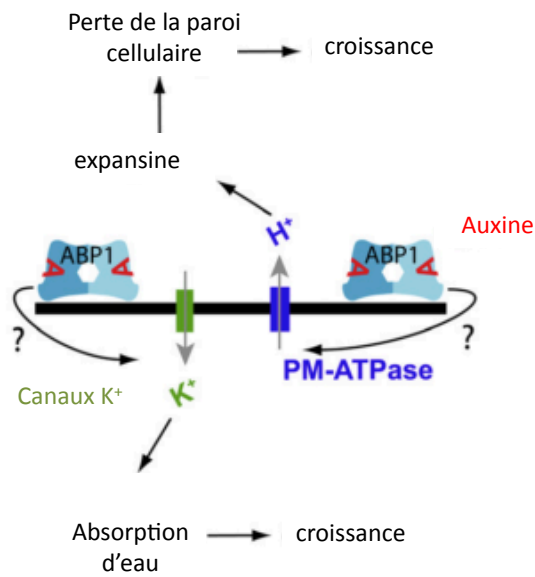


Figure 14 : Modèle de régulation de la croissance cellulaire par ABP1

Par une voie inconnue à ce jour (?), ABP1 régule rapidement (de l'ordre de la minute) l'activité d'ATPase de la membrane plasmique et les canaux potassiques (K^+). Les ATPase induisent une acidification du milieu extracellulaire, ce qui active l'élongation cellulaire par la perte de la paroi cellulaire, induit par des enzymes de type expansine. De plus, l'activation des canaux K^+ induit une augmentation en eau intracellulaire et donc induit la croissance cellulaire.

(Figure modifiée de Sauer & Kleine-Vehn, 2011)

ont une zone méristématique plus petite que les plantes sauvage (Aida *et al.*, 2004). Les PLT régulent l'expression des gènes *PIN* dans la zone méristématique apicale (Blilou *et al.*, 2005). Ainsi, les PLT maintiennent l'activité mitotique des cellules du méristème apical et régule la zone de transition. L'activité des promoteurs des *PLT* est corrélée avec le niveau d'AIA dans la racine. Cette activité est due à l'activation de l'expression des gènes PLT par les facteurs de transcription ARF5/MP et ARF7/NHP4 (Aida *et al.*, 2004). Ce mécanisme d'auto régulation de l'auxine permet de stabiliser le niveau d'auxine dans l'apex racinaire. Par ailleurs, ABP1 régule le gradient d'expression des PLT (Tomas *et al.*, 2009).

L'auxine contrôle aussi la transition entre la prolifération vers l'élongation/différentiation en inhibant l'endoreduplication (Ishida *et al.*, 2010).

2.4.2 L'auxine régule l'élongation cellulaire

L'auxine, appliquée à une concentration entre 10^{-9} et 10^{-10} M, inhibe la croissance racinaire ([Figure 5](#)). La protéine ABP1 est un acteur clef dans ce mécanisme. Par une voie inconnue à ce jour, ABP1 augmente rapidement (de l'ordre de la minute) l'activité des ATPases de la membrane plasmique ainsi que celle des canaux potassiques entrants (K^+ ; [Figure 14](#)). Les ATPases induisent une acidification du milieu extracellulaire, ainsi active donc l'élongation cellulaire par la modification de la paroi. Parallèlement, l'activation des canaux potassiques induit une augmentation de la pression de turgescence et ainsi régule la croissance cellulaire ([Figure 14](#); Sauer & Kleine-Vehn, 2011)

Une des réponses physiologiques observée en réponse à une quantité exogène d'auxine et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS; Tognetti *et al.*, 2012). La production des ROS a aussi été détectée pour être en aval de la voie de signalisation auxinique, de plus ce mécanisme faciliterait la modification de la paroi cellulaire nécessaire à l'élongation cellulaire (Joo *et al.*, 2001; Schopfer *et al.*, 2002; Liskay *et al.*, 2004)

Comme l'auxine, l'éthylène participe à la régulation de la croissance racinaire ([Tableau 1](#)). Cette hormone induit la biosynthèse de l'auxine à l'apex racinaire en induisant l'expression des gènes *ASA1*, *ASB1*, *TAA1* et *TAR* (Stepanova *et al.*, 2005; Swarup *et al.*, 2007) et stimule aussi le transport basipète de l'auxine *via* *AUX1* et *PIN2* et facilite ainsi son transport dans la zone de transition (Růžička *et al.*, 2007).

Hormones	Effet sur la longueur de la racine	Effet sur la division cellulaire	Effet sur l'élongation cellulaire
Auxines	+/-	+/-	+/-
Cytokinines	-	-	-
Gibbérellines	+	+	+
Brassinostéroïdes	+/-	+/-	+/-
Ethylène	-	-	-

Tableau 1 : Effets des différentes hormones dans la croissance racinaire

L'effet de l'auxine, des cytokinines, des gibbérellines, des brassinostéroïdes et de l'éthylène sur la longueur de la racine et du mécanisme impliqué ou supposé impliqué. « + » : effet positif ; « - » : effet négatif « +/- » : effet dose-dépendante.

Werner *et al.*, 2003 ; Dello Iorio *et al.*, 2007 ; Růžička *et al.*, 2007 ; Swarup *et al.*, 2007 ; Moubayidin *et al.*, 2010 ; Ruzicka *et al.*, 2009 ; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009 ; Hacham *et al.*, 2011 ; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2011, Hacham 2011 ; Zang *et al.*, 2011

2.4.3 Les voies qui régulent la transition division/élongation cellulaire

Les voies de régulation de la transition de la prolifération vers l'élongation cellulaire impliquent la régulation de la quantité d'auxine à l'apex racinaire. Cette régulation implique des acteurs des différentes voies hormonales, dans la zone de transition.

Avec l'auxine, les cytokinines, les gibbérellines et les brassinostéroïdes sont considérées comme essentiels à la croissance racinaire. Les cytokinines régulent la prolifération cellulaire, les gibbérellines sont bien connues pour leurs rôles dans l'élongation. Le rôle des brassinostéroïdes semble plus complexe, des études ont montré leurs implications dans la régulation de ces deux processus ([Tableau 1](#) ; Depuydt and Hardtke, 2011 ; Garay-Arroyo *et al.*, 2012 ; Jones & Ljung, 2012).

La régulation du transport polarisé de l'auxine *via* PIN3/PIN7/PIN1 détermine la taille de la zone méristématique (Blilou *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que la répression de l'expression des *ARF* dont *MP* (pour MONOPTEROS), *Aux/IAA3/SHY2* régule l'expression des gènes *PINs* dans la zone de transition ([Figure 13](#) ; Weijers *et al.*, 2005 ; Dello Ioio *et al.*, 2008). Plusieurs acteurs des voies hormonales ont été décrits dans la régulation de l'expression de *ARF/MP*, dans la zone de transition :

- **Les cytokinines** jouent un rôle important dans la taille de la zone méristématique en activant l'élongation/différentiation cellulaire ([Tableau 1](#)). Une application exogène de cytokinines induit une taille de la zone méristématique plus petite. Les mutants de signalisation de la voie des cytokinines dont *ARR1* et *ARR12* (pour Arabidopsis Response Regulator) ont un méristème plus important que les plantes contrôles (Dello Ioio *et al.*, 2007). Il a été supposé que *ARR1/ARR12* régule l'expression de *Aux/IAA3/SHY2*, ce qui explique la modification du transport polarisé de l'AIA dans les mutants *arr1* ([Figure 13](#) ; Dello Ioio *et al.*, 2008).
- **Les gibbérellines** sont décrites dans la littérature pour induire à la fois l'élongation cellulaire et le taux de prolifération cellulaire ([Tableau 1](#)). Les GA activent la croissance cellulaire en permettant la dégradation des facteurs de transcription de type DELLA (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008 ; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Il est connu que les gibbérellines influencent les voies de l'AIA dans la croissance racinaire (Fu & Harberd, 2003). Après un apport de gibbérelline, il a été noté une inhibition de *ARR1*

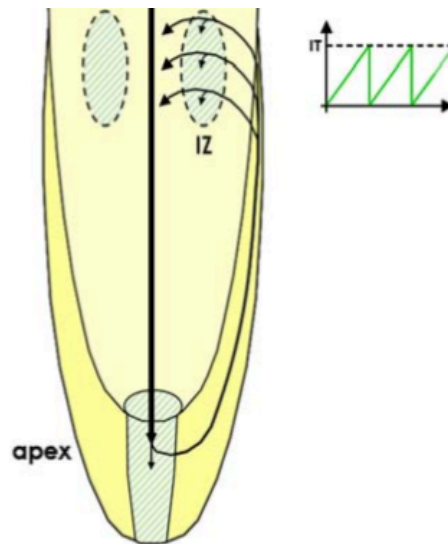


Figure 15 : Modèle d'activation des cellules fondatrices des RLs dans la zone de transition par le transport polarisé de l'auxine

Un modèle propose que l'auxine accumulée dans l'apex racinaire au niveau de la coiffe racinaire et retransportée de façon polarisée par AUX1, PIN1 et PIN2, dans les cellules de la coiffe latérale et de l'épiderme. Au niveau de la zone de transition, ce flux d'auxine est redirigé localement vers le cortex jusqu'au cylindre central et s'accumule dans une cellule du cylindre central (voir aussi [Figures 12C et 12D](#)). Cette accumulation locale d'auxine est oscillatoire au cours de la croissance de la racine et va permettre l'activation des cellules fondatrices des RLs dans le péricycle. (Image simplifiée de Lucas *et al.*, 2008).

dépendante des facteurs de transcription RGA/DELLA, régulant par la suite l'expression de *Aux/IAA3/SHY2* ([Figure 13](#) ; Moubayidin *et al.*, 2010).

- **Les brassinostéroïdes** et l'auxine ont un effet synergique dans la racine ([Tableau 1](#)). Une augmentation de l'activité DR5::GUS est observée après un apport exogène de brassinostéroïdes (Bao *et al.*, 2004). BRX (pour *B*revis *R*adix), facteur de transcription de la voie des brassinostéroïdes est un gène de réponse à l'auxine. Ce facteur est nécessaire à l'expression de *Aux/IAA3/SHY2* et *PIN3* dans la zone de transition de la racine d'*A. thaliana* (Scacchi *et al.*, 2010). Une voie de rétrocontrôle a été décrite puisqu'une des cibles de ARF/MP est *BRX* ([Figure 13](#) ; Mouchel *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données révèle une régulation complexe de la croissance racinaire, dans une zone spécifique de la racine, à travers différentes voies hormonales ([Figure 13](#)).

2.5 L'implication de l'auxine dans la formation de la RL

Une application d'auxine exogène est suffisante par activer la formation de nouvelles RLs (Laskowski *et al.*, 1995 ; Casimiro *et al.*, 2001 ; Laskowski *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que le transport polarisé de l'auxine joue un rôle essentiel dans toutes les étapes de formation de la RL, de l'initiation, à l'émergence de la racine (Fukaki & Tasaka, 2009). Par la suite, nous nous intéressons à l'étape d'activation des cellules fondatrices, étapes considérées dans notre cas d'étude (voir par la suite [Encadré 5](#)).

De nombreuses analyses directes et indirectes ont montré l'importance du transport basipète de l'AIA dans cette étape. L'initiation des RLs est dépendante du gradient d'auxine à l'apex racinaire ainsi que de son transport basipète (Bhalerao *et al.*, 2002). De plus, l'application de l'inhibiteur de transport de l'auxine, NPA, diminue le nombre d'initiation de RLs (Casimiro *et al.*, 2001). Comme décrit plus haut, il a aussi été montré que l'auxine est recyclée dans l'apex *via* le transport basipète localisé dans la coiffe latérale et l'épiderme, et redirige localement l'auxine vers le cortex et plus profondément dans le cylindre central ([Figure 15](#) ; Blilou *et al.*, 2005). Ce reflux induit des gradients locaux de l'auxine qui participeraient à l'initiation de la formation des RLs ([Figure 15](#) ; De Smet *et al.*, 2007). De plus il a été montré que le transport d'auxine par *AUX1* participe à cette régulation (Swarup *et*

al., 2001 ; Swarup *et al.*, 2005). Le mutant *aux1* a un niveau réduit d'auxine à l'apex racinaire, corrélé avec une diminution d'initiation de RLs due à une diminution du nombre de cellules fondatrices (Swarup *et al.*, 2001 ; Marchant *et al.*, 2002 ; De Smet *et al.*, 2007). De plus, en restaurant l'expression de *AUX1* chez le mutant *aux1*, en utilisant un promoteur spécifique de la coiffe latérale ou de l'épiderme, une restauration du nombre de RLs initiées est observée. Alors que si l'expression de *AUX1* est restaurée uniquement dans le cylindre central, le mutant *aux1* est toujours défectueux dans l'initiation des RLs (De Smet *et al.*, 2007).

D'autres études ont montré l'implication des PIN dans le reflux de l'auxine dans la zone de transition, PIN2 de part sa localisation mais aussi PIN1. En utilisant des mécanismes d'activation de nouvelles RLs, Ditegou et ses collaborateurs ont montré l'implication de PIN1 et PIN2 dans l'accumulation de l'AIA dans les cellules du cylindre central (Ditegou *et al.*, 2008). En gravistimulant la racine principale d'*A. thaliana*, ils ont montré une localisation de PIN1 dans les zones basales et apicales d'une cellule du cylindre central. Cette observation est aussi étayée par le fait que les racines d'*A. thaliana* surexprimant le gène *PIN1* développent plus de RLs que les plantes contrôles (Benková *et al.*, 2003). Les mutants *pin1* et *pin2* n'ont pas montré de défaut dans le nombre de RLs, peut être dû à la redondance des fonctions qui existent dans la famille des PINs (Blilou *et al.*, 2005).

Le nombre de cellules fondatrices du mutant *pin7* est plus important. Ces données suggèrent un rôle négatif de PIN7 dans l'activation des cellules fondatrices (Marhavý *et al.*, 2013).

Il semblerait donc que l'accumulation de l'auxine dans les cellules du cylindre central de la zone de transition est dû au transport basipète de l'AIA dans la coiffe latérale et l'épiderme et son reflux dans le péricycle.

Le rythme de l'activation de ces cellules chez *A. thaliana* est connu, il est d'environ 15 heures. En revanche l'origine de ce rythme est mal connue. En utilisant la lignée promoteur/rapporteur DR5::Luciférase, protéine rapportrice très dynamique, l'expression de la luciférase est augmentée dans la zone de transition, et ensuite dans la zone d'élongation ([Figure 15](#)). Il a été montré que ces oscillations ne semblent pas dépendantes des conditions environnementales tels que la température ou les nutriments, et serait donc régulées par une horloge endogène de la plante (Moreno-Risueno *et al.*, 2010). Moreno-Risueno et ses collaborateurs ont tenté de décrypter les mécanismes de ces oscillations. Le facteur de

transcription ARF7 a été montré comme un bon candidat dans la régulation de l'oscillation de l'activation des cellules fondatrices mais ne peut expliquer à lui seul l'oscillation. D'autres facteurs de transcription ont une expression qui oscille comme SCH1 et SCH2 (pour Shatterproof), STK (pour Seedstick) et AGL20 (pour Agamous-like).

En conclusion, il a été montré que l'auxine et plus particulièrement son transport régulent la croissance racinaire et la formation de la RL.

3 L'auxine dans les interactions plantes-microorganismes

3.1 Implication des voies de l'auxine dans les modifications du développement racinaire en réponse aux micro-organismes bénéfiques

Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions

POORNIMA SUKUMAR¹, VALÉRIE LEGUÉ², ALICE VAYSSIÈRES², FRANCIS MARTIN², GERALD A. TUSKAN¹ & UDAYA C. KALLURI¹

¹Biosciences Division, Oak Ridge National Laboratory, One Bethel Valley Road, Oak Ridge, TN 37831, USA and ²INRA and Nancy University, Unité Mixte de Recherche INRA/Nancy University, 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, INRA-Nancy, 54280 Champenoux, France

ABSTRACT

A wide variety of microorganisms known to produce auxin and auxin precursors form beneficial relationships with plants and alter host root development. Moreover, other signals produced by microorganisms affect auxin pathways in host plants. However, the precise role of auxin and auxin-signalling pathways in modulating plant–microbe interactions is unknown. Dissecting out the auxin synthesis, transport and signalling pathways resulting in the characteristic molecular, physiological and developmental response in plants will further illuminate upon how these intriguing interspecies interactions of environmental, ecological and economic significance occur. The present review seeks to survey and summarize the scattered evidence in support of known host root modifications brought about by beneficial microorganisms and implicate the role of auxin synthesis, transport and signal transduction in modulating beneficial effects in plants. Finally, through a synthesis of the current body of work, we present outstanding challenges and potential future research directions on studies related to auxin signalling in plant–microbe interactions.

Key-words: arbuscular mycorrhiza; auxin; ectomycorrhiza; endophytes; plant growth-promoting fungi; plant growth-promoting rhizobacteria; plant–microbe interaction; root development.

INTRODUCTION

Roots are belowground organs that anchor terrestrial plants in soil and, as the interface between plant and soil, are in constant interplay with many soil microorganisms. Some classes of microorganisms can beneficially modify host root development, increase absorption of water and nutrients, augment tolerance to stress such as drought and disease, and enhance plant biomass. Beneficial plant–microbe relationships include microorganisms such as (1) rhizospheric bacteria and/or fungi that can promote plant growth and/or fix nitrogen without inducing new organ formation, termed as plant growth-promoting rhizobacteria or plant growth-promoting fungi; (2) nodule-forming nitrogen-fixing bacteria

such as *Rhizobium* and *Frankia*; (3) arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi; and (4) root endophytic bacteria and fungi. The recent surge in reports identifying beneficial microorganisms and the physiological responses elicited in the host plants suggests a complex interplay between environmental and biological factors. Enhanced and concerted efforts are needed to obtain a greater clarity in the multifaceted research related to inter-kingdom communication, regulation of species composition and biogeochemical cycles, ecosystem health and improved plant growth strategies for food, fuel or fibre purposes. Here, we provide a review of the involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions.

Several abiotic and biotic factors can influence the development and establishment of plant–microbe relationships and the net physiological effect on growth of host plant. Slankis (1974) had described the effect of soil factors such as nutrient content, pH, temperature, moisture and aeration on formation of mycorrhizal associations. Moreover, the composition of soil microbiota (Slankis 1974; Johnson *et al.* 2012), chemicals in root exudates (Badri & Vivanco 2009), and plant factors such as the age of the plants and microbial host specificity (Morgan, Bending & White 2005; Johnson *et al.* 2012) can drive the net plant–microbial relationships. Communication between host plant and microorganisms can occur through secretion of signalling factors in the form of proteins, metabolites and/or volatile organic compounds. For example, detection of plant exudates by ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* induces expression of mycorrhizal-induced small secreted protein 7 (MiSSP7), which functions to establish mutualistic relation with *Populus* (Plett *et al.* 2011). Plant hormones such as auxin, ethylene and jasmonic acid represent additional classes of signalling molecules that influence beneficial plant–microbe interactions (Sun *et al.* 2006; Glick *et al.* 2007b; Camehl *et al.* 2010; Spaepen & Vanderleyden 2010). A wide variety of microorganisms have been shown to produce auxin and influence host plant development (Slankis 1973; Spaepen & Vanderleyden 2010). Dissecting out the mechanisms by which microorganisms transduce auxin signals, modulate auxin pathways, and elicit molecular, physiological and developmental responses in host can provide insights into these intriguing inter-species interactions.

Correspondence: U. C. Kalluri. E-mail: kalluriudayc@ornl.gov

ROLE OF AUXIN IN PLANT ROOT DEVELOPMENT

Involvement of plant hormones during microbial associations with host plants was first reported in the 1940s (Macdougall & Dufrenoy 1944). Historic experiments by Slankis (1973) have demonstrated a role for fungal auxin in forming mycorrhizal associations in *Pinus* roots. The role of auxin in regulating a wide range of physiological and developmental processes in plants, such as seedling growth, apical dominance, vascular patterning, tropic responses, embryogenesis, and root growth and development, is well known and documented (Zhao 2010; Kalluri *et al.* 2011). At the cellular level, auxins are known to regulate many aspects of cell division, differentiation and elongation through activation of the cell cycle genes and acidification of cell wall (Overvoorde, Fukaki & Beeckman 2010).

Numerous excellent recent reviews summarize the many aspects of auxin synthesis, transport and signalling in root development (Peret *et al.* 2009; Overvoorde *et al.* 2010; Zhao 2010). Development of the belowground plant structure entails adjustments to primary root growth with regard to timing, extent (numbers and dimensions of lateral roots and root hairs) and degree (such as secondary and tertiary roots) of root branching. A simplified description of the role of auxin in root development could be summarized as auxin inhibits root elongation and promotes development of lateral roots. Lateral root development involves a series of cell divisions in activated pericycle cells (or endodermal cells in cereals) to form root primordia, which differentiate into newly emerging lateral roots (Malamy & Benfey 1997; Peret *et al.* 2009). Each of these events, including initiation, development, emergence and elongation of lateral roots, has been attributed to the regulation of auxin transport, signalling and biosynthesis (Dubrovsky *et al.* 2008; Peret *et al.* 2009; De Smet 2012).

In brief, auxin synthesis involves multiple pathways including tryptophan-dependent and -independent pathways (Woodward & Bartel 2005). Enhanced auxin levels can increase root formation in a dose-dependent manner, as evidenced by genetic manipulations that enhance auxin levels and exogenous applications of auxin (Malamy 2005). Use of auxin-induced reporter *DR5::GUS* has demonstrated that various stages of primordium development are accompanied by establishment of auxin-signalling maximum (Peret *et al.* 2009). Auxin signalling involves F-box receptor transport inhibitor response 1 (TIR1), repressor AUX/indole-3-acetic acid (IAA), and transcriptional factor auxin response factor (ARF) (Kalluri *et al.* 2007; Peret *et al.* 2009). Binding of auxin to the E3 ligase receptor complex results in targeting of AUX/IAA proteins for degradation, which then leads to derepression of ARF proteins resulting in auxin-induced gene expression (Fig. 1). Many of these components in auxin signalling have been identified to be involved in the regulation of root development (Casimiro *et al.* 2003). Finally, auxin transport mediated through auxin influx proteins such as auxin resistant 1 (AUX1) and like auxin (LAX), and efflux proteins such as pin-formed (PIN) and ATP binding cassette

B/multidrug resistance/P-glycoprotein (ABCB/MDR/PGP) can modulate root development (Teale, Paponov & Palme 2006; Kalluri *et al.* 2011) (Fig. 1).

The emerging reports of the role of auxin in plant–microbe interactions are dispersed and incomplete. Clearer answers are needed for questions such as: What is the extent of known host auxin-mediated root modifications brought about by beneficial relationships with microorganisms? What is the evidence in support of components of auxin synthesis, transport, signal transduction, and the resulting net change in auxin homeostasis in modulating beneficial effects in plants? Is the current evidence in support of an interspecific or universal plant-specific involvement of auxin pathways during plant–microbe interactions?

The present review seeks to survey and summarize the evidence in support of the involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions (Table 1). As several recent reviews have covered auxin transport and synthesis mechanisms during nodule-forming legume–rhizobia symbiosis (Grunewald *et al.* 2009; Spaepen & Vanderleyden 2010), a detailed discussion on nodule-forming nitrogen-fixing bacteria is excluded from the present review. Signalling crosstalk that modifies auxin-signalling pathways is discussed briefly. Last but not the least, research challenges and potential future directions are discussed.

MODULATION OF HOST ROOT ARCHITECTURE BY BENEFICIAL PLANT – MICROORGANISM INTERACTIONS

As noted earlier, beneficial plant–microbe interactions can have direct or indirect effects on belowground and aboveground plant structures. Specifically, changes to root structure include overall root growth, primary and lateral root length, lateral root number and positioning of lateral root (Hirsch *et al.* 1997; Ditengou, Beguiristain & Lapeyrie 2000; Oldroyd & Downie 2008; Felten *et al.* 2009; Contesto *et al.* 2010) (Table 1). Even nodule-inducing microorganisms can mediate changes in root architecture outside of nodule formation. Olah *et al.* (2005) have reported that there was an increase in lateral root formation in *Medicago truncatula* in response to the Nod factor of *Sinorhizobium meliloti*. Similarly, *Frankia* increased root branching in *Alnus glutinosa* (Orfanoudakis, Wheeler & Hooker 2010).

Several plant growth-promoting rhizobacteria, not classified as mutualist partners, have also been shown to influence plant root architecture. For example, co-culture with *Bacillus megaterium* increased lateral root number and length in *Phaseolus vulgaris* (Lopez-Bucio *et al.* 2007) and volatile organic compounds released by *Bacillus subtilis* enhance lateral root development in *Arabidopsis* (Zhang *et al.* 2007). In contrast, in *Arabidopsis* inoculation with a strain of rhizobacteria *Phyllobacterium brassicacearum* does not affect the primary root length or lateral root density but positively affects total lateral root length (Mantelin *et al.* 2006; Contesto *et al.* 2010). *Serratia marcescens*, when co-cultured with *Arabidopsis*, inhibited primary root elongation and induced lateral roots

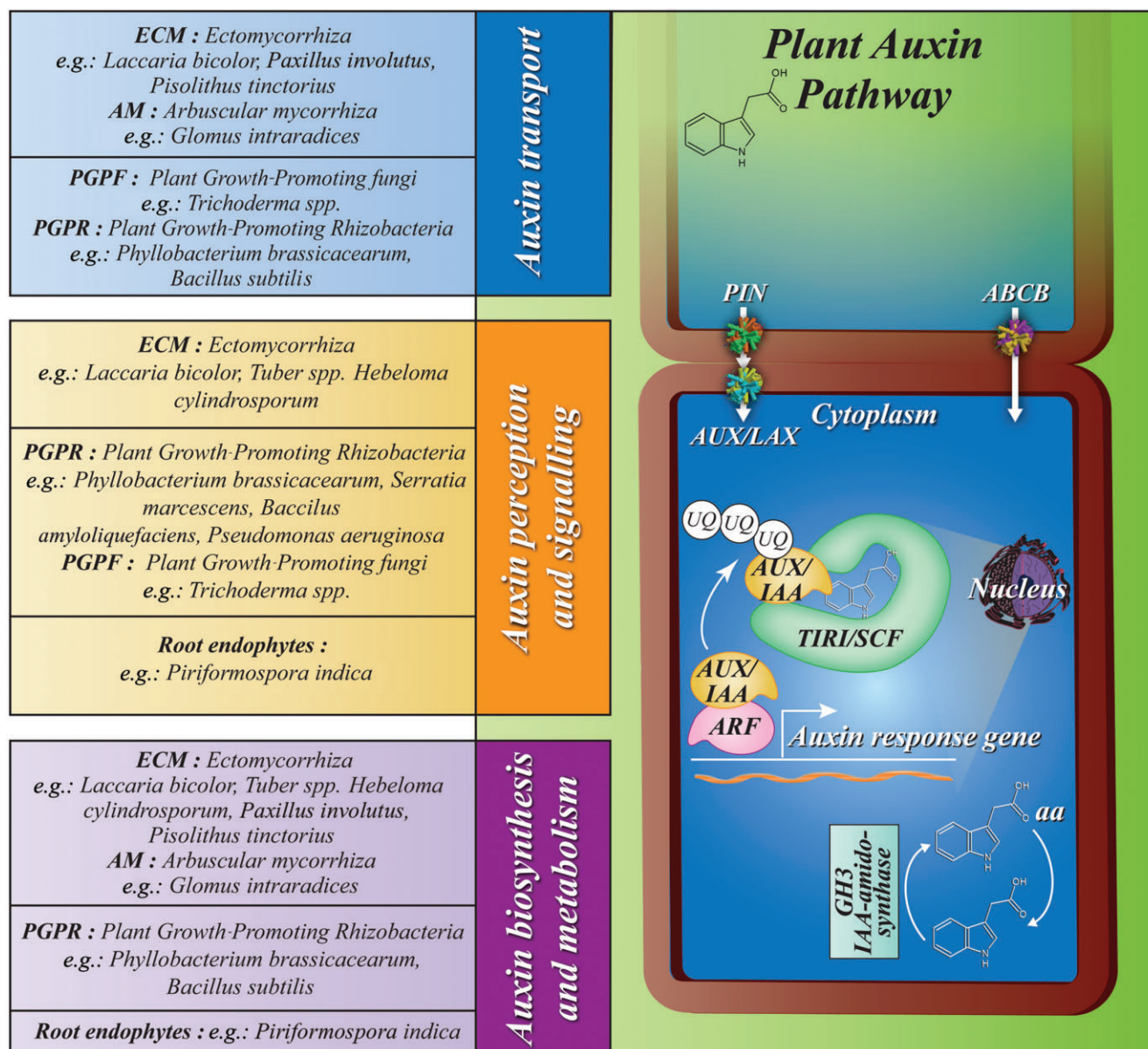


Figure 1. Schematic representation of the types of beneficial microorganisms and the auxin synthesis, transport, and signal transduction pathways reported to be involved in modulating effects on host root growth and development. Association of different microorganisms with the host plant can inflict changes in root architecture. One of the molecular mechanisms by which these physiological changes are induced is through modulating auxin pathways. Beneficial microorganisms (ectomycorrhizal, arbuscular, plant growth-promoting rhizobacteria and fungi, and entophytic bacteria) can alter net auxin homeostasis through changes in auxin synthesis, signalling and transport. Based on the literature, the classes of beneficial microorganisms that affect or could potentially affect the different auxin pathway are given (PIN, AUX/LAX, ABCB are auxin transport proteins; TIR1, AUX/IAA, ARF are involved in auxin signalling; GH3 is involved in auxin conjugation).

in a distance-dependent manner (Shi *et al.* 2010). The rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* modified root architecture in *Arabidopsis* by means of increasing primary root length, number of lateral roots, and root fresh weight (Ortiz-Castro *et al.* 2011). *Azospirillum brasilense*, in an inoculum concentration-dependent manner, inhibited root length while enhancing the root hair formation in *Triticum aestivum* (Dobbelaere *et al.* 1999). Two species of free-living fungi, *Trichoderma virens* and *Trichoderma atroviride*, enhanced

lateral root growth when cultured with *Arabidopsis* (Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Salas-Marina *et al.* 2011).

In several arbuscular mycorrhizal species, colonized root systems displayed more lateral roots than a non-AM root systems (Berta *et al.* 1990, 1995; Hooker, Munro & Atkinson 1992; Tisserant, Gianinazzi & Gianinazzi-Pearson 1996; Yano, Yamauchi & Kono 1996; Citernesi, Vitagliano & Giovannetti 1998; Gutjahr, Casieri & Paszkowski 2009; Orfanoudakis *et al.* 2010). A decrease in primary root length is observed in

Table 1. List of known phenotypic effects on plant roots caused by beneficial microbes

Microorganism	Classification of microorganisms	Host plant	Phenotype	Impact on plant endogenous auxin pathways	Reference
<i>Aspergillus ustus</i>	PGPF ^a	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Increased lateral root and root biomass	NA	(Salas-Marina <i>et al.</i> 2011) (Barrow & Osuna 2002)
<i>Azospirillum brasilense</i>	PGPR ^b	<i>Triticum aestivum</i>	Decreased root length, increased root hair formation	NA	(Dobbelaere <i>et al.</i> 1999)
<i>Bacillus megaterium STM196</i>	PGPR ^b	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	Increased root biomass, lateral root number and length, decreased primary root growth	NA	(Lopez-Bucio <i>et al.</i> 2007)
<i>Bacillus subtilis GB03</i>	PGPR ^b	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Increase in lateral root development	Accumulation, transport	(Zhang <i>et al.</i> 2007)
<i>Frankia</i>	Nodule forming	<i>Alnus glutinosa</i>	Increased lateral root number	NA	(Orfanoudakis <i>et al.</i> 2010)
<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Gigaspora rosea</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i>	AM ^c	<i>Medicago truncatula</i>	Increased lateral root	NA	(Olah <i>et al.</i> 2005)
<i>Gigaspora rosea</i>	AM ^c	<i>Alnus glutinosa</i>	Increased lateral root number	NA	(Orfanoudakis <i>et al.</i> 2010)
<i>Glomus clarum</i> , <i>Gigaspora decipiens</i>	AM ^c	<i>Aquilaria filarial</i> , <i>Dyera polyphylla</i>	Increased root biomass	NA	(Turjaman <i>et al.</i> 2006)
<i>Rhizophagus irregularis</i>	AM ^c	<i>Oryza sativa</i>	Increased lateral (large and fine) root number, increased primary root length so increased root biomass	NA	(Gutjahr <i>et al.</i> 2009)
<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Glomus mosseae</i>	AM ^c	<i>Prunus cerasifera</i>	Increased lateral root number, decreased lateral root length	NA	(Berta <i>et al.</i> 1995)
<i>Glomus</i> strain E3	AM ^c	<i>Allium porrum</i>	Increased adventitious and lateral root number, decreased primary root length	NA	(Berta <i>et al.</i> 1990)
<i>Glomus</i> strain E3, <i>Glomus caledonium</i>	AM ^c	<i>Populus deltoides</i> × <i>Populus trichocarpa</i>	Increased lateral root number and length	NA	(Hooker <i>et al.</i> 1992)
<i>Hebeloma cylindrosporium</i>	ECM ^d	<i>Pinus pinaster</i>	Increased lateral root number, root length and root biomass	Accumulation, signalling	(Tranvan <i>et al.</i> 2000)
<i>Laccaria bicolor</i>	ECM ^d	<i>Picea abies</i>	Increased adventitious root number and root length	Accumulation	(Karabaghli-Degron <i>et al.</i> 1998)
<i>Laccaria bicolor</i>	ECM ^d	<i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i>	Increased lateral roots	Synthesis, signalling, transport	(Rincon <i>et al.</i> 2003; Felten <i>et al.</i> 2009)
<i>Phialocephala fortinii</i>	Root-associated endophyte	<i>Pinus contorta</i> , <i>Rhododendron</i> spp.	Increased root biomass	NA	(Jumpponen <i>et al.</i> 1998)
<i>Phyllobacterium brassicacearum</i>	PGPR ^b	<i>Arabidopsis</i>	Increased lateral root length	Synthesis, signalling, transport	(Mantelin <i>et al.</i> 2006; Contesto <i>et al.</i> 2010)
<i>Phyllobacterium</i> sp. 29-15	PGPR ^b	<i>Brassica napus</i>	Increased lateral root number and length	NA	(Larcher <i>et al.</i> 2003)
<i>Piriformospora indica</i>	Root-associated endophyte	<i>Adhatoda visica</i>	Increased root biomass	NA	(Rai & Varma 2005)
<i>Piriformospora indica</i>	Root-associated endophyte	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Increased lateral root number, root biomass, root growth	Synthesis	(Sirrenberg <i>et al.</i> 2007)
<i>Pisolithus tinctorius</i> , <i>Paxillus involutus</i>	ECM ^d	<i>Pinus sylvestris</i>	Increased adventitious root number, primary root length and root biomass	Transport, accumulation	(Niemi <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PGPR ^b	<i>Arabidopsis</i>	Increased lateral roots, root biomass, root growth	Signalling	(Ortiz-Castro <i>et al.</i> 2011)
<i>Serratia marcescens</i>	PGPR ^b	<i>Arabidopsis</i>	Increased lateral root number, decreased primary root length	Signalling; ethylene, jasmonic acid, salicylic acid signalling	(Shi <i>et al.</i> 2010)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Nod factor	Nodule nitrogen fixing	<i>Medicago truncatula</i>	Increased lateral root	NA	(Olah <i>et al.</i> 2005)
<i>Trichoderma virens</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>	PGPF ^a	<i>Arabidopsis</i>	Increased lateral root number	Signalling, transport	(Contreras-Cornejo <i>et al.</i> 2009)
<i>Tuber borchii</i> , <i>Tuber melanosporum</i>	ECM ^d	<i>Cistus incanus</i>	Increased lateral root, decreased primary root length	Accumulation, signalling, ethylene accumulation, signalling	(Splivallo <i>et al.</i> 2009)

Description of phenotypic changes observed in beneficial associations with various classes of microorganisms. Information on species of the microorganisms, classification of microorganisms, host species name, the auxin pathways that are modified of the microorganisms in the plants, and corresponding references are provided.

^aPlant growth-promoting fungus. ^bPlant growth-promoting rhizobacterium. ^cArbuscular mycorrhizal fungus. ^dEctomycorrhizal fungus.

NA, not applicable.

Prunus spp. (Berta *et al.* 1990) while an increase of root length has been observed in *Populus* (Hooker *et al.* 1992). *Rhizophagus irregularis* (also referred as *Glomus intraradices*) stimulated the formation of fine and large lateral roots in *Oryza sativa* and *Zea mays* (Kaldorf & Ludwig-Muller 2000; Gutjahr *et al.* 2009), while *Glomus clarum* and *Gigaspora decipiens* enhanced root biomass in *Aquilaria filaria* and *Dyera polyphylla* (Turjaman *et al.* 2006). Ectomycorrhizal fungi also increased lateral root formation in plants, including but not limited to *Arabidopsis*, *Populus*, *Picea abies*, *Pinus* spp. and *Cistus incanatus* (Karabaghli-Degron *et al.* 1998; Tranvan *et al.* 2000; Niemi *et al.* 2002; Rincon *et al.* 2003; Felten *et al.* 2009). The characteristic phenotype observed in ectomycorrhiza is the presence of numerous short lateral roots, which in the case of gymnosperms are dichotomized (Kaska, Myllyla & Cooper 1999; Smith & Read 2008). Alternatively, *Tuber* spp. inhibited *Cistus incanatus* root growth (Splivallo *et al.* 2009). Studies analysing the modification of primary root growth in response to ectomycorrhizal fungi, *Laccaria bicolor* and *Hebeloma cylindrosporum*, found an increase of root growth in *Picea abies* and *Pinus pinaster* (Karabaghli-Degron *et al.* 1998; Tranvan *et al.* 2000). Moreover, *Pinus sylvestris* inoculated with *Laccaria bicolor* produced lateral roots faster than non-inoculated plants (Heller *et al.* 2012).

Root-associated endophytic fungi can also induce an increase in root biomass (Jumpponen, Mattson & Trappe 1998; Kageyama, Mandyam & Jumpponen 2008). *Piriformospora indica*, a root-associated endophytic fungus, increased root growth and branching in *Arabidopsis* (Sirrenberg *et al.* 2007) and increased root proliferation in *Adhatoda visica* (Rai & Varma 2005). These modifications in root architecture by microorganisms can enhance nutrient acquisition and tolerance to abiotic and biotic stress (Slankis 1973; Marschner & Dell 1994; Glick *et al.* 2007a). The aforementioned studies on root growth and development illustrate the distinct effects of different microorganisms on belowground plant structure. These collective reports of distinctive root phenotypes support the intriguing possibility of differential recruitment of plant-signalling pathways, such as auxin, by the associated microorganism.

MICROBIAL AUXIN AS A MEDIATOR OF HOST ROOT ARCHITECTURAL CHANGES

In soils, plants and microorganisms interact notably by exchanging chemical signals, and auxin is a key plant signal that regulates root architecture. Production of auxin by various microorganisms has been examined by several research groups in the last 80 years (Spaepen & Vanderleyden 2010). Several different plant growth-promoting bacteria have been shown to produce auxin and influence root development, plant growth and crop yield (Barazani & Friedman 1999; Patten & Glick 2002; Verma *et al.* 2010). In co-culture with the endophytic fungus *Piriformospora indica*, *Arabidopsis* root growth is stimulated prior to contact with the microorganism, indicating that there is an exchange of a diffusible factor (Sirrenberg *et al.* 2007). Although reports on auxin

levels in *Piriformospora indica* are variable (Sirrenberg *et al.* 2007; Vadassery *et al.* 2008), the contribution of auxin in the form of IAA as a diffusible communication signal between the two partners is plausible. Two ectomycorrhizal species, *Pisolithus tinctorius* and *Paxillus involutus*, have free and conjugated IAA in mycelium and culture media (Niemi *et al.* 2002). Other ectomycorrhiza, such as *Tuber* spp., have also been shown to produce auxin (Splivallo *et al.* 2009). IAA-overproducing mutant of *Hebeloma cylindrosporum* can form greater mycorrhizal associations than the wild-type strain in co-cultivation with *Pinus pinaster*, suggesting a direct role for auxin in establishing mycorrhizal associations (Tranvan *et al.* 2000). Production of auxin by diverse groups of microorganisms supports a role of auxin as a potential signal for communication with host plants.

In addition to the role of auxin as a molecular signal involved in communication with host plants, microbial auxin may have a role in interfering with developmental pathways and alter auxin biosynthesis or signalling in the host. This hypothesis implies that the microbial auxin is not only synthesized and secreted, but it also enters host root cells in sufficient quantities as to alter normal plant growth and development. Support of this hypothesis would require an involvement of endogenous auxin transport and perception in host.

Several studies have examined net changes in auxin levels, a result of biosynthesis, conjugation and degradation of auxin, during association with beneficial microorganisms. Sirrenberg *et al.* (2007) have noted that the phenotype obtained as a result of interactions with *Piriformospora indica* is mimicked by an external application of IAA, at a concentration lower than produced by the fungus, suggesting a role for exogenous auxin (Sirrenberg *et al.* 2007). In a similar manner, *Arabidopsis* IAA-overproducing mutant *sur1* is rescued through *Piriformospora indica* colonization, possibly through microorganism-induced reduction in IAA levels via auxin conjugation (Vadassery *et al.* 2008). Interestingly, colonization studies in *Hordeum vulgare* with a *Piriformospora indica* mutant reduced in *piTam1* (a key gene in tryptophan-to-IAA conversion) expression suggested that microbial IAA may be important for establishment of symbiosis but not elicitation of growth promotion in host (Hilbert *et al.* 2012). Treatment with filtrates from *Pisolithus tinctorius* and *Paxillus involutus* cultures reduced the IAA concentrations in *Pinus sylvestris* hypocotyls (Niemi *et al.* 2002). Reduction in IAA levels was displayed by roots of *Arabidopsis* inoculated with *Phyllobacterium brassicacearum* (Contesto *et al.* 2010). Changes in IAA levels either due to genetic changes or chemical applications increased colonization and formation of ectomycorrhizal associations (Gay *et al.* 1994; Herrmann, Oelmüller & Buscot 2004). Endogenous levels of IAA, indole-3-butyric acid (IBA) and phenyl acetic acid (PAA) in *Tropaeolum* dynamically changed during various stages of arbuscular mycorrhizal association when infected with *Rhizophagus irregularis* (Jentschel *et al.* 2007). In *Zea mays*, *Glomus intraradices* caused an increase in endogenous-free IBA (Kaldorf & Ludwig-Muller 2000) and conjugated IBA content (Fitze *et al.* 2005). These results demonstrate that microbial auxin likely, directly or indirectly, modulates host auxin homeostasis, that is, auxin

synthesis, degradation and conjugation. It is also plausible that auxin pathways have important signalling roles to play both during and after establishing of beneficial plant–microbe relationships. Additional experiments designed to quantify the movement and effects of microbial auxins on endogenous auxin pathways are needed to define a more precise role of auxin as a signal that can alter root development during the initial signalling and communication phase before the establishment of microbial association and/or as a consequence of an established plant–microbe relationship.

ROLES OF HOST AUXIN SYNTHESIS, TRANSPORT AND SIGNALLING IN MODULATING ROOT ARCHITECTURE

As noted earlier, changes in auxin homeostasis resulting from plant–microbe interactions can be achieved through synthesis, conjugation, degradation, transport and signalling of auxin (Fig. 1). Table 2 summarizes a list of gene and mutant annotations related to auxin pathways discussed in this review; the roles of genes in auxin biosynthesis, transport and signalling are presented later.

Auxin biosynthesis and conjugation

Volatile organic compounds released by *Bacillus subtilis* enhanced the expression of enzymes in auxin biosynthesis pathways in *Arabidopsis*, supporting the effect of volatiles in modulating auxin homeostasis (Zhang *et al.* 2007). Inoculation with *Phyllobacterium brassicacearum* strain STM196 stimulated the expression of several auxin biosynthesis pathway enzymes in *Arabidopsis* shoots with a potential redistribution of auxin into roots (Contesto *et al.* 2010). Transcripts corresponding to *GH3* genes involved in IAA conjugation, *PtaGH3-1*, *PtaGH3-2*, *PtaGH3-7* and *PtaGH3-8*, were induced in *Populus* with *Laccaria bicolor* co-culture (Felten *et al.* 2009). Alternatively, *GH3* transcript levels were reduced in *Pinus sylvestris* inoculated with *Laccaria bicolor* (Heller *et al.* 2012). Inoculation of *Pinus pinaster* with fungal strains of wild-type and IAA-overproducing mutant of *Hebeloma cylindrosporum* lowered the transcript levels of *PpGH3-16* compared with non-inoculated controls. This change could not be detected when inoculated with a non-mycorrhizal fungus, suggesting that the down-regulation of *PpGH3-16* is specifically associated with ectomycorrhizal associations (Reddy *et al.* 2006).

The importance of modulation of auxin levels and sensitivity during plant–microbe interactions can be inferred from the previously mentioned studies. However, the involvement of auxin at various phases of microbial association directing the physiological changes in root architecture is unknown and would greatly benefit from a spatiotemporal resolution at the cellular level.

Auxin transport

Treatment with auxin transport inhibitors can reduce the effect of microorganism inoculations on root growth modifications, changes in auxin levels or synthesis and/or mycorrhizal colonization (Niemi *et al.* 2002; Rincon *et al.* 2003; Fitze *et al.* 2005; Felten *et al.* 2009). Auxin transport inhibitor treatment blocked auxin accumulation at sites of synthesis in shoots of *Arabidopsis* inoculated with *Bacillus subtilis*, suppressed the levels of auxin in roots and reduced the growth-promoting effects on host (Zhang *et al.* 2007). Consistently, transcript levels of a putative auxin efflux gene were reported to be down-regulated in roots of *Arabidopsis* exposed with volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* (Zhang *et al.* 2007). The effect of *Phyllobacterium brassicacearum* strain STM196 on increasing lateral root length was lost in auxin transport mutant *aux1-100* in *Arabidopsis* (Contesto *et al.* 2010). *Arabidopsis* auxin transport protein mutants *aux1-7*, *doc1* and *pin2*, when inoculated with *Trichoderma virens*, have reduced growth compared with wild-type plants (Contreras-Cornejo *et al.* 2009). *Solanum lycopersicum* auxin transport mutant polycotyledon (*pct*) displays delayed and reduced colonization when inoculated with *Rhizophagus irregularis* (Hanlon & Coenen 2010). Auxin influx and efflux transport genes in *Populus* are transiently induced under *Laccaria bicolor* co-culture (Felten *et al.* 2009). In *Arabidopsis*, under co-culture with *Laccaria bicolor*, *aux1* and *pin3* exhibited similar induction of lateral root while less stimulation was observed in the *pin2* and *pin2,3,4,7* mutant lines (Felten *et al.* 2009). These aforementioned results provide variable evidence that auxin transport machinery is involved during plant–microbe interactions.

Auxin signalling

Studies using host reporter lines, that is, the auxin-responsive promoter *DR5:GUS* lines, have provided insight indirectly

Table 2. Description of gene/mutant symbols discussed in the review

Gene/mutant symbol	Expanded nomenclature/Function	Organism
<i>AUX1</i>	Auxin influx	<i>Arabidopsis</i>
<i>AXR</i>	Auxin resistant, auxin signalling	<i>Arabidopsis</i>
<i>doc1</i>	Dark overexpression of CAB, allele of BIG, necessary for auxin transport localization	<i>Arabidopsis</i>
<i>GH3</i>	IAA conjugation	<i>Arabidopsis</i> , <i>Populus</i> , <i>Pinus pinaster</i>
<i>IAA/AUX</i>	Auxin signalling	<i>Arabidopsis</i> , <i>Populus</i> , <i>Pinus pinaster</i>
<i>pct</i>	Polycotyledon, has enhanced auxin movement	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>PIN</i>	Pin-formed, auxin efflux	<i>Arabidopsis</i> , <i>Populus</i>
<i>sur1</i>	Superroot, auxin-overproducing mutant	<i>Arabidopsis</i>

into changes of auxin levels, signalling or response during plant–microbe interaction. *Bacillus subtilis* enhanced the expression of *DR5::GUS* in the roots of *Arabidopsis* (Zhang *et al.* 2007). Similarly, *Phyllobacterium brassicacearum* strain *STM196* induced the expression of *DR5::GUS* in *Arabidopsis* primary as well as lateral root tips (Contesto *et al.* 2010). *Laccaria bicolor* co-culture enhanced the expression of auxin-inducible reporter in lateral root apices of *Populus* and *Arabidopsis* compared with non-inoculated control (Felten *et al.* 2009). Inoculation of *Arabidopsis* with *Trichoderma virens* induced *DR5::uidA* expression in primary root tips (Contreras-Cornejo *et al.* 2009).

The use of auxin-signalling mutants and gene expression profile studies have shed light on components of auxin signalling involved in microbe-induced root architectural changes. In *Arabidopsis axr1-3* mutant, defective in auxin-signalling, growth responses to *Trichoderma virens* and *Phyllobacterium brassicacearum* inoculation are reduced (Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Contesto *et al.* 2010). Transcript analysis revealed that *Phyllobacterium brassicacearum* inoculation reduced expression levels of *TIR1* and *IAA17* genes in *Arabidopsis* roots (Contesto *et al.* 2010). Diketopiperazines, auxin-like small molecules produced by *Pseudomonas aeruginosa*, were reported to modulate root architecture via auxin signalling involving receptor F-box proteins, ARF7 and ARF19 (Ortiz-Castro *et al.* 2011). In *Populus*, auxin-responsive transcription factors of the *Aux/IAA* family were transiently induced during *Laccaria bicolor* co-culture (Felten *et al.* 2009). In *Pinus sylvestris*, *Laccaria bicolor* modulated the expression of *iaa88* gene dynamically (Heller *et al.* 2012). This change in *iaa88* is similar to changes observed in *Pinus pinaster* during mycorrhizal formation by *Hebeloma cylindrosporum* (Charvet-Candela *et al.* 2002). Inoculation with *Piriformospora indica* rescued the IAA overproduction in *sur1* mutant and caused the reduction of expression of *IAA6* in *Arabidopsis* (Vadassery *et al.* 2008). The variable responses of the alternate auxin transport and signalling mutants during association with different microorganisms suggest that the components of auxin pathways used by these microorganisms vary among host–microbe combinations.

SIGNALLING CROSSTALK THAT MODIFIES AUXIN-SIGNALLING PATHWAYS IN HOST

While the role of auxin signal transduction in plant–microbe interactions is becoming increasingly clear, evidence is also mounting for the involvement of other plant hormones, metabolites and volatile compounds through crosstalk with auxin during plant–microbe interactions. Plant hormones such as cytokinin, strigolactone, jasmonate, salicylic acid and gibberellins are potential candidates involved in regulation of host microbial associations in concert with or independent of auxin (Slankis 1973; Shi *et al.* 2010; Xie, Yoneyama & Yoneyama 2010), and are known to regulate root physiology, growth, and lateral root formation (Aloni *et al.* 2006; Fukaki & Tasaka 2009). *Pseudomonas aeruginosa* produces small molecules called diketopiperazines under the control of quorum-sensing system that has auxin-like activity

(Ortiz-Castro *et al.* 2011). The effect of co-culture of *Tuber* spp. with *Arabidopsis* on primary root growth and root branching is mimicked by low IAA doses, while the effect on root hair elongation can only be mimicked by a combined dose of IAA and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), a precursor of ethylene (Splivallo *et al.* 2009). Furthermore, *Arabidopsis* double mutants, defective in ethylene sensitivity and auxin transport, have significantly lower root growth when co-cultured with various *Tuber* spp. The authors also report that the enhanced expression of auxin-induced reporter *DR5::GFP* in *Arabidopsis* under co-culture with *Tuber* spp. can be mimicked by ACC alone or a combination of ACC and IAA (Splivallo *et al.* 2009).

As mentioned previously, volatiles released by *Bacillus subtilis* can manipulate auxin biosynthesis, transport and signalling leading to changes in root formation in *Arabidopsis* (Zhang *et al.* 2007). *N*-acyl homoserine lactone (AHL), secreted by certain bacteria, and a known quorum-sensing compound, enhanced accumulation of auxin in root and shoot tissues (Mathesius *et al.* 2003; von Rad *et al.* 2008). Among other compounds, flavonoids [shown to regulate auxin transport (Buer, Imin & Djordjevic 2010)] are also widely known to be involved in the establishment of mycorrhizal association and root colonization (Hassan & Mathesius 2012). Specifically, rutin and quercetin, two flavonoids in root exudates, induced the expression of the effector small protein, MiSSP7, during *Laccaria bicolor* symbiosis with *Populus* (Plett & Martin 2012). In *Eucalyptus globulus*, combined application of IAA and hypaphorine, an indole alkaloid produced by *Pisolithus tinctorius*, counteracted the inhibition of primary root growth caused by IAA application (Ditengou & Lapeyrie 2000). 2,4-Diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas fluorescens* can alter root development in *Solanum persicum*, in an auxin-signalling-dependent manner (Brazelton *et al.* 2008). The current evidence suggests existence of multiple layers of regulation involving hormones, metabolites and other biomolecules during plant–microbe interactions. However, the extent of redundancy and the existence of alternate pathways that elicit similar responses in the host upon contact or colonization with beneficial microorganism remain poorly defined.

OVERVIEW AND CONCLUDING REMARKS

The present review summarizes multiple lines of evidence supporting the role of auxin biosynthesis, transport, and signalling in modulating root growth and architecture in response to beneficial interactions with microorganisms. There is an appreciable amount of literature on physiological effects on host plant growth and development during specific microbial association, with limited explanation on underlying molecular mechanisms. In summary, there is compelling physiology and functional genomics-based evidence in support of components of auxin biosynthesis, transport, and signal transduction in modulating effects of beneficial responses within the host (Table 1). A hypothetical and simplified model on how distinctive root architectural changes may be brought about by microorganisms through modulation of network of

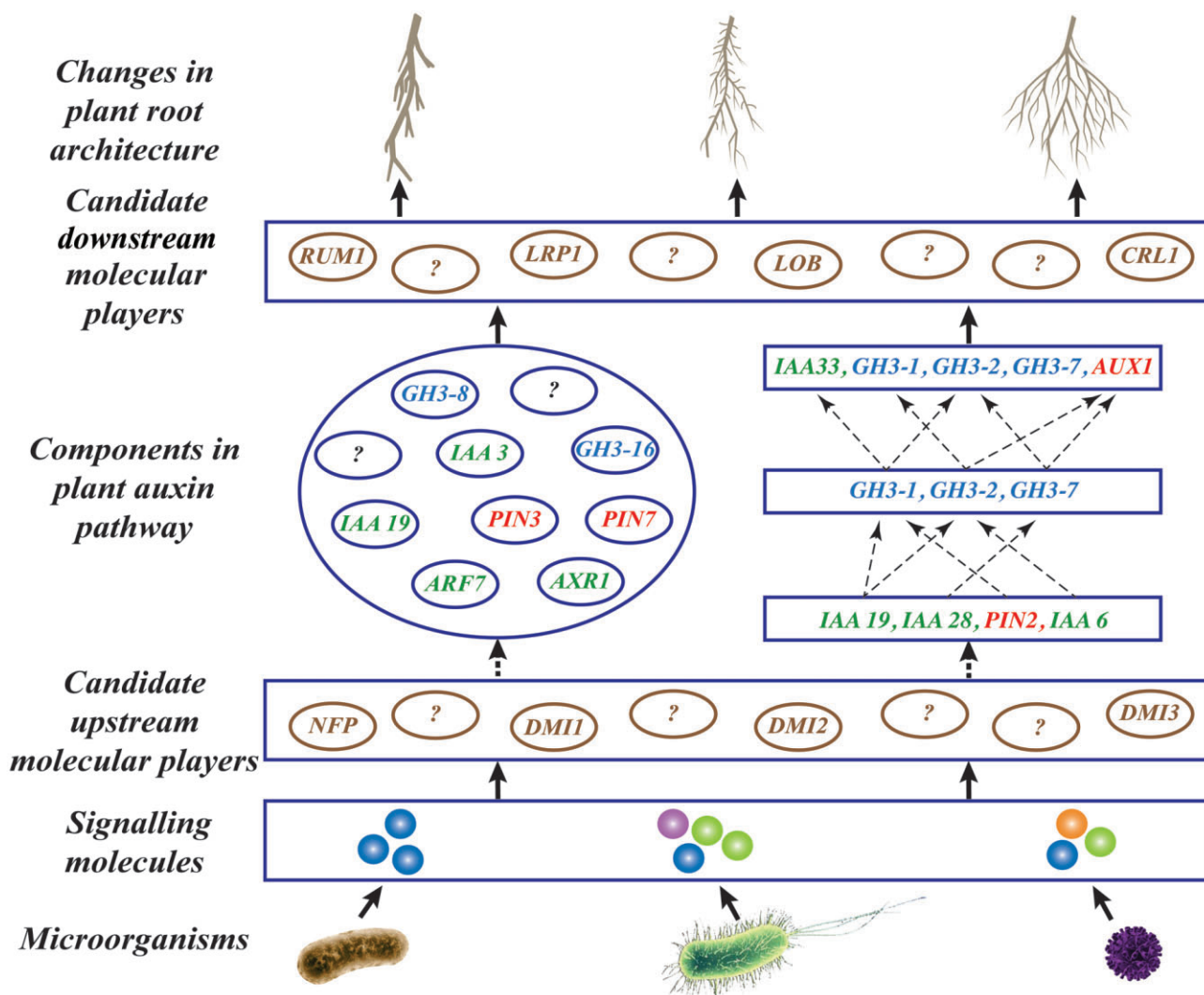


Figure 2. Schematic representation of auxin synthesis, transport and signalling components associated with root architectural changes. Hypothetical and simplified model on the variability of recruitment of auxin signalling, transport and synthesis components for root modifications as a result of distinct beneficial plant–microbe interactions with various microorganisms is shown above. Different microorganisms could modulate multiple or unique components/proteins of auxin synthesis, transport and/or signalling to induce a particular root architectural change. The modulation of a certain component/protein may be distinctive or common between different microorganisms but the network with the combination of all the components/proteins could always be unique to host/microorganisms and associated root growth changes. Depicted in this model are: (1) microorganisms: different shapes represent diversity; (2) signalling molecules: solid blue circles represent auxin; orange, green and purple represent other potential signalling molecules such as flavonoids, other plant hormones, volatiles and proteins; (3) candidate upstream molecular players: potential proteins that are involved in modifying root architecture, doesn't make infections (DMIs) are involved in nodulation and mycorrhiza formation, Nod factor perception (NFP) involved in Nod factor signal transduction (Olah *et al.* 2005); (4) components in plant auxin pathway: PINs and AUX1 are auxin transport proteins, IAAs and ARFs are involved in auxin signalling, GH3s are involved in auxin conjugation, proteins in circles are temporally unresolved, proteins in boxes are temporally resolved, described in literature (Vadassery *et al.* 2008; Felten *et al.* 2009), dotted arrows represent potential network associations; (5) candidate downstream molecular players: potential proteins that regulate root architectural changes, crown rootless (CRL1), lateral organ boundaries (LOBs), lateral root primordium 1 (LRP1), rootless with undetectable meristem 1 (RUM1) (Okushima *et al.* 2005; Smith & De Smet 2012), the question marks represent unknown downstream factors; and (6) changes in plant root architecture: various root architectural changes resulting from use of differential auxin networks by different microorganisms.

auxin biosynthesis, transport and signalling proteins is presented in Fig. 2.

While the current review presents a compelling supportive role for involvement of auxin pathways in beneficial plant–microbe interactions, it remains unknown whether auxin is a direct or indirect signalling molecule, which results in the

characteristic phenotypic changes. It is plausible that auxin pathways have a role to play during the initial signalling and communication phase prior to establishing beneficial plant–microbe relationships, as well as in enabling the phenotypic changes that are a functional outcome of an established relationship. Temporally resolved experiments involving

co-cultures with auxin mutant plants, application of external auxins and auxin inhibitors, and examination of mutant phenotype rescue are needed to clarify whether the observed changes are the consequence of the adaptations of plant to support microbes or part of the signal exchange between plant and microbes that leads to phenotypic changes. Radioactive tracer studies could shed light on the movement of microbial auxin into host plant cells and differentiate the direct and indirect changes caused at the cellular levels. It is also unclear as to whether the microbial auxin could be produced as a signal for individual microbes, or for microbial communities and under what environmental and host-specific circumstances the functional outcomes change. Therefore, temporally resolved molecular monitoring or visualization would provide a clearer view of upstream and downstream events involved in the complex signal transduction process.

Most inferences drawn in this review are based on reports involving simplified binary experiments. Although there are similarities in components of auxin pathways involved in distinct types of beneficial host–microbe interactions, for example, the presence of GH3 and PIN transport factors, the sum total of evidence remains insufficient to draw conclusive inferences in support of a universal species-level or a more broad plant-level involvement of auxin pathways. The delicate and precise orchestration of distinct phenotypic effects achieved via a shared auxin biosynthesis and signalling machinery involving signalling crosstalk is fascinating. Additional studies that are designed to quantify and correlate changes in gene expression at transcript and protein levels, dynamics and flux in auxin levels, and phenotypic changes at the cellular, tissue and plant levels will be needed to clarify plant responses to beneficial microorganisms.

Some of the scientific challenges posed earlier highlight the associated technological and computational challenges. Such challenges include ability to: (1) detect, analyse and recreate a more realistic plant microbiome; (2) conduct single-cell genomics and *in situ* measurements; and (3) continuously monitor and visualize the dynamic molecular interaction that occurs between plants and microbes. Current human microbiome studies leverage next-generation sequencing technologies to address some of the challenges (Lepage *et al.* 2012; Siqueira, Fouad & Rocas 2012). Here, the metagenomics, metatranscriptomics and associated bioinformatics approaches are providing a richer picture of the microbiome (Hyman *et al.* 2012; Kuczynski *et al.* 2012). Analogous efforts to study plant–microbial systems in native conditions are needed and will provide new insights into the rhizosphere dynamics and outcomes at the plant and the ecosystem levels.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported and performed as part of a Plant-Microbe Interface SFA project sponsored by the Office of Biological and Environmental Research in the U.S. Department of Energy Office of Science and the European Commission within the Project ENERGYOPLAR (FP7-211917) and the Région Lorraine. ORNL is managed by UT-Battelle, LLC, under contract DE-AC05-00OR22725 for

the U.S. Department of Energy. A.V., V.L. and F.M. are part of the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12-LABX-0002-ARBRE). We are grateful to Drs Jay Chen, Jessy Labbe, Aurélie Deveau and Claire Venault-Fourrey for their comments on this manuscript. The authors have no conflict of interest.

REFERENCES

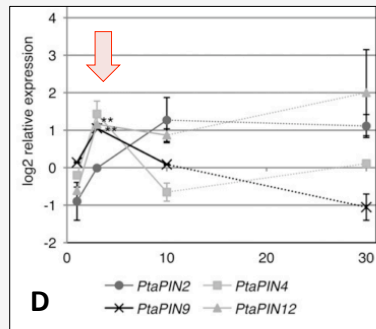
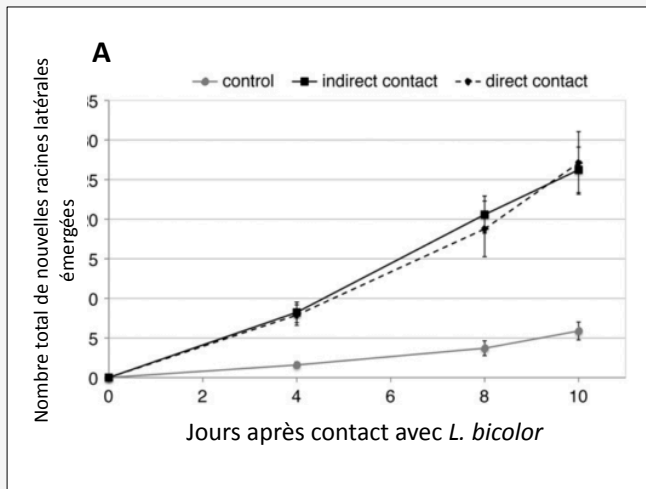
- Aloni R., Aloni E., Langhans M. & Ullrich C.I. (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* **97**, 883–893.
- Badri D.V. & Vivanco J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* **32**, 666–681.
- Barazani O. & Friedman J. (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* **25**, 2397–2406.
- Barrow J.R. & Osuna P. (2002) Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Journal of Arid Environments* **51**, 449–459.
- Berta G., Fusconi A., Trotta A. & Scannerini S. (1990) Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root-system of *Allium porrum* L. *New Phytologist* **114**, 207–215.
- Berta G., Trotta A., Fusconi A., *et al.* (1995) Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant-growth and root-system morphology in *Prunus cerasifera* (vol 15, pg 281, 1995). *Tree Physiology* **15**, 557–557.
- Brazelton J.N., Pfeufer E.E., Sweat T.A., Gardener B.B.M. & Coenen C. (2008) 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 1349–1358.
- Buer C.S., Imin N. & Djordjevic M.A. (2010) Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 98–111.
- Camehl I., Sherameti I., Venus Y., Bethke G., Varma A., Lee J. & Oelmüller R. (2010) Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **185**, 1062–1073.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H.M., Casero P., Sandberg G. & Bennett M.J. (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* **8**, 165–171.
- Charvet-Candela V., Hitchin S., Ernst D., Sandermann H., Marmeisse R. & Gay G. (2002) Characterization of an Aux/IAA cDNA upregulated in *Pinus pinaster* roots in response to colonization by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytologist* **154**, 769–777.
- Citernesi A.S., Vitagliano C. & Giovannetti M. (1998) Plant growth and root system morphology of *Olea europaea* L. Rooted cuttings as influenced by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **73**, 647–654.
- Contesto C., Milesi S., Mantelin S., Zancarani A., Desbrosses G., Varoquaux F., Bellini C., Kowalczyk M. & Touraine B. (2010) The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* **232**, 1455–1470.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortes-Penagos C. & Lopez-Bucio J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**, 1579–1592.
- De Smet I. (2012) Lateral root initiation: one step at a time. *The New Phytologist* **193**, 867–873.
- Ditengou F.A. & 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 151–158.
- Ditengou F.A., 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.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Vande Broeck A. & Vanderleyden J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* **212**, 155–164.
- Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivanchenko M.G., Friml J., Shishkova S., Celenza J. & Benková E. (2008) Auxin acts as a local

- morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8790–8794.
- Felten J., Kohler A., Morin E., Bhalerao R.P., Palme K., Martin F., Ditegou F.A. & Legue V. (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiology* **151**, 1991–2005.
- Fitze D., Wiegning A., Kaldorf M. & Ludwig-Muller J. (2005) Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *Journal of Plant Physiology* **162**, 1210–1219.
- Fukaki H. & Tasaka M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology* **69**, 437–449.
- Gay G., Normand L., Marmeisse R., Sotta B. & Debaud J.C. (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytologist* **128**, 645–657.
- Glick B.R., Cheng Z., Czarny J. & Duan J. (2007a) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* **119**, 329–339.
- Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z.Y., Duan J. & McConkey B. (2007b) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**, 227–242.
- Grunewald W., van Noorden G., van Isterdael G., Beeckman T., Gheysen G. & Mathesius U. (2009) Manipulation of auxin transport in plant roots during rhizobium symbiosis and nematode parasitism. *The Plant Cell* **21**, 2553–2562.
- Gutjahr C., Casieri L. & Paszkowski U. (2009) *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *The New Phytologist* **182**, 829–837.
- Hanlon M.T. & Coenen C. (2010) Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation. *The New Phytologist* **189**, 701–709.
- Hassan S. & Mathesius U. (2012) The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3429–3444.
- Heller G., Lunden K., Finlay R.D., Asiegbu F.O. & Elfstrand M. (2012) Expression analysis of Clavatal-like and Nodulin21-like genes from *Pinus sylvestris* during ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* **22**, 271–277.
- Herrmann S., Oelmüller R. & Buscot F. (2004) Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* **161**, 509–517.
- Hilbert M., Voll L.M., Ding Y., Hofmann J., Sharma M. & Zuccaro A. (2012) Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytologist* **196**, 520–534.
- Hirsch A.M., Fang Y., Asad S. & Kapulnik Y. (1997) The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant and Soil* **194**, 171–184.
- Hooker J.E., Munro M. & Atkinson D. (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi induced alteration in poplar root-system morphology. *Plant and Soil* **145**, 207–214.
- Hyman R.W., St Onge R.P., Kim H., Tamareis J.S., Miranda M., Aparicio A.M., Fukushima M., Pourmand N., Giudice L.C. & Davis R.W. (2012) Molecular probe technology detects bacteria without culture. *BMC Microbiology* **12**, 29.
- Jentschel K., Thiel D., Rehn F. & Ludwig-Muller J. (2007) Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. *Physiologia Plantarum* **129**, 320–333.
- Johnson D., Martin F., Cairney J.W. & Anderson I.C. (2012) The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *The New Phytologist* **194**, 614–628.
- Jumpponen A., Mattson K.G. & Trappe J.M. (1998) Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* **7**, 261–265.
- Kageyama S.A., Mandyam K.G. & Jumpponen A. (2008) *Diversity, Function and Potential Applications of the Root-Associated Endophytes*, 3rd edn, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kaldorf M. & Ludwig-Muller J. (2000) AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **109**, 58–67.
- Kalluri U., Basu M., Jawdy S. & Tuskan G. (2011) Auxin signaling and response mechanisms and roles in plant growth and development. In *Genetics, Genomics and Breeding of Poplar* (eds C.P. Joshi, S.P. Difazio & C. Kole), pp. 231–254. Science Publishers, Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kalluri U.C., Difazio S.P., Brunner A.M. & Tuskan G.A. (2007) Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* **7**, 59.
- Karabaghli-Degron C., Sotta B., Bonnet M., Gay G. & Le Tacon F. (1998) The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *The New Phytologist* **140**, 723–733.
- Kaska D.D., Myllylä R. & Cooper J.B. (1999) Auxin transport inhibitors act through ethylene to regulate dichotomous branching of lateral root meristems in pine. *The New Phytologist* **142**, 49–58.
- Kuczynski J., Lauber C.L., Walters W.A., Parfrey L.W., Clemente J.C., Gevers D. & Knight R. (2012) Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics* **13**, 47–58.
- Larcher M., Muller B., Mantelin S., Rapior S. & Cleyet-Marel J.C. (2003) Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting Phyllobacterium strain. *The New Phytologist* **160**, 119–125.
- Lepage P., Leclerc M.C., Joossens M., Mondot S., Blottiere H.M., Raes J., Ehrlich D. & Dore J. (2012) A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2011-301805 [Epub ahead of print].
- Lopez-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernandez-Calderon E., Velasquez-Becerra C., Farias-Rodriguez R., Macias-Rodriguez L.I. & Valencia-Cantero E. (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 207–217.
- Macdougall D.T. & Dufrenoy J. (1944) Mycorrhizal symbiosis in *Aplectrum*, *Corallorhiza* and *Pinus*. *Plant Physiology* **19**, 440–465.
- Malamy J.E. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment* **28**, 67–77.
- Malamy J.E. & Benfey P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33–44.
- Mantelin S., Desbrosses G., Larcher M., Tranbarger T.J., Cleyet-Marel J.C. & Touraine B. (2006) Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting Phyllobacterium sp. *Planta* **223**, 591–603.
- Marschner H. & Dell B. (1994) Nutrient-uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**, 89–102.
- Mathesius U., Mulders S., Gao M.S., Teplitski M., Caetano-Anolles G., Rolfe B.G. & Bauer W.D. (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 1444–1449.
- Morgan J.A.W., Bending G.D. & White P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1729–1739.
- Niemi K., Vuorinen T., Ernstsén A. & Haggman H. (2002) Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. *Tree Physiology* **22**, 1231–1239.
- Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., et al. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell* **17**, 444–463.
- Olah B., Briere C., Becard G., Denarie J. & Gough C. (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* **44**, 195–207.
- Oldroyd G.E.D. & Downie J.M. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 519–546.
- Orfanoudakis M., Wheeler C.T. & Hooker J.E. (2010) Both the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* and *Frankia* increase root system branching and reduce root hair frequency in *Alnus glutinosa*. *Mycorrhiza* **20**, 117–126.
- Ortiz-Castro R., Diaz-Perez C., Martinez-Trujillo M., del Rio R.E., Campos-Garcia J. & Lopez-Bucio J. (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 7253–7258.
- Overvoorde P., Fukaki H. & Beeckman T. (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a001537. doi:10.1101/cshperspect.a001537.

- Patten C.L. & Glick B.R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3795–3801.
- Peret B., De Rybel B., Casimiro I., Benkova E., Swarup R., Laplace L., Beeckman T. & Bennett M.J. (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**, 399–408.
- Plett J.M. & Martin F. (2012) Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant Signal Behav* **7**, 12–15.
- Plett J.M., Kempainen M., Kale S.D., Kohler A., Legue V., Brun A., Tyler B.M., Pardo A.G. & Martin F. (2011) A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* **21**, 1197–1203.
- von Rad U., Klein I., Dobrev P.I., Kottova J., Zazimalova E., Fekete A., Hartmann A., Schmitt-Kopplin P. & Durner J. (2008) Response of Arabidopsis thaliana to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* **229**, 73–85.
- Rai M. & Varma A. (2005) Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica* Nees. *Electronic Journal of Biotechnology* **8**, 107–112.
- Reddy S.M., Hitchin S., Melayah D., Pandey A.K., Raffier C., Henderson J., Marmeisse R. & Gay G. (2006) The auxin-inducible GH3 homologue Pp-GH3.16 is downregulated in *Pinus pinaster* root systems on ectomycorrhizal symbiosis establishment. *The New Phytologist* **170**, 391–400.
- 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.
- Salas-Marina M.A., Silva-Flores M.A., Cervantes-Badillo M.G., Rosales-Saavedra M.T., Islas-Osuna M.A. & Casas-Flores S. (2011) The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in Arabidopsis thaliana. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**, 686–696.
- Shi C.L., Park H.B., Lee J.S., Ryu S. & Ryu C.M. (2010) Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in Arabidopsis thaliana by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90-166 is through both auxin-dependent and -independent signaling pathways. *Molecules and Cells* **29**, 251–258.
- Siqueira J.F. Jr, Fouad A.F. & Rocas I.N. (2012) Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology* **4**, 10743. doi:10.3402/jom.v4i0.10743.
- Sirrenberg A., Goebel C., Grond S., Czempinski N., Ratzinger A., Karlovsky P., Santos P., Feussner I. & Pawlowski K. (2007) *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* **131**, 581–589.
- Slankis V. (ed.) (1973) *Hormonal Relationships in Mycorrhiza*. Academic Press, New York, USA.
- Slankis V. (1974) Soil factors influencing formation of mycorrhizae. *Annual Review of Phytopathology* **12**, 437–456.
- Smith S. & De Smet I. (2012) Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **367**, 1441–1452.
- Smith S.E. & Read D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn, Academic Press, London, UK.
- Spaepen S. & Vanderleyden J. (2010) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, pii: a001438. doi:10.1101/cshperspect.a001438.
- Splivallo R., Fischer U., Gobel C., Feussner I. & Karlovsky P. (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiology* **150**, 2018–2029.
- Sun J.H., Cardoza V., Mitchell D.M., Bright L., Oldroyd G. & Harris J.M. (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *The Plant Journal* **46**, 961–970.
- Teale W.D., Paponov I.A. & Palme K. (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 847–859.
- Tisserant B., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. (1996) Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. *Canadian Journal of Botany. Journal Canadien de Botanique* **74**, 1947–1955.
- 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 Physiology* **20**, 123–129.
- Turjaman M., Tamai Y., Santoso E., Osaki M. & Tawaraya K. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi increased early growth of two nontimber forest product species *Dyera polyphylla* and *Aquilaria filaria* under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* **16**, 459–464.
- Vadassery J., Ritter C., Venus Y., Camehl I., Varma A., Shahollari B., Novak O., Strnad M., Ludwig-Muller J. & Oelmuller R. (2008) The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between Arabidopsis and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 1371–1383.
- Verma J.P., Yadav J., Tiwari K.N., Lavakush & Singh V. (2010) Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop improvement. *International Journal of Agricultural Research* **5**, 954–983.
- Woodward A.W. & Bartel B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707–735.
- Xie X.N., Yoneyama K. & Yoneyama K. (2010) The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 93–117.
- Yano K., Yamauchi A. & Kono Y. (1996) Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **6**, 409–415.
- Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., et al. (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. *Planta* **226**, 839–851.
- Zhao Y.D. (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 49–64.

Received 24 July 2012; received in revised form 26 October 2012; accepted for publication 31 October 2012

Encadré 5: Implication du transport polarisé de l'auxine dans la formation des RLs en réponse à *L. bicolor* (Felten *et al.*, 2009)



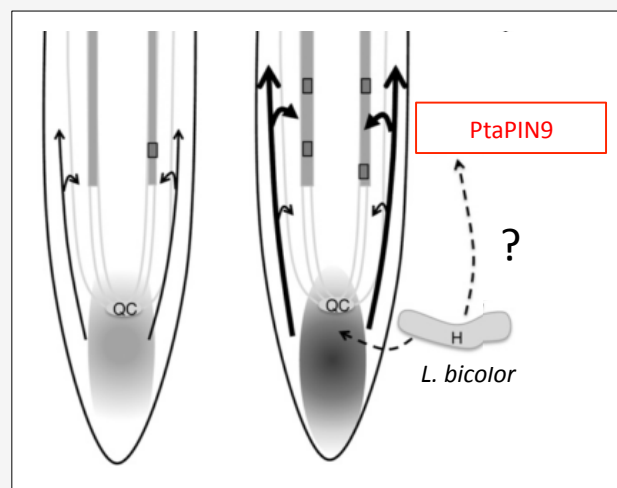
A ; Stimulation de la formation des RLs en réponse à *L. bicolor*. Observation du nombre de nouvelles RLs émergées en réponse à *L. bicolor* en condition témoin (control ; trait gris) , de contact indirect (séparés par une membrane de cellophane; trait noir) ou direct (trait en pointillés) avec *L. bicolor*.

B et C ; Activation de cellules fondatrices des RLs dans la racine principale d'*A. thaliana* en réponse à *L. bicolor*. Observation de la lignées DR5::GUS d'*A. thaliana* en condition contrôle, en absence de *L. bicolor* (B) et en contact indirect avec *L. bicolor* (C). Notez la présence de cellules qui répondent à l'auxine dans le cylindre central de la zone de transition, en contact *L. bicolor* (flèches noir).

D; Niveau d'expression des gènes de membres de la famille des PtaPINs dans les racines de peuplier (*P. tremula* x *P. alba*) en réponse à *L. bicolor* à 1, 3 et 10 jours de contact indirect et 30 jours de contact direct avec *L. bicolor*. Les gènes *PtaPIN9*, *PtaPIN12*, sont différenciellement exprimés, transitoirement, à 3 jours de contact avec *L. bicolor* (flèche rouge).

Modèle hypothétique de l'activation des cellules fondatrices des RLs dans la zone de transition de la racine de peuplier en réponse à *L. bicolor*

Une stimulation du nombre de nouvelles RLs émergées dans la racine de peuplier est observée en réponse à *L. bicolor* (Figures A; Felten *et al.*, 2009). L'observation des lignées d'*A. thaliana* DR5::GUS suggère une augmentation du nombre des cellules fondatrices dans la zone de transition de la racine en réponse au champignon (Figures B et C ; Felten *et al.*, 2009). Ce résultat couplé à l'analyse de l'expression des gènes des familles des PtaPIN (Figures D et E), a permis à Felten et ses collaborateurs de proposer un modèle hypothétique de l'activation des cellules fondatrices. Ce modèle propose qu'un signal volatil du champignon est capable d'induire une accumulation de l'auxine à l'apex racinaire, et une augmentation du transport polarisé de l'auxine, via PtaPIN9 (orthologue à AtPIN2) dans la coiffe latérale et l'épiderme de la racine. Ce transport d'auxine, dans la zone de transition, redirigé vers le cylindre central, induirait l'activation de cellules fondatrices dans le péricycle (Felten *et al.*, 2009).



En conclusion, certains microorganismes du sol en interactions bénéfiques avec les racines des plantes produisent de l'auxine. Cette molécule contrôlerait les modifications de l'architecture racinaire observées *via* la signalisation, le transport et le métabolisme de l'auxine de la plante hôte.

L'[encadré 5](#) résume les résultats obtenus dans notre modèle d'étude peuplier-*L. bicolor*, concernant l'impact du transport polarisé de l'auxine et d'un acteur particulier, PtaPIN9, dans la stimulation de la formation des RLs en réponse à *L. bicolor* (Felten *et al.*, 2009).

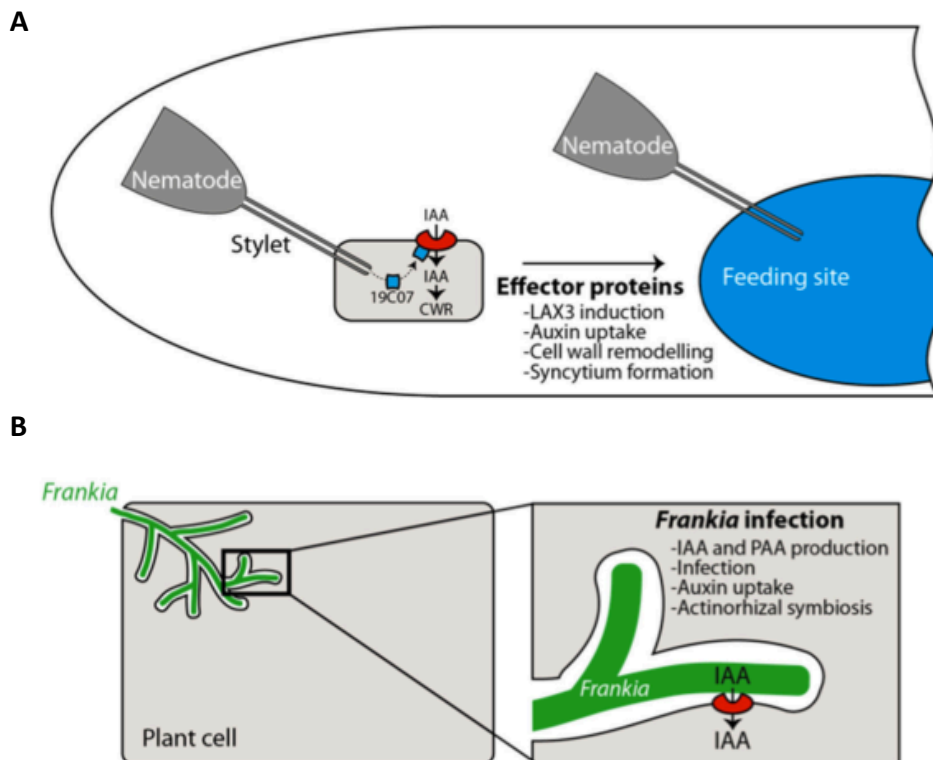


Figure 16 : Détournement du transport de l'auxine dans les cellules des plantes dans l'interaction avec les micro-organismes rhizosphériques

A ; Détournement du transport de l'auxine dans les futures cellules nourricières de la racine d'*A. thaliana* en interaction avec un nématode parasite *Heterodera schachtii*. L'effecteur 19C07 produit par le microorganisme interagit directement avec le transporteur *AtLAX3* (Lee *et al.*, 2011).

B ; Implication du transport de l'auxine dans les cellules de la racine de *Casuarina glauca* infectées par la bactérie fixatrice d'azote *Frankia*. *CgAUX1* est régulé ce qui pourrait induire une entrée de l'auxine par les cellules de la plante (Peret *et al.*, 2007).

Image extraite de Swarup & Péret 2012.

3.2 L'auxine dans l'infection de la plante par les pathogènes

L'auxine contribue à la mise en place des mécanismes d'infection de la plante par des microorganismes pathogènes. Il est maintenant reconnu qu'une application exogène d'auxine induit une plus grande sensibilité de la plante hôte aux pathogènes (Hager, 2003 ; Chen *et al.*, 2007). Plusieurs stratégies utilisant l'auxine du micro-organisme ou de la plante ont été mises en évidence.

Tout d'abord, il a été montré que l'auxine pourrait augmenter la résistance des microorganismes à de nombreux stress notamment chez *Escherichia coli* (Bianco *et al.*, 2006). De manière intéressante, l'auxine pourrait aussi être utilisée comme source d'énergie pour le micro-organisme (Leveau & Lindow, 2005), ce qui a aussi été suggéré dans les interactions PGPR (Spaepen & Vanderleyden, 2011).

Une des hypothèses suggère que l'augmentation du niveau d'auxine dans la plante, induit une fragilité de la paroi cellulaire et augmente la perméabilité de la membrane. Il résulterait un déversement des nutriments et de l'eau dans l'apoplaste, disponibles pour le pathogène, et permettrait aussi sa progression dans les tissus de la plante (Buchanan *et al.*, 2000 ; Tia *et al.*, 2002).

De plus, l'auxine, induit la production d'éthylène, hormone connue pour augmenter les symptômes de la maladie de la plante (Bent *et al.*, 1992 ; Abel *et al.*, 1995). L'auxine, seule inhibe les défenses de la plante (Shinshi *et al.*, 1987 ; Rezzonico *et al.*, 1998 ; Park *et al.*, 2007).

De manière intéressante, il a été montré que les effecteurs des microorganismes pathogènes interagissent directement avec les acteurs des voies de signalisation hormonales de la plante. Ce mécanisme est bien connu pour les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique (Pieterse *et al.*, 2009 ; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Lors de l'interaction des racines d'*A. thaliana* avec un nématode parasitique *Heterodera schachtii*, une modulation de la localisation du transporteur AtLAX3 est observée. Cette régulation se fait *via* une fixation d'un effecteur du nématode directement sur AtLAX3. Cette stratégie permettrait d'augmenter l'auxine intracellulaire, et *in fine* la taille de la cellule

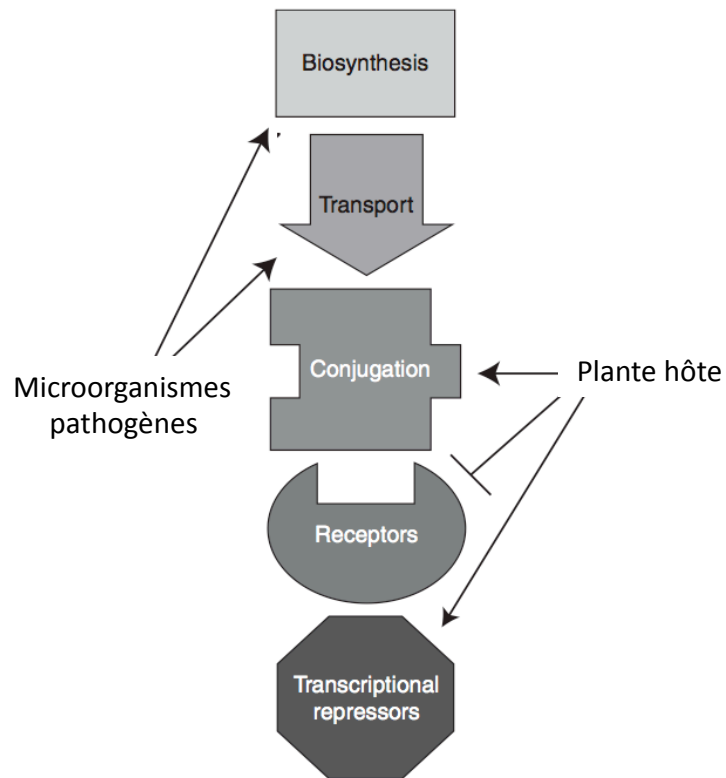


Figure 17 : Régulation des voies de l'auxine de la plante hôte par les 2 partenaires au cours de l'infection

L'auxine a un effet positif dans le développement de l'infection de la plante par les pathogènes. Les pathogènes vont induire sa biosynthèse et son transport dans les futures cellules infectées. Alors que la plante hôte va activer ces voies de conjugaison de l'AIA pour inhiber la forme active de l'auxine, inhiber la signalisation auxinique et activer les répresseurs de la signalisation. (Image extraite de Stewart et Nemhauser, 2010).

([Figure 16A](#) ; Grunewald *et al.*, 2009b ; Lee *et al.*, 2011). Dans la symbiose nodulaire actinorhizienne, la régulation de l'expression de *CgAUX1* dans les cellules de la racine de *Casuariana glauca* infectées par *Frankia*, suggère une stratégie similaire ([Figure 16B](#) ; Péret *et al.*, 2007 ; Grunewald *et al.*, 2009b). En outre, dans cette interaction, l'accumulation de l'auxine ainsi que l'activation des transporteurs CgPIN1 ont aussi été observées dans les cellules infectées (Perrine-Walker *et al.*, 2010).

Certains micro-organismes produisent une quantité importante d'AIA (voir [partie 3.1](#)). Les bactéries et les champignons produisent l'AIA principalement par les voies dépendantes du tryptophane, la voie de l'indole-3-acétylamine (IAM) et de l'indole-3-pyruvate (IPyA) (Manulis *et al.*, 1998 ; Zimmer *et al.*, 1998 ; Lemcke *et al.*, 2000 ; Chung and Tzeng, 2004 ; Reineke *et al.*, 2008). Mais il a aussi été montré que la stratégie de certains micro-organismes pathogènes tels que *Pseudomonas syringae* serait de détourner la voie de biosynthèse de l'AIA de la plante. L'expression de l'effecteur *AvrRpt2* dans *A. thaliana*, induit une augmentation de la quantité d'AIA endogène (Chen *et al.*, 2007). De plus, certains pathogènes modifient la signalisation et le transport de l'auxine dans la plante ([Figure 17](#) ; Padmanabhan *et al.*, 2008 ; Stewart & Nemhauser, 2010 ; Lee *et al.*, 2011). Du côté de la plante hôte, l'inhibition de l'ARN messager de certains membres de la famille des AtTIR/AFB par l'activation d'un miRNA est une stratégie de défense contre le microorganisme ([Figure 17](#) ; Navarro *et al.*, 2006).

3.3 Implication de l'auxine dans la formation de la racine ECM

Dans les interactions ECM, plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'auxine dans la formation de l'organe symbiotique. Tout d'abord, une corrélation positive entre le nombre de mycorhizes formées par *Pinus sylvestris* associé à *Paxillus involutus* et la quantité d'auxine produite par le champignon a été décrite (Rudawska & Kieliszewska-Rokicka, 1997). De plus, les racines de *Pinus pinaster* inoculées avec des lignées transgéniques de *Hebeloma cylindrosporum* possédant une expression plus importante d'un gène de biosynthèse de l'AIA, induit aussi une augmentation de la taille du réseau de Hartig ([Figures 18A et 18B](#) ; Gay *et al.*, 1994 ; Tranvan *et al.*, 2000). Dans le couple *Picea abies*-*L. bicolor*, l'apport exogène d'un inhibiteur du transport de l'auxine (TIBA ; acide 2,3,5-triidobenzoïque) limite la

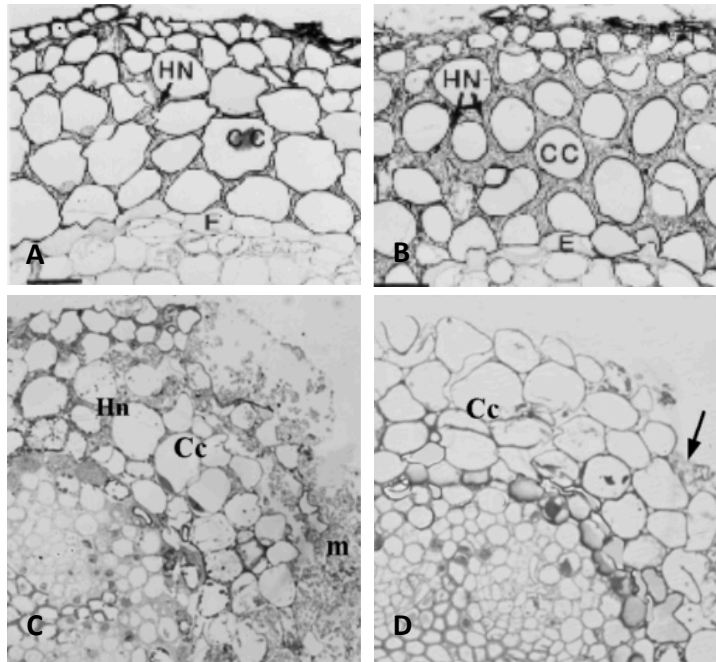


Figure 18 : Influence de l'auxine et de son transport polarisé dans la formation du réseau de Hartig

A et B ; Coupes transversales de racines mycorhizées de *Pinus pinaster* par le champignon ECM *Hebeloma cylindrosporum* sauvage (A) et par une lignée transgénique surexprimant un gène de la biosynthèse de l'auxine (B). (Images extraites de Tranvan *et al.*, 2000).

C et D ; Coupes transversales de racines mycorhizées de *Picea abies* colonisées par le champignon ECM *Laccaria bicolor* en condition témoin (C) et en présence du inhibiteur du transport polarisé de l'auxine (TIBA ; acide 2,3,5-triidobenzoïque ; D). La flèche indique la présence des hyphes du champignon (Image extraite de Rincón *et al.*, 2003).

HN : réseau de Hartig ; m : manteau d'hyphe fongique ; CC : cellules du cortex

formation du réseau de Hartig ([Figures 18C et 18D](#); Karabaghli *et al.*, 1998 ; Rincón *et al.*, 2003).

Dans le cas de l'interaction *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius*, il a été mis en évidence une molécule antagoniste à l'auxine, le tryptophane bêtaïne, appelée hypaphorine (Ditengou & Lapeyrie, 2000). Cette molécule, produite et sécrétée par le champignon en présence uniquement de la plante hôte, induit une inhibition de la croissance racinaire et celle des poils absorbants (Beguiristain *et al.*, 1997). Les auteurs ont aussi montré que l'hypaphorine est régulée par l'application de zéatine (Lagrange, données non publiées). L'hypaphorine n'a pas été identifiée dans les hyphes mycéliens de *L. bicolor* (Beguiristain *et al.*, 1997).

En conclusion, de nombreux gènes de la signalisation auxinique ainsi que de son l'homéostasie et de son transport sont régulés dans les interactions ECMs (Sukumar *et al.*, 2013). Ces acteurs pourraient être impliqués dans les modifications du développement racinaire. De nombreuses stratégies décrites dans les interactions plantes-pathogènes révèlent un rôle de l'auxine dans la colonisation des tissus de la plante. A ce niveau, l'auxine du microorganisme induit une déstabilisation des parois de la plante l'hôte. Dans l'interaction ECM, lors de la formation du réseau de Hartig, ce rôle est aussi suggéré.

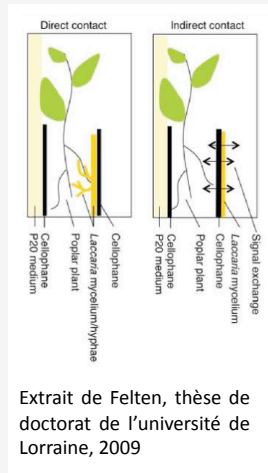
Encadré 6 : Le système de culture *in vitro* sandwich peuplier -*L. bicolor*
(Felten *et al.*, 2009)

1) Descriptif et avantages du système :

Ce système de culture *in vitro* permet d'obtenir des mycorhizes en conditions de culture contrôlées en 6 à 7 semaines. Les deux partenaires sont cultivés indépendamment sur des membranes de cellophane. A T0, les deux partenaires sont mis en co-culture entre deux membranes de cellophane (en sandwich ; voir Figure ci-contre).

Ce système de culture a de nombreux avantages, il permet :

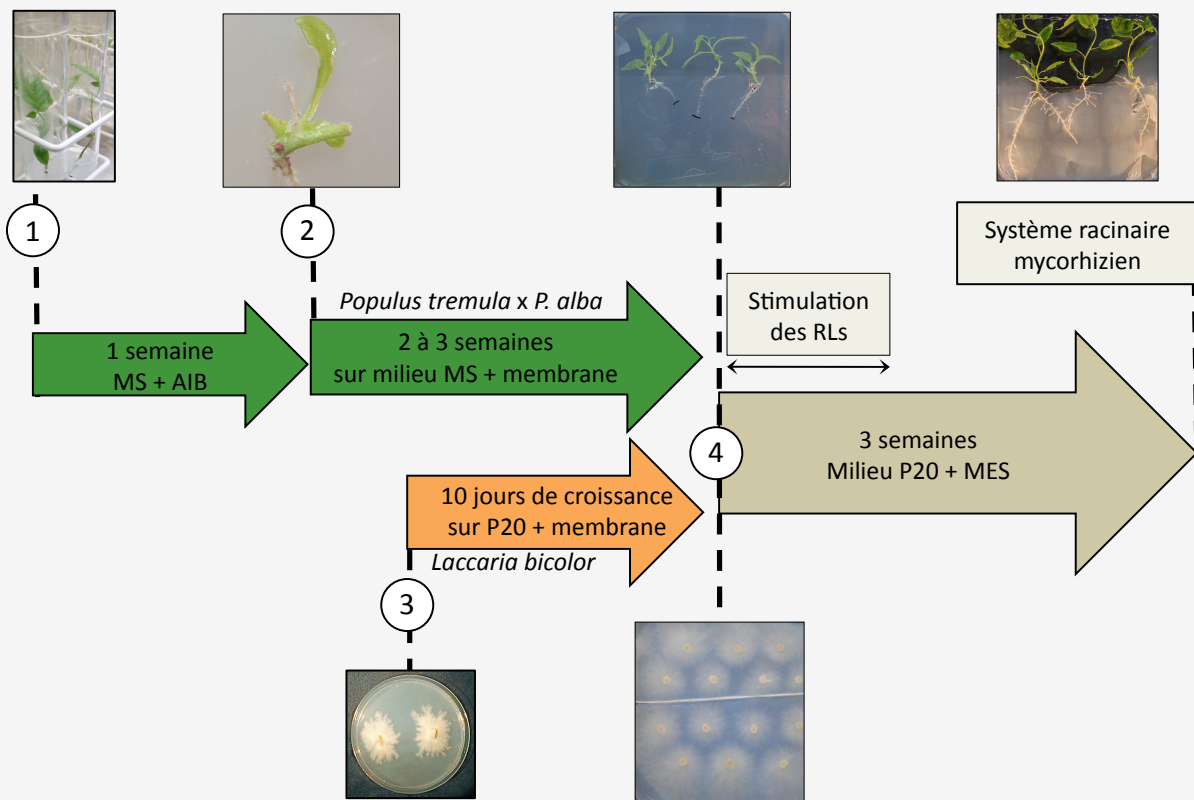
- de décrire le développement du système racinaire du peuplier en 2 dimensions, ce qui ne serait possible sans membrane de cellophane car les racines pénètrent dans le milieu gélosé.
- de réaliser des contacts indirects entre la plante hôte et les hyphes du champignon. Ce système permet d'étudier les signaux entre le champignon et la plante ainsi que de soustraire le champignon aux analyses de métabolites réalisés par la suite. Cela est possible en disposant la membrane avec le champignon, celui-ci du côté extérieur à celui en contact avec la racine (voir Figure ci-contre).
- et de faciliter les expérimentations d'analyses moléculaires dans la racine, le milieu gélosé inhibant certaines réactions.



Extrait de Felten, thèse de doctorat de l'université de Lorraine, 2009

2) Les principales étapes de la mise en place du système :

- 1 - Repique des entre-nœuds de peupliers de conditions stock, en tube, dans un milieu d'enracinement.
- 2 - Transfert des entre-nœuds de peuplier sur milieu de culture avec une membrane de cellophane.
- 3 - Culture des hyphes de *L. bicolor* sur une membrane de cellophane.
- 4 - Co-culture des 2 partenaires en système sandwich. La condition témoin est obtenue en appliquant sur les racines de peuplier une membrane de cellophane sans champignon.



Légendes : **Milieu MS:** Milieu de culture Murashige & Skoog modifié Felten *et al.*, 2009, **AIB :** Acide Indole-3-butérique, **Milieu P20 :** Milieu Palchewski modifié (Deveau *et al.*, 2007), **MES:** nom commun de l'acide 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic utilisé comme tampon dans le milieu.

Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans un programme de recherche visant à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction symbiotique entre la racine du peuplier et le champignon ECM, *L. bicolor*. La racine ECM est décrite comme une « racine courte ». Ainsi des modifications du système racinaire de la plante hôte sont observées en réponse au champignon ECM. Dans nos conditions de co-culture peuplier-*L. bicolor* utilisées au laboratoire ([Encadré 6](#)), une stimulation de la formation des RLs est observée dans les phases précoces de l'interaction (Felten *et al.*, 2009). Dans la littérature, l'impact des champignons ECMs sur la croissance racinaire de la plante hôte est controversé et non caractérisé dans le modèle peuplier-*L. bicolor*. Par ailleurs, l'auxine étant un acteur clé dans le développement racinaire, et dans les interactions plantes-microorganismes, nous avons donc focalisé notre projet sur l'implication de l'auxine dans le développement racinaire du peuplier en réponse à *L. bicolor* et son implication dans l'ontogénèse de l'organe symbiotique.

Le premier objectif de ma thèse, est la caractérisation de l'impact de *L. bicolor* sur la croissance racinaire du peuplier ([Figure 19](#)). J'ai donc débuté ce travail de recherche, par la caractérisation de la cinétique de croissance des RLs et adventives du peuplier en réponse à *L. bicolor*. Un arrêt de croissance racinaire est observé lors de la formation de la mycorhize.

Il est reconnu que le gradient auxinique à l'apex racinaire régule la croissance racinaire. De plus, nous savons qu'une quantité d'auxine exogène peut inhiber la croissance de la racine. **Dans un deuxième objectif, nous avons focalisé nos recherches sur l'étude de la régulation des voies de l'auxine dans la plante dans ce processus développemental. De plus, il est essentiel de connaître la quantité d'auxine produite par le champignon et la plante dans la mycorhize ([Figure 19](#)).** Nous avons donc développé différentes approches complémentaires ; (1) une approche cytologique de la localisation de la réponse auxinique (2) une approche de l'analyse globale de la régulation des gènes du peuplier lors de la mycorhization ainsi que (3) le dosage de l'auxine et de ses métabolites associés dans différentes étapes et tissus au cours du développement ectomycorhizien.

Sans l'avoir démontré expérimentalement, l'arrêt de croissance racinaire observé dans la formation de la mycorhize est souvent associé à la présence du réseau de Hartig. En effet, deux caractéristiques majeures de cette structure peuvent influencer la croissance racinaire

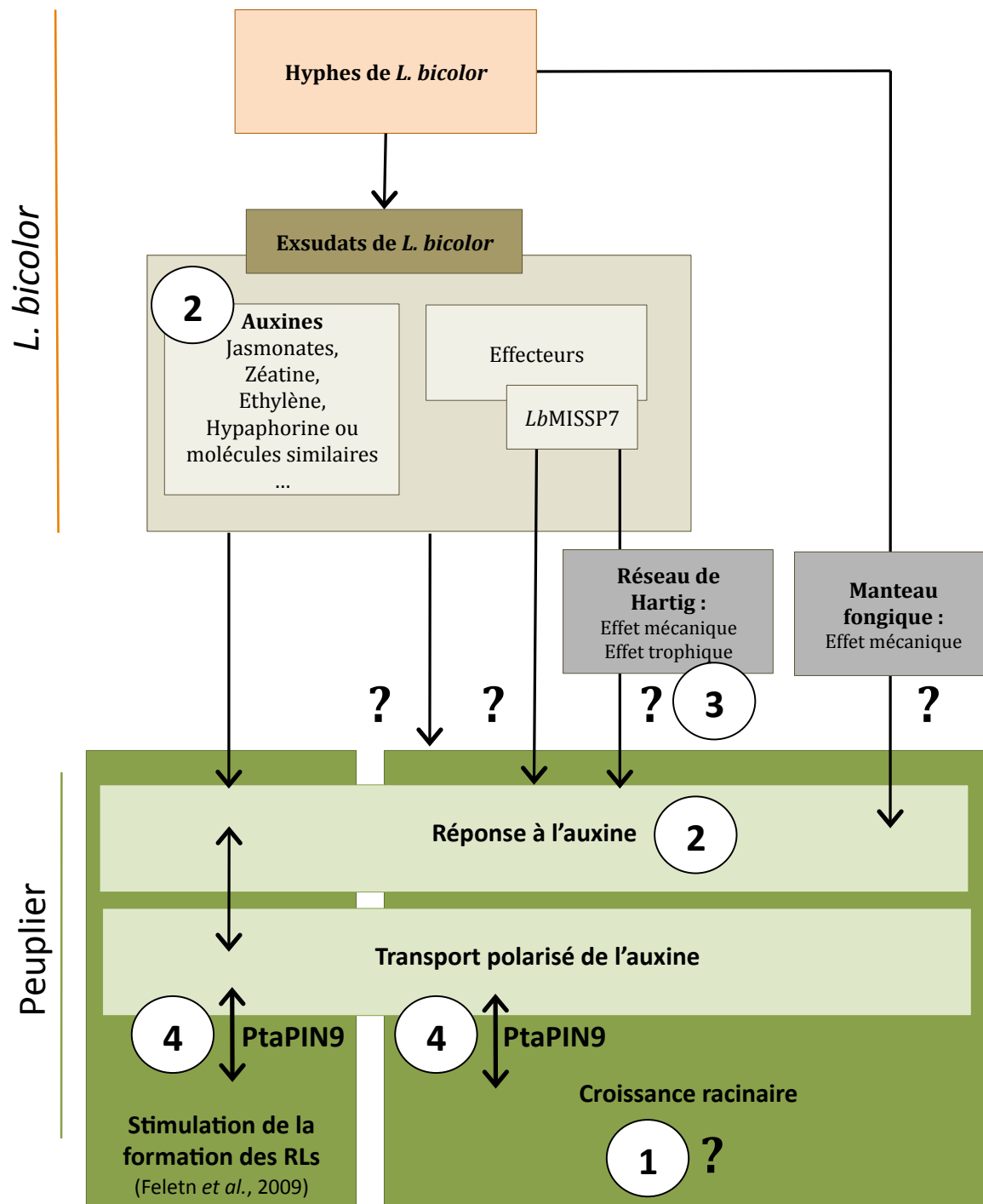


Figure 19 : Quel est l'impact de *L. bicolor* sur le développement racinaire du peuplier ? Quels sont les processus moléculaires impliqués?

De nombreux facteurs peuvent influencer la croissance des racines de peuplier lors du contact avec le champignon ECM, *L. bicolor* : les molécules sécrétées dans les exsudats fongiques (auxines, jasmonates, zéatine, éthylène, hypaphorine ou molécules similaires, ect...), la présence d'effecteurs pouvant contrôler des voies de signalisation de la plante hôte, l'impact mécanique de la colonisation de la racine ainsi que l'effet trophique des échanges de nutriment au sein du réseau de Hartig...

Plusieurs hypothèses ont été testées au cours de ce travail de thèse, elles s'articulent autour de 4 objectifs :

- (1) La caractérisation de la croissance des racines de peuplier en réponse à *L. bicolor*
- (2) La caractérisation de la quantité d'auxine et de sa signalisation dans la plante dans la modification de croissance racinaire observée
- (3) La caractérisation de l'effet de la présence du réseau de Hartig sur la croissance racinaire en réponse à *L. bicolor*
- (4) La caractérisation du rôle de PtaPIN9, dans la stimulation de la formation des RLs et dans le phénotype de croissance racinaire en réponse à *L. bicolor*

: un effet mécanique de la présence des hyphes fongiques entre les cellules de l'épiderme de la racine et un effet trophique des échanges de nutriments entre les deux partenaires. **Dans un troisième objectif, nous avons développé une étude complémentaire qui a pour objectif d'évaluer l'effet de la présence du réseau de Hartig sur la croissance racinaire (Figure 19).**

Le projet de thèse que j'ai développé, fait suite aux travaux de thèse de J. Felten. Son travail a permis d'identifier des gènes codant des protéines pouvant être impliquées dans la formation de nouvelles RLs en réponse à *L. bicolor*. Le gène *PtaPIN9* a été identifié régulé positivement dans les phases précoces de l'interaction. *PtaPIN9* est un orthologue de *AtPIN2*, responsable du transport basipète de l'auxine à l'apex racinaire chez *A. thaliana*. **Le quatrième objectif de ma thèse s'est attaché à comprendre comment un candidat régulé transcriptionnellement en réponse à *L. bicolor* régule le développement racinaire du peuplier (Figure 19).** Comme il a été décrit dans la littérature le transport polarisé de l'auxine joue un rôle dans la croissance racinaire ainsi que dans la formation du réseau de Hartig. **L'implication de *PtaPIN9* dans les étapes plus tardives de la formation de la mycorhize est ensuite décrite (Figure 19).**

RESULTATS

Pour répondre aux objectifs, le chapitre des résultats s'articule autour de trois parties.

La première partie, décrit les modifications de la croissance racinaire du peuplier lors de la formation de la mycorhize. L'étude de la voie de réponse ainsi que de la signalisation et de l'homéostasie de l'auxine dans la mycorhize est réalisée. Cette partie est composée d'un article en préparation intitulé « *Laccaria bicolor* colonization on poplar root modifies auxin response, auxin signalling and auxin metabolism », rédigé en anglais.

Une deuxième partie décrit l'impact de la présence du réseau de Hartig dans le phénotype d'arrêt de croissance racinaire.

Dans la troisième partie, les résultats obtenus de l'implication de PtaPIN9 dans la modification du développement racinaire en réponse à *L. bicolor* sont présentés.

Chaque partie est composée d'une brève introduction et d'un matériel et méthode. La présentation des résultats est suivie d'une discussion.

Partie I : La colonisation de *L. bicolor* sur la racine de peuplier modifie la réponse à l'auxine, la signalisation auxinique et le métabolisme de l'auxine

Le premier objectif a donc été la caractérisation du système racinaire de peuplier *P. tremula* x *P. alba* lors de la colonisation par *L. bicolor*. Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, l'auxine a à la fois un rôle morphologique, dans le développement racinaire et peut aussi être considérés comme un signal du microorganisme. Afin d'appréhender ces deux rôles, nous avons développé des analyses complémentaires ; (1) une analyse de la réponse à l'auxine via l'observation du patron d'expression du promoteur, rapporteur *DR5::GUS*, (2) une analyse transcriptomique (3) et du métabolome de l'auxine au cours de la cinétique de formation de la mycorhize.

Cette dernière approche, a été réalisée en collaboration avec l'équipe de K. Ljung (UPSC, Suède). Nous avons quantifié l'AIA et ses métabolites dans les deux partenaires ainsi que dans les mycorhizes.

L'analyse globale des gènes différentiellement régulés dans la cinétique de formation de la mycorhize, à 1, 2 et 3 semaines de co-culture avec *L. bicolor* comparée aux conditions témoins a été réalisée. Dans l'article, seule l'analyse des gènes différentiellement exprimés dans la mycorhize à 3 semaines de co-culture est présentée. Les analyses réalisées dans cette étude, se sont focalisées principalement sur les gènes de réponse à l'auxine ainsi que les acteurs de la signalisation, des voies du métabolisme et du transport de l'auxine. Dans la partie « Complément d'étude » (fin du manuscrit) je décrirai l'analyse des gènes différentiellement régulés à 1 et 2 semaines de co-culture, qui nous a conduit à identifier, des gènes marqueurs putatifs de la symbiose ECM. De plus, une analyse de l'étude sans *a priori* des gènes régulés dans la mycorhize, à 3 semaines de co-culture est en cours de réalisation.

***Laccaria bicolor* colonization on poplar root modifies auxin response, auxin signalling and auxin metabolism**

Alice Vayssières^a, Ales Pěnčík^b, Judith Felten^a, Annegret Kohler^a, Karin Ljung^b, Francis Martin^a, and Valérie Legué^{a*}

^a INRA and Université de Lorraine, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes 1136, INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

^b Umeå Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences SLU, 901 83 Umeå, Sweden

* Corresponding author

This work was supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12- LABEXARBRE-01), the European Project Energy Poplar (FP7–211917), the Genomic Science Program of the U.S. Department of Energy, Office of Science, Biological and Environmental Research (contract no. DE–AC05–00OR22725), and by the French space agency the Centre National d’Etudes Spatiales (CNES). The research was conducted in part at the Functional Genomics Facilities at INRA-Nancy and was financed by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Région de Lorraine, and by the European Fund for Regional Development (FEDER). AV holds a fellowship from the Université de Lorraine. KL and AP was funded by the Swedish Governmental Agency for Innovation Systems (VINNOVA), the Swedish Research Council (VR) and the Kempe Foundation.

ABSTRACT

Root systems of host trees are known to establish the ectomycorrhizal (ECM) symbiosis with rhizospheric fungi. This mutualistic association leads to modifications of root architecture that are illustrated by the presence of numerous short and swollen lateral roots, ensheathed by the fungal mantle. In this study, we investigate the central role of auxin (indole-3-acetic acid, IAA) in the poplar (*Populus tremula* x *P. alba*)-*Laccaria bicolor* ECM root growth. Our data showed that the interaction leads to the arrest of the poplar root growth. Differential IAA responses were analyzed by using an auxin-responsive *DR5::GUS* marker line and revealed a loss of auxin response in ECM roots. An oligoarray-based transcript profiling of poplar roots in contact with *L. bicolor* highlights a differential expression of auxin associated genes *PtaAux/IAA*, *PtaGH3*, in ECM. Moreover, the transcriptome analysis suggests that two independent auxin-response pathways are involved in ECM development. Measurement of auxin metabolites in ECM and in the free living partners revealed a IAA accumulation, activation of the IPyA (Indol-3-Pyruvic Acid) dependent IAA biosynthesis pathway in both partners, as well as changes in IAA conjugation pathways in poplar and in IAA degradation pathways in *L. bicolor*. Our findings illustrate the impact of *L. bicolor* colonization on root auxin metabolism and response, and also suggest a role of auxin as a signal in the formation of ECM and in the regulation of ECM function.

INTRODUCTION

Root systems of most plants display symbiosis with rhizospheric fungi, which are essential for nutrient acquisition and plant development. In boreal and temperate forests, the most frequently found symbioses are ectomycorrhizae (ECM), which are defined as a symbiosis between roots of host trees and ECM fungal hyphae from basidiomycete or ascomycete families (Smith and Read, 2008). ECM fungal hyphae colonize lateral root (LR) tips of host trees to form a new composite organ, known as the ECM root, which becomes the site of mutualistic nutrient and carbon transfers between the two symbionts (Martin and Nehls, 2009). ECM root tips are structurally characterized by (i) the presence of an extensive extramatrical hyphae network prospecting the soil ; (ii) a mantle of aggregate hyphae that

forms a sheath around the root and acts mainly as a storage compartment; and (iii) a network of hyphae growing in the apoplastic space between epidermis and cortex cells forming the Hartig net where nutrient and carbohydrate exchanges take place (Massicotte *et al.*, 1987). The formation of the symbiotic root tips involve a sequence of complex and overlapping developmental processes in plant host root systems including the formation of new LR (Burgess *et al.*, 1996; Tranvan *et al.*, 2000; Niemi *et al.*, 2002; Rincón *et al.*, 2003; Felten *et al.*, 2009; Splivallo *et al.*, 2009), radial elongation of epidermal cells, a root hair decay (Horan *et al.*, 1988; Ditengou *et al.*, 2000) and a reduction of the root cap (Massicotte *et al.*, 1987). These profound morphological changes lead to the formation of ECM short roots, which contribute to the functional symbiosis. However, the “short root” phenotype itself is poorly defined and it appears to depend on the host plant. *Tuber spp.* was found to inhibit *Cistus incanatus* root growth (Splivallo *et al.*, 2009), whereas an increase of primary root growth was noted as a response to *Laccaria bicolor* and *Hebeloma cylindrosporum* in *Picea abies* and *Pinus pinaster* (Karabaghli *et al.*, 1998; Tranvan *et al.*, 2000; Rathnayake *et al.*, 2008). Molecular processes leading these ECM root are still not yet fully understood.

Changes in root development are regulated by plant hormone balance including auxin (indole-3-acetic acid, IAA ; reviewed in (Parizot and Beeckman, 2013) which has already been proven by the role of auxin and auxin homeostasis during microbe-plant interactions (reviewed in Sukumar *et al.*, 2013). Auxin is a main regulator of root architecture. It does not only regulate root growth but it also mediates each of the different stages of LR formation (reviewed in Benkova *et al.*, 2009). Local auxin gradient at the root apex has been shown to regulate plant development as well as root growth (Tanaka *et al.*, 2006). IAA biosynthesis combined with IAA polar transport lead to an IAA accumulation at the root tips (Ljung *et al.*, 2005; Petrásek and Friml, 2009; Rosquete *et al.*, 2012). IAA biosynthesis in specific root cells contributes also to the regulation of IAA level (Ljung *et al.*, 2005; Petersson *et al.*, 2009) IAA biosynthesis involves two different routes; the tryptophan (Trp)-dependent and the Trp-independent pathways. There is abundant genetic evidence suggesting the existence of multiple pathways within the Trp-dependent IAA biosynthesis pathway, in addition to multiple pathways of IAA conjugation and degradation (Ljung, 2013). Four putative pathways of Trp-dependent IAA biosynthesis in higher plants have been identified: (1) the indole-3-pyruvic acid (IPyA), (2) the indole-3-acetamide (IAM), (3) the tryptamine (TRA) and (4) the indole-3-acetaldoxime (IAOx) pathways (Ljung, 2013). The regulation of IAA levels by *de novo*

synthesis is one important homeostatic mechanism operating in plant cells, but the levels of IAA can also be attenuated by conjugation (mainly to amino acids ; Ludwig-Muller, 2011) and by degradation (Peer *et al.*, 2013; Pencík *et al.*, 2013). Increased IAA levels activate the IAA-signalling pathway to regulate IAA response genes and fine tune modification of root morphogenesis (Chapman and Estelle, 2009). Aux/IAA transcriptional regulators are constitutive repressors of Auxin Response Factor (ARF) transcription factors and as such inhibit the IAA response genes (Fukaki *et al.*, 2005; Dreher *et al.*, 2006). In the presence of IAA, the fixation of IAA to the SCF box ligase E3, SCF^{TIR1} lead to the Aux/IAA degradation *via* the proteasome, which is also a direct IAA receptor (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski and Leyser, 2005). The Aux/IAA-ARF network and its expression zones show the large scale of IAA response possibilities (Vernoux *et al.*, 2011; Calderon-Villalobos *et al.*, 2012).

Several studies reported dramatic changes in auxin signalling gene expression at different steps during ECM formation, suggesting a central role of auxin in mycorrhizal developmental pathways (Charvet-Candela *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2006; Felten *et al.*, 2009; Heller *et al.*, 2012; Flores-Monterroso *et al.*, 2013; Tarkka *et al.*, 2013). The role of auxin in formation of ECM and Hartig net is however still unclear and remains controversial. The interaction between the IAA-overproducing mutant of *H. cylindrosporum* with *Pinus pinaster* roots leads to a multiseriate Hartig net. Also the presence of polar auxin transport inhibitor in plant (TIBA; 2,3,5-triiodobenzoic acid) completely prevented the formation of Hartig net. These data supporting the hypothesis that auxin of both partner is a key component in the formation of the apoplastic hyphal net (Gay *et al.*, 1994; Tranvan *et al.*, 2000). Conversely, other studies have showed a decrease in IAA level in poplar and spruce ECM roots when compared to non-colonized roots (Wallander *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 2009). In *Pinus* ECM roots, a decrease in expression of the auxin-responsive *GH3* genes, that are coding for IAA-conjugating enzymes, was observed (Reddy *et al.*, 2006; Heller *et al.*, 2012). Moreover, in poplar *GH3::GUS* line, the GUS signals was absent in poplar-*Paxillus involutus* ECM root (Luo *et al.*, 2009).

This data suggest on the one hand the involvement of auxin of both partners in symbiotic organ formation, in another hand the poor level of auxin in ECM root.

In this study, we respond to these questionings and suggest that auxin is a key regulator in the root development of the poplar-*L. bicolor* ECM root. We analyse the time-course of poplar root growth arrest during the interaction with the ectomycorrhizal basidiomycete *L. bicolor* (Martin and Selosse, 2008), revealing a poplar root growth arrest. Genome-wide

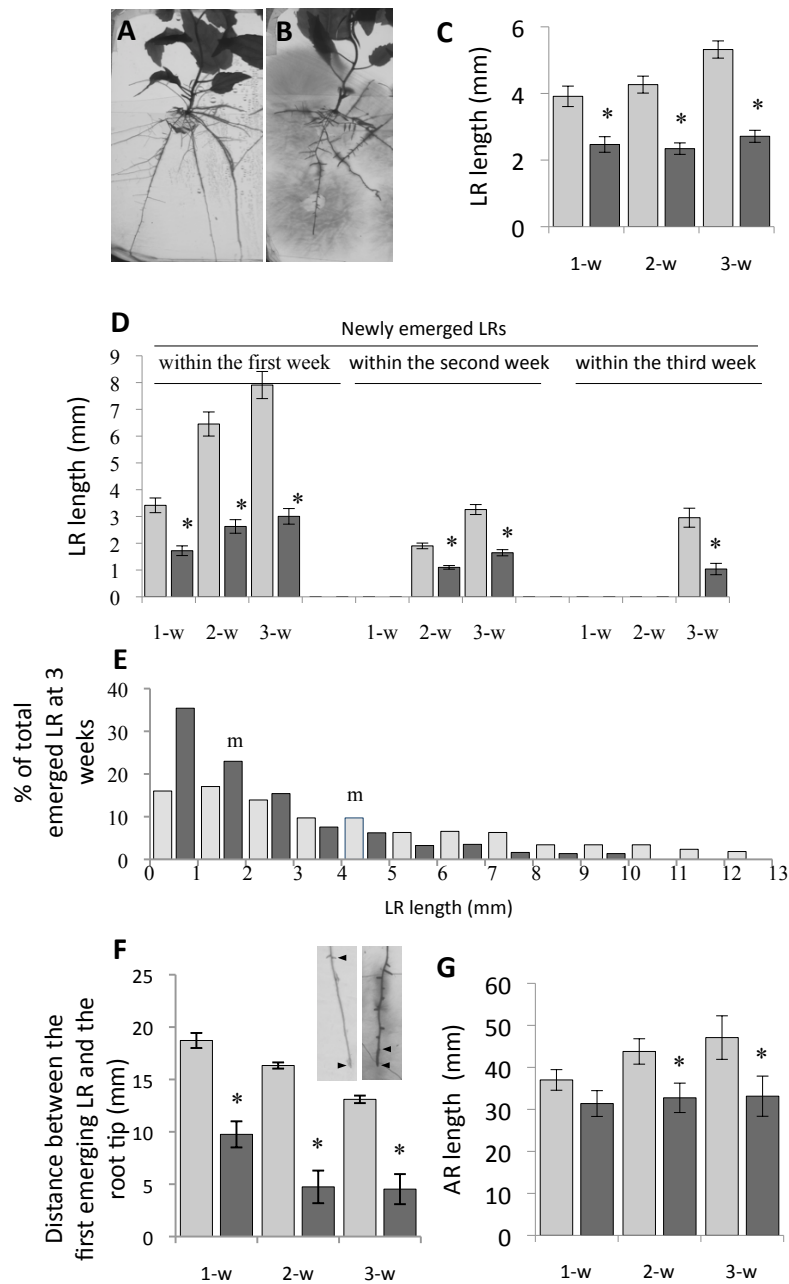


Figure 1. Root growth in poplar host plants during the symbiotic interaction with *L. bicolor*

Root system morphology observed in control poplar plants (A) or after three weeks of co-culture with *L. bicolor* (B). Lateral root (LR) and adventitious root (AR) measurements in the presence (black bars) and the absence (grey bars) of *L. bicolor* after the respective time points (1 week (1-w), 2 weeks (2-w) and 3 weeks (3-w) (C-G). Mean length of all LR (C). Mean length of newly emerged LRs within the first (n=136 to 160 roots), the second (n= 168 to 198 roots) and the third week (n= 22 to 55 roots) of culture (D). Distribution of LR root length at three weeks of culture in the absence (grey bars, n=370) or in the presence of *L. bicolor* (black bars, n=380) (E). LR length that represented less than 1% of the total lateral roots are not indicated in this graph. "m" above the bars indicates the mean for the given condition. Mean length between the first emerging LR and the apex of the parental root (n=8 plants) (F). Mean length of AR (n=8 plants) (G). Asterisks indicate significant difference between control and co-culture roots (Student t-test according to Fisher, P -value<0.05)

transcript profiling of mature ECM highlights the regulation of auxin-response genes during this process. Accordingly, analysis of the auxin metabolome revealed high IAA production and a dynamic change in the regulation pathways of IAA content during the interaction. *DR5::GUS* expression in poplar roots suggests the loss of auxin sensitivity during root colonization by *L. bicolor*. Based on these results we suggest a dramatic change of auxin environment in the ECM root and suggest that auxin has a key role in the formation of short ECM roots and in fungal colonization.

RESULTS

ECM development is leading to root growth arrest

Colonization of poplar roots by *L. bicolor* led to striking changes in root development (Fig. 1A and 1B). We measured changes in root length during the interaction. After one week of co-culture, the mean LR length was significantly shorter in the presence of *L. bicolor* than in control roots without fungus (Fig. 1C), suggesting that one week of contact was sufficient to significantly inhibit LR growth. Due to the evolution of the number of new emerged lateral root, the mean LR length observed after one and two weeks were identical in control roots. In order to distinguish LR growth from new LR emergence during the time course, we analyzed the length of newly emerged LR each week after contact (Fig. 1D). Concerning LRs emerged in the first week of co-culture, a decrease of at least 50% in length was observed for LRs emerged in the presence of *L. bicolor* when compared to LRs emerged in absence of the fungus. Moreover, LRs, which emerged during the second and third week, were also significantly shorter than control LRs. Between the second and the third week, LR length in co-culture remained similar, whereas an increase of control LR length was observed (Fig. 1H). This data clearly illustrated arrested LR growth during ECM development. The distribution of LR length was determined in control roots versus colonized roots after three weeks of co-culture, a time-point that corresponds to the mature ECM stage for the majority of roots (Fig. 1E; Felten *et al.*, 2009). We observed a higher percentage (around 60%) of short roots (<2 mm) in ECM roots compared to control roots (33%). We also investigated whether a change in adventitious root growth was induced by *L. bicolor* colonization. After

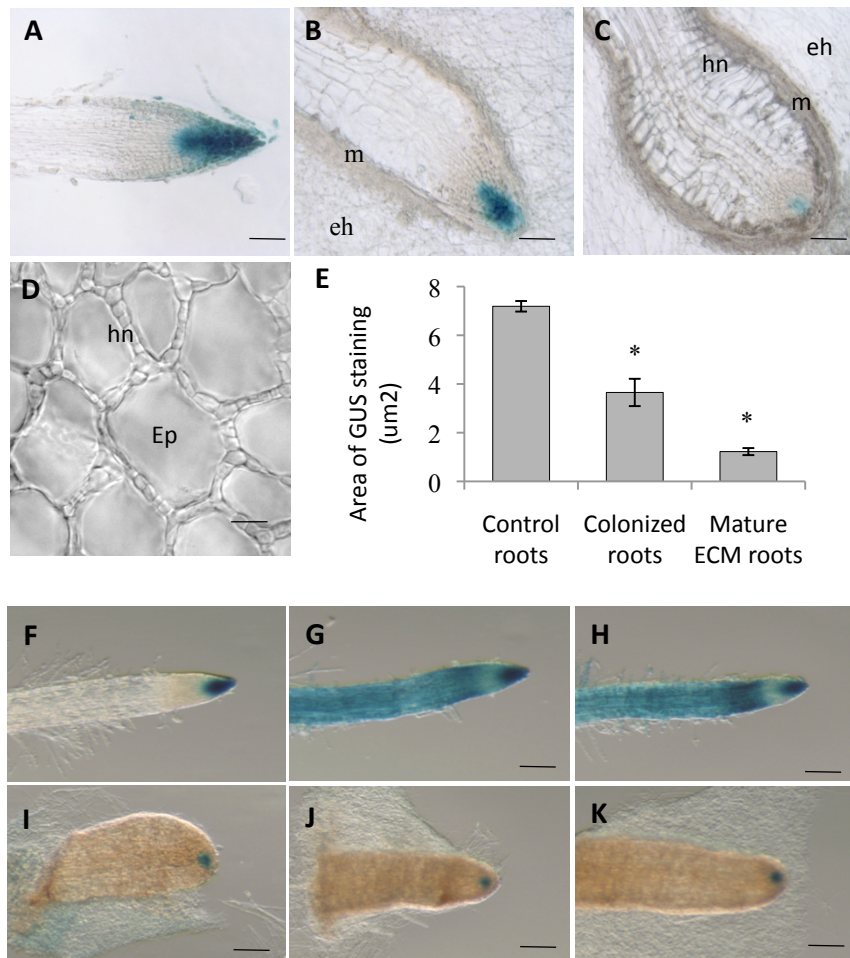


Figure 2. Auxin response is impaired in ECM roots

A to C, Spatial expression patterns of β -glucuronidase (GUS) activity in microscopic sections of *Populus tremula* x *P. tremuloides* DR5::GUS plant root grown for two weeks in control condition (A) or in co-culture with *L. bicolor* (B,C). Longitudinal sections of a colonized root (B) and a mature ECM root (C) with visible Hartig net (D) are shown. E, Mean area of GUS staining. Asterisks indicate significant difference between control and co-cultured roots (Student's test according to a Fisher test, P -value<0.05). Control roots (n=3), co-culture root (n=10). F to K, Spatial expression pattern of GUS activity in *Populus* DR5::GUS roots grown for two weeks in the absence (F to H) or in the presence of *L. bicolor* (I to K), then transferred for 16 hours to a liquid half-MS medium without auxin (F and I), or with indol-3-acetic acid (IAA 10 μ M, G and J) or with naphthalene-1-acetic acid (NAA 10 μ M, H and K). Images show typical data obtained from twenty replicates for each condition. Scale bars=50 μ m (A-C). 150 μ m (D), 0.1 mm (F-K). eh, extramatrical hyphae ; m, fungal mantle ; hn, Hartig net ; Ep, Epidermal cell.

three weeks of contact, emerging LRs in the control root systems were observed at 13 mm from the apex of the adventitious root, whereas the emerging LRs in the root systems colonized by *L. bicolor* were observed at 4 mm from the adventitious root apex (Fig. 1F), suggesting inhibition of parental root growth by *L. bicolor*. A reduction in the adventitious root length was observed first after two weeks of contact with *L. bicolor*. The mean length of adventitious roots was 30% lower after three weeks of co-culture compared to control conditions (Fig. 1G), suggesting that the interaction with *L. bicolor* induced a subsequent arrest of adventitious root growth in poplar.

Arrest of poplar root growth is accompanied by an impaired auxin response

We then investigated root colonization and root morphology in association to auxin response. For monitoring the auxin response in roots, we used the auxin-inducible promoter-reporter *DR5::GUS* (coding for β -glucuronidase; Sabatini *et al.*, 1999; Ulmasov *et al.*, 1999). *DR5* directed *GUS* expression in *P. tremula* x *P. tremuloïdes* control roots was restricted to the root apex, including all cells in the cap and the quiescent center (Fig. 2A). In root apices in contact with *L. bicolor* for two weeks several morphological changes were taking place in root apices (Fig. 2B to 2C). Two major types of ECM root were observed; (1) Roots characterized by the presence of a dense mycelium sheath surrounding the flanks of the root without any Hartig net formed yet between root epidermis cells (Fig. 2B). At this stage of colonization, hereafter referred to as “colonised root” stage, the fungus had not yet fully invaded the root cap. However, the area of GUS expression seemed already restricted (Fig. 2B). The second developmental stage (2) was characterised by a well-developed fungal sheath around the entire root including the root cap where the development of the Hartig net was also visible (Fig. 2C). Infected root apices had a distinctly swollen appearance characteristic of ECM root (Massicotte *et al.*, 1987; Horan *et al.*, 1988) and here after referred to as “mature ECM”. The apical region showed a rounded root cap containing shortened root cap cells (Fig. 2C). In addition, the increased diameter of the root core was associated with the dramatic changed of the epidermis cells as well as the reduction of cell size in the meristem, indicating that fungal colonization leads to striking changes in root cell differentiation. Interestingly, in mature ECM root tips, the *GUS* expression pattern was restricted to cells of the modified columella and to only few cells located around the quiescent center (Fig. 2C). Furthermore, no GUS expression was observed in the epidermis

Table 1. Auxin-dependent genes differentially regulated in mature ECM poplar roots compared to the control LR

Gene name ^a	Gene Id ^b	Arabidopsis gene ID ^c	Arabidopsis gene name ^c	Fold change expression ^d	Expression in control roots ^e	Annotation ^f
IAA biosynthesis / conjugaison / degradation pathway						
<i>PtaTAA1</i>	<i>Potri.010G044500.1</i>	<i>AT1G70560.1</i>	<i>AtTAA1</i>	-6.28	1,281	Catalyzes conversion of Trp to IAA
<i>PtaYUCCA2</i>	<i>Potri.006G248200.1</i>	<i>AT5G11320.1</i>	<i>AtYUCCA4</i>	-2.63	331	Catalyzes conversion of IAA to IAA
<i>PtaYUCCA6-1</i>	<i>Potri.006G243400.1</i>	<i>AT5G25620.1</i>	<i>AtYUCCA6</i>	8.23	nd	Catalyzes conversion of IAA to IAA
<i>PtaYUCCA6-2</i>	<i>Potri.018G036800.1</i>	<i>AT5G25620.1</i>	<i>AtYUCCA6</i>	5.32	nd	Catalyzes conversion of IAA to IAA
<i>PtaGH3-1</i>	<i>Potri.007G050300.1</i>	<i>AT2G14960.1</i>	<i>AtGH3-1</i>	2.04	3,969	IAA-amino-synthase enzyme
<i>PtaGH3-2</i>	<i>Potri.009G092900.1</i>	<i>AT2G14960.1</i>	<i>AtGH3-1</i>	2.95	1,688	IAA-amino-synthase enzyme
<i>PtaGH3-7</i>	<i>Potri.001G069000.1</i>	<i>AT1G28130.1</i>	<i>AtGH3-17</i>	-2.32	4,695	IAA-amino-synthase enzyme
<i>PtaILL8</i>	<i>Potri.005G178900.1</i>	<i>AT1G44350.1</i>	<i>AtILL8</i>	4.15	1,882	IAA amino acid conjugate hydrolase
IAA transporters involved in the auxin gradient						
<i>PtaPIN6</i>	<i>Potri.008G129400.1</i>	<i>AT1G70940.1</i>	<i>AtPIN3</i>	4.86	nd	auxin efflux carrier
<i>PtaPIN3</i>	<i>Potri.010G112800.2</i>	<i>AT1G70940.1</i>	<i>AtPIN3</i>	5.83	nd	auxin efflux carrier
<i>PtaPIN8</i>	<i>Potri.006G037000.1</i>	<i>AT1G73590.1</i>	<i>AtPIN1</i>	3.44	1,135	auxin efflux carrier
<i>PtaPIN9</i>	<i>Potri.018G139400.1</i>	<i>AT5G57090.1</i>	<i>AtPIN2</i>	-6.76	5,209	auxin efflux carrier
<i>PtaAUX8/LAX4</i>	<i>Potri.002G087000.1</i>	<i>AT1G77690.1</i>	<i>AtLAX3</i>	-3.26	6,614	auxin influx carrier
<i>PtaAUX8/LAX8</i>	<i>Potri.005G174000.1</i>	<i>AT1G77690.1</i>	<i>AtLAX3</i>	-3.01	8,993	auxin influx carrier
<i>PtaAUX2/LAX1</i>	<i>Potri.016G113600.1</i>	<i>AT2G38120.1</i>	<i>AtAUX1</i>	5.84	nd	auxin influx carrier
<i>PtaABC5</i>	<i>Potri.010G003000.1</i>	<i>AT2G47000.1</i>	<i>AtABC4</i>	-3.15	5,912	auxin efflux/influx carrier
<i>PtaABC19</i>	<i>Potri.017G081100.1</i>	<i>AT3G28860.1</i>	<i>AtABC19</i>	2.76	432	auxin efflux carrier
IAA signalling pathway						
	<i>Potri.005G159300.1</i>	<i>AT5G49980.1</i>	<i>AtAFB5</i>	3.37	906	auxin signalling SCF box
	<i>Potri.002G102700.1</i>	<i>AT5G49980.1</i>	<i>AtAFB5</i>	2.33	791	auxin signalling SCF box
<i>PtaAux/IAA3.4</i>	<i>Potri.005G218200.1</i>	<i>AT5G43700.1</i>	<i>AtAux/IAA4</i>	-5.62	1,593	auxin signalling transcriptional regulator
<i>PtaAux/IAA3.3</i>	<i>Potri.002G045000.1</i>	<i>AT5G43700.1</i>	<i>AtAux/IAA4</i>	-12.71	701	auxin signalling transcriptional regulator
<i>PtaAux/IAA28.2</i>	<i>Potri.006G236200.1</i>	<i>AT3G16500.1</i>	<i>AtAux/IAA26</i>	-3.21	3,808	auxin signalling transcriptional regulator
<i>PtaAux/IAA28.1</i>	<i>Potri.018G057000.1</i>	<i>AT3G16500.1</i>	<i>AtAux/IAA26</i>	-4.4	3,299	auxin signalling transcriptional regulator
<i>PtaAux/IAA20.2</i>	<i>Potri.014G111700.1</i>	<i>AT3G62100.1</i>	<i>AtAux/IAA30</i>	3.6	379	auxin signalling transcriptional regulator
<i>PtaAux/IAA15</i>	<i>Potri.001G177400.1</i>	<i>AT3G04730.1</i>	<i>AtAux/IAA16</i>	4.43	1,651	auxin signalling transcriptional regulator
<i>PtaAux/IAA12.1</i>	<i>Potri.008G172400.1</i>	<i>AT2G33310.1</i>	<i>AtAux/IAA13</i>	2.56	2,025	auxin signalling transcriptional regulator
<i>PtaARF2.4</i>	<i>Potri.002G089900.1</i>	<i>AT1G77850.1</i>	<i>AtAux/IAA17</i>	8.17	nd	auxin signalling transcription factor
<i>PtaARF17.2</i>	<i>Potri.005G171300.1</i>	<i>AT1G77850.1</i>	<i>AtAux/IAA17</i>	10.2	nd	auxin signalling transcription factor
Other hormone cross-talk pathway						
<i>PtaGAL2</i>	<i>Potri.008G131700.1</i>	<i>AT2G01570.1</i>	<i>AtRGA1</i>	8.09	720	gibberellin signalling pathway
<i>Pt.GAL1</i>	<i>Potri.010G110700.1</i>	<i>AT2G01570.1</i>	<i>AtRGA1</i>	5.49	740	gibberellin signalling pathway
	<i>Potri.004G089800.2</i>	<i>AT2G01570.1</i>	<i>AtRGA1</i>	4.75*	nd	gibberellin signalling pathway
	<i>Potri.017G125200.1</i>	<i>AT2G01570.1</i>	<i>AtRGA1</i>	3.73	nd	gibberellin signalling pathway
<i>PtaBES1.2</i>	<i>Potri.002G133700.1</i>	<i>AT1G75080.1</i>	<i>AtBZR1</i>	2.41	1,946	brassinosteroid signalling pathway
	<i>Potri.007G030700.1</i>	<i>AT1G75080.1</i>	<i>AtBZR1</i>	3.26	4,191	brassinosteroid signalling pathway
<i>PtaBES1.1</i>	<i>Potri.014G041600.1</i>	<i>AT1G75080.1</i>	<i>AtBZR1</i>	3.58	847	brassinosteroid signalling pathway
	<i>Potri.005G126400.1</i>	<i>AT1G75080.1</i>	<i>AtBZR1</i>	3.68	1,965	brassinosteroid signalling pathway
	<i>Potri.001G131800.1</i>	<i>AT1G31880.1</i>	<i>AtBRX</i>	4.29	517	decrease of brassinosteroid biosynthesis
	<i>Potri.008G121500.1</i>	<i>AT1G68460.1</i>	<i>AtIPT1</i>	3.29	nd	cytokinin biosynthesis
	<i>Potri.016G044100.1</i>	<i>AT2G41510.1</i>	<i>AtCKX1</i>	-2.67	617	cytokinin degradation
	<i>Potri.002G030500.1</i>	<i>AT1G75450.1</i>	<i>AtCKX5</i>	5.85	nd	cytokinin degradation
	<i>Potri.005G232300.1</i>	<i>AT1G75450.1</i>	<i>AtCKX5</i>	7.25	nd	cytokinin degradation
	<i>Potri.006G221000.1</i>	<i>AT5G21482.1</i>	<i>AtCKX7</i>	8.52	nd	cytokinin degradation
	<i>Potri.014G164700.1</i>	<i>AT5G35750.1</i>	<i>AtAHK2</i>	-2.14	1,922	cytokinin signalling
	<i>Potri.018G009700.1</i>	<i>AT5G10720.1</i>	<i>AtAHK5</i>	-2.28	2,005	cytokinin signalling
	<i>Potri.001G094800.1</i>	<i>AT4G23750.1</i>	<i>AtCRF2</i>	7.77	nd	cytokinin signalling
<i>PtaERF88</i>	<i>Potri.003G136300.1</i>	<i>AT4G23750.1</i>	<i>AtCRF2</i>	12.01	nd	cytokinin signalling
	<i>Potri.019G131300.1</i>	<i>AT4G27950.1</i>	<i>AtCRF4</i>	9.71	608	cytokinin signalling
	<i>Potri.013G158500.1</i>	<i>AT4G27950.1</i>	<i>AtCRF4</i>	10.65	454	cytokinin signalling

^aGenes names as referred in phytozome *Populus trichocarpa* genome version 9.0 or annotate genes in Kalluri et al., 2007, Felten et al., 2009 and Carraro et al., 2012 ; ^b Genes ID from phytozome version 9.0; ^c *A. thaliana* gene ID and name orthologue to *Populus* gene ID (Phytozome annotation); ^dFold change of fluorescence level in mycorrhizal roots compare to the control roots; ^e Level of fluorescence in the control roots, ^fLitterature annotation of the protein associate function. nd: under the average range of detection

cells located at the interface with *L. bicolor* hyphae (Fig. 2D). The root area accumulating GUS staining confirmed the significant decrease both in colonised and in mature ECM root tips (Fig. 2E), suggesting that the alteration in *DR5* directed GUS expression preceded the Hartig net formation. We also analyzed the response of roots to auxin application in LR as well as in mature ECM. As expected, auxin application (10 μ M IAA or NAA) for 16 h to control roots ectopically increased the expression of *DR5::GUS* in the entire LR including root meristem and elongation/differentiation zone (Fig. 2G, H). In contrast, an application of 10 μ M IAA or NAA did not change the GUS expression pattern in ECM root tips (Fig. 2J, K). The GUS staining remained localized in a restricted zone, indicating that ECM development impaired the auxin response in root.

Arrest of root growth is associated to changes in the expression of auxin-related genes

To identify alteration auxin-signalling genes with a differential expression during ECM, an oligo array-based transcript profiling was carried out on three week-old ECM and control LR. A total of 7,091 plant transcripts, corresponding to 16% of the predicted gene models in *Populus trichocarpa* gene repertoire V7 (Phytozome, 43,929 genes), were differentially expressed in ECM compared to control LR (fold change >2, Benjamini and Hochberg-corrected ANOVA p -value < 0.05; Supplemental Table S1), reflecting a striking transcriptome re-organisation in ECM roots. Among these transcripts, 60% (4,256 genes) were upregulated. From the 2,835 down-regulated transcripts, 38% (corresponding to 1,072 genes) were expressed in control LR but were no longer detected in ECM roots. Several genes known to be involved in root meristem development in *Arabidopsis* showed differential expression in ECM roots (Table 1). Among these genes, members of protein families involved in cytokinin, gibberellin and brassinosteroid signalling pathways showed a differential expression that can be related to the root growth arrest phenotype.

An enrichment of IAA response genes in ECM-regulated genes was assessed through a randomization test (p -value < 0.05; See Materials and Methods). We investigated whether the overlap between two sets of genes was higher than expected by chance using comparisons of the ECM root regulated genes set with two IAA-regulated gene sets, (I) IAA-regulated genes in *Arabidopsis* (Nemhauser *et al.*, 2006), and (II) IAA-induced genes in differentiated poplar stem wood tissues (Nilsson *et al.*, 2008). The two sets I and II were compared to each other (p -value=0) and both sets were then compared to the set of

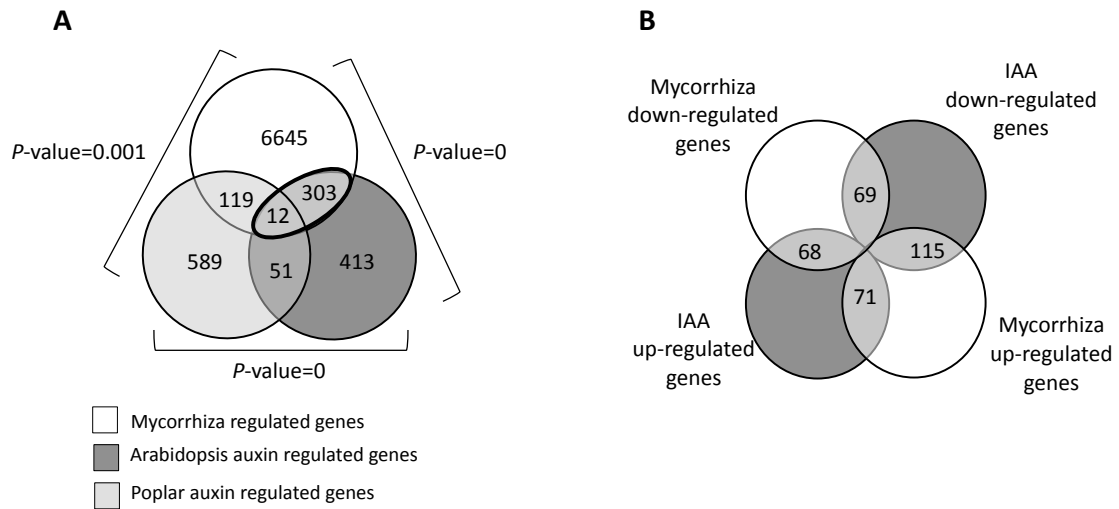


Figure 3. Enrichment in auxin response genes in mature ECM

A, Randomization tests were made between mature ECM regulated genes (white area; 3-weeks differentially regulated genes), and two sets of auxin regulated genes: (I) poplar homologs of *Arabidopsis* auxin response genes (dark grey area; Nemhauser *et al.*, 2006; Phytozom 7.0 annotation) and (II) Poplar auxin response genes in wood forming tissues (grey area; Nilsson *et al.*, 2008). The Venn diagram shows the overlap between these lists. The *p-value* of the randomization test (See Material and Methods) is noted outside the brackets.

B, The overlap between auxin regulated list (I) and mature ECM regulated genes list was used for the observation of antagonism and synergism of differential gene expression.

differentially expressed genes in ECM (Fig. 3A). Enrichment in auxin response genes of each set was found in ECM regulated genes (p -value < 0.05). To confirm this finding, the response of four ECM-regulated genes to applied exogenous IAA was assessed. The four genes tested, *PtaGH3-1*, *PtaAux/IAA3-3*, *PtaAux/IAA20-2* and *PtaAux/IAA28-1* showed differentially expression patterns after 2 h of 10 μ M IAA application (Supplemental Fig. S1). We further investigated the antagonistic or synergistic response of genes regulated by exogenous IAA and ECM formation respectively, by using the overlap of ECM-regulated and IAA-regulated genes (set I). Generally we found that 140 genes showed a synergistic expression pattern (being either up or down regulated in both IAA treatment and ECM) and 193 genes showed an antagonistic response pattern (Fig. 3B; Supplemental Table 2).

We then focussed on the regulation of genes involved in auxin pathways (Table 1). Within the genes coding for proteins involved in IAA biosynthesis, we found higher transcript abundance in ECM for *PtaTAA1*, *PtaYUCCA2*, *PtaYUCCA6-1* and *PtaYUCCA6-2*. In addition, *PtaGH3-1*, *PtaGH3-2* and *PtaGH3-7*, coding for acyl-amido-synthase enzyme involved in IAA conjugation, were found upregulated in ECM (Table 1). Regarding genes implicated in polar auxin transport, we found four genes belonging to the PIN family, *PtaPIN3*, *PtaPIN6*, *PtaPIN8*, and *PtaPIN9*, to be differentially expressed. Transcripts coding for several genes for ABCB transporter accumulated differentially in ECM, for example *PtaABCB5* which is considered to be an ortholog of *AtABCB4* and *PtaABCB19*, an ortholog of *AtABCB19* (Carraro *et al.*, 2012). In addition, we noted transcript accumulation for several AUX/LAX family members such as *PtaAUX8/LAX4*, *PtaAUX8/LAX8* and *PtaAUX2/LAX1*.

Our oligo array profiling also revealed differential transcript abundance for genes known to be implicated in IAA signalling. Seven members of the *PtaAux/IAA* family (Kalluri *et al.*, 2007), *PtaAux/IAA3.3*, *PtaAux/IAA3.4*, *PtaAux/IAA12.1*, *PtaAux/IAA15*, *PtaAux/IAA20.2*, *PtaAux/IAA28-1* and *PtaAux/IAA28-2* were differentially expressed in ECM roots as compared to non mycorrhizal roots. Transcripts of two transcription factors, *PtaARF2.4* and *PtaARF17.2* showed a higher accumulation in ECM roots.

We validated the expression of several genes described above using quantitative real-time PCR analysis in a separated experiment with new biological material. We showed that transcripts of *PtaGH3-1*, *PtaAux/IAA3-3*, *PtaAux/IAA12-1*, *PtaAux/IAA28.1*, *PtaAux/IAA20-2*, *PtaAux/IAA3-4*, *PtaABCG37.1* and *PtaTAA1* showed the same expression pattern in ECM

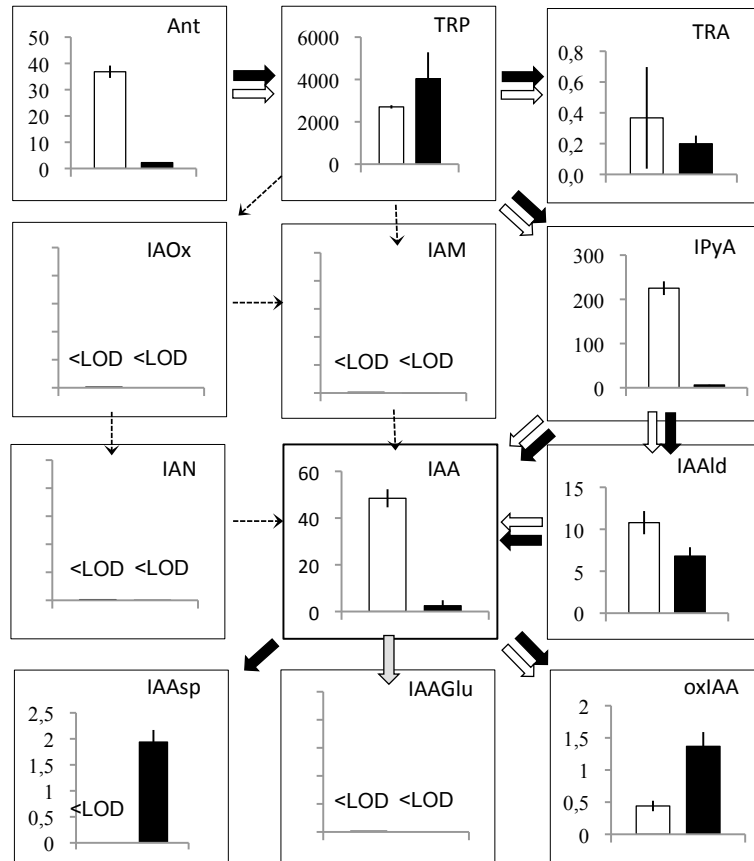


Figure 4. Auxin metabolome in *L. bicolor* mycelium and in poplar root apices in control condition

Measurement of auxin metabolites in *L. bicolor* hyphae (white bar) and in *P. tremula x P. alba* root apices (black bar), grown separately under the same culture conditions for ten days or three weeks, respectively. The content of each compound is represented in pg/mg of fresh weight (FW). Black and white arrows indicate the putative pathways involved in IAA metabolism in *L. bicolor* hyphae and poplar root tips, respectively (according to (Novák et al., 2012)). Dashed arrows indicate metabolic pathways and metabolites, under the detection limit (<LOD) in our samples.

ANT, anthranilate; IAA, indole-3-acetic acid; IAAGlu, IAA-glutamate; IAAlc, indole-3-acetaldehyde; IAAsp, IAA-aspartate; IAM, indole-3-acetamide; IAN, indole-3-acetonitrile; IAOx, indole-3-acetaldoxime; IPyA, indole-3-pyruvic acid; oxIAA, 2-oxindole-3-acetic acid; TRA, Tryptamine; Trp, L-tryptophan.

versus control roots as observed with microarrays. The differential expression of *PtaIAA3-3* and *PtaPIN9* was not confirmed (Supplemental Figure S2).

Thus, the present genome-wide transcriptional analysis identified auxin-dependent genes that are differentially expressed in ECM roots. The symbiosis-related gene families are involved in auxin biosynthesis, transport and signalling.

Auxin metabolite analysis reveals distinct auxin pathways in *L. bicolor* mycelium and *Populus* root tips

Altered auxin response pattern in ECM roots as well as changes in the expression of auxin-related genes are likely to induce alterations in the auxin metabolome in ECM roots. We therefore quantified IAA and eleven of its metabolites (precursors, catabolites and conjugates) in free-living mycelium of *L. bicolor* and in non mycorrhizal *P. tremula* x *P. alba* root apices (Fig. 4). The concentration of free IAA was 49 pg.mg⁻¹ FW in *L. bicolor* free-living mycelium. Precursors of IAA biosynthesis, such as anthranilate (Ant; 37 pg.mg⁻¹ FW), Trp (2,705 pg.mg⁻¹ FW), TRA (37 pg.mg⁻¹ FW) and IPyA (255 pg.mg⁻¹ FW), were also detected. The concentration of several IAA biosynthesis intermediates was below the detection limit, including IAOx, IAM and indole-3-acetonitrile (IAN). Our data indicate that only two IAA biosynthesis pathways exist in *L. bicolor*: the TRA- and the IPyA-dependent pathways. IAA-amino acid conjugates, such as IAA-Aspartate (IAAsp) and IAA-Glutamate (IAGlu), were not detected. The IAA catabolite oxIAA (2-oxoindole-3-acetic acid) was also detected in *L. bicolor* mycelium at a concentration of 0.4 ng mg⁻¹ FW. Consistent with these results, an addition of 10 μM IAA to *L. bicolor* growth medium induced an eight-fold higher IAA concentration compared to the control mycelium and also a four-fold higher oxIAA concentration (Supplementary Figure S3), while the IAA conjugates were still below the detection limit. Exogenous IAA treatment also caused a decrease in the levels of the IAA precursors Ant, Trp and IPyA, possibly due to feedback inhibition of specific pathways upstream of IAA (Supplementary Figure S3).

The IAA biosynthesis pathways are well known in *Arabidopsis*, but have to date not yet been elucidated in poplar roots. In poplar root apices, the free IAA level was 2.5 pg.mg⁻¹ FW (Fig. 4). The intermediates of IAA biosynthesis, such as IAOx, IAM and IAN, were not detected, neither in root samples of *P. tremula* x *P. alba*, (Fig. 4 and Supplemental Figure S4) nor in

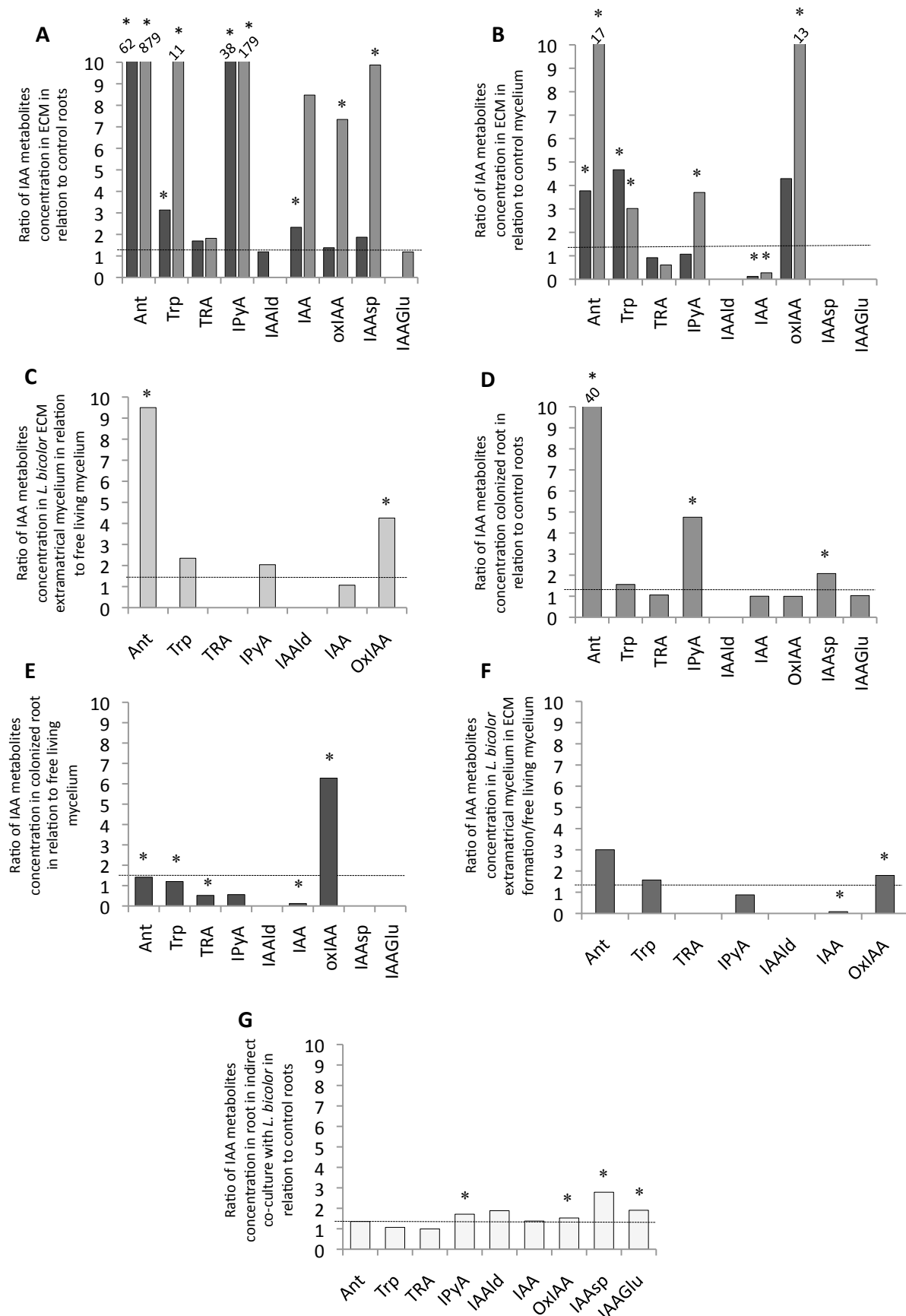


Figure 5. Poplar/*L. bicolor* interaction remodels the auxin metabolome in both partners
 Key next page

poplar leaves (Supplemental Figure S4). The major degradation product of IAA, oxIAA, was found in poplar roots (1.4 pg.mg⁻¹ FW ; Fig. 4). Regarding IAA-conjugation pathways, the conjugated product IAAsp was detected in these samples (2 pg.mg⁻¹ FW) whereas we found no trace of IAGlu. That said, IAGlu was observed to be present in the tips of young root (Supplementary Figure 4), suggesting a regulation of IAA-conjugation pathways during poplar root development.

When we compared the IAA metabolites in both partners grown under the same conditions, much higher concentrations of IAA and the IAA precursors Ant and IPyA were found in *L. bicolor* compared to poplar roots (Fig. 4), suggesting a higher rate of IAA biosynthesis in *L. bicolor* mycelium.

Auxin associated metabolites accumulate in contact with *L.bicolor*

Auxin associated metabolites accumulate in mature ECM roots

We then quantified IAA and its metabolites in mature ECM roots from two independent biological experiments, I and II, in which six and four biological replicates were present, respectively. In order to dissect the changes in the auxin metabolome of each partner, we first established the ratio of concentration for each compound found in mature ECM roots compared to control LR (Fig. 5A). Even if the ratios were different for the two experiments, likely due to differences in mycelium/root sampling in experiment II, we found consistent changes in IAA related metabolites. In experiment I, the concentration of IAA was statistically 2-fold higher whereas in experiment II its concentration was 8-fold higher (from 6 to 13 ng.mg⁻¹) in ECM compared to roots. In addition, we detected a significant increase of Ant, Trp and IPyA content in ECM roots compared to the control roots. In experiment II, both the IAAsp conjugate and the degradation product oxIAA showed a 7-fold higher concentration in ECM root samples. We then calculated the concentration ratio for each compound obtained in mature ECM to free-living mycelium (Fig. 5B). Under these conditions, an increase of the metabolites associated to IAA biosynthesis was detected, including Ant, Trp and IPyA. However, a significant decrease of IAA and an increase of oxIAA metabolite were observed. We also quantified IAA and its metabolites in extramatrical mycelium expanding from ECM roots and the comparison was made to those in free-living

Figure 5. Poplar/*L. bicolor* interaction remodels the auxin metabolome in both partners

A to C, IAA metabolites in ECM mature root. Ratio of IAA and its associated metabolites in (A) ECM in relation to those of control roots (LR); (B) ECM in relation to those of *L. bicolor* free-living mycelium, from two independent biological experiments I and II (dark and grey bars respectively); (C) in *L. bicolor* extrametrical mycelium from ECM in relation to those of *L. bicolor* free living mycelium.

D to G, IAA and its metabolites in ECM formation after one week of co-culture. (D), in colonized roots (after 1 week of co-culture) in relation to those of control condition (LR); (E) in colonized roots (after 1 week of co-culture) in relation to those of *L. bicolor* free-living mycelium; Ratio of IAA and its associated metabolites in (F) *L. bicolor* extrametrical mycelium from colonized roots (after 1 week of co-culture) in relation to those of *L. bicolor* free living mycelium; (G); in root apices (after 1 week of indirect co-culture, through a cellophane membrane) in relation to those of control condition.

Asterisks indicate significant difference between control and co-culture root with a Student's test according to a Fisher test, P -value <0.05 , (n=4 to 6). ANT, anthranilate; IAA, indole-3-acetic acid; IAGlu, IAA-glutamate; IAAlD, indole-3-acetaldehyde; IAAsp, IAA-aspartate; IPyA, indole-3-pyruvic acid; oxIAA, 2-oxoindole-3-acetic acid; TRA, Tryptamine, Trp, L-tryptophan.

mycelium (Fig. 5C). Although this extramatrical hyphae contained a nearly 10-fold higher concentration of Ant, they contained a similar IAA concentration as free living mycelium, suggesting that Ant might be involved in the synthesis of other secondary metabolites (Tzin and Galili, 2010). Additionally, we detected a 4-fold higher concentration of oxIAA (Fig. 5C), illustrating an increase of IAA degradation in response to the interaction with poplar roots.

ECM formation remodels the auxin metabolome

We also investigate auxin metabolite changes in poplar-*L. bicolor* co-cultures one week after contact (Fig. 5D). At this stage, a discontinuous mycelium is attached to the root surface and no visible change in root morphology is observed (Felten *et al.*, 2009). The concentration ratio for each compound detected in colonized roots compared to those obtained in control LR did not reveal any significant change in IAA concentration in poplar root tips (Fig. 5D, around 6 pg.mg⁻¹ FW). However, a significantly higher concentration of Ant, IPyA and IAAsp conjugates was detected, (52 pg.mg⁻¹ FW, 3249 pg.mg⁻¹ FW and 0.8 pg.mg⁻¹ FW respectively). When we calculated the concentration ratio for each compound identified after one week of colonization with those of free-living mycelium, we noted a significant decrease of IAA and 6-fold increase of oxIAA concentration (Fig. 5E). The extramatrical mycelium also contained a significant lower IAA concentration (4 pg.mg⁻¹ FW) together with a larger amount of oxIAA when compared to free-living mycelium (Fig. 5F).

After one week of co-culture without direct physical contact (indirect contact, through a cellophane membrane) no change in IAA concentration was observed in root tips compared to control root tips (Fig. 5G). However, higher concentration of IPyA, oxIAA, IAAsp and IAAGlu conjugates were detected, suggesting that *L. bicolor* diffusible compounds activate the IPyA-dependent biosynthesis pathway as well as IAA conjugation and degradation pathways.

DISCUSSION

We investigated here the impact of the *L. bicolor* on formation on poplar root growth in ECM formation. Then, we investigate the auxin response, auxin-related gene expression in *Populus* roots and the auxin metabolome in both partners. We showed that between poplar and *L. bicolor* is leading to an arrest of root growth after one week *in vitro* co-culture. The observed root growth arrest may partly be explain by an insensitivity of local auxin response during the poplar-*L. bicolor* interaction as showed by the *DR5::GUS* roots. Our genome-wide transcriptomic profiling revealed that half of genes involved in auxin signalling are upregulated, but the other half are downregulated. In parallel, the metabolomic analysis suggests that the observed changes in IAA homeostasis in ECM activate divergent regulation of IAA metabolism pathways in each symbiotic partner. We hypothesize here that the high IAA concentration detected in mature ECM is facilitated by the activation of IPyA-dependent synthesis. We also propose that the higher IAAsp concentration observed in ECM results from an increase in IAA conjugation through activation of GH3 genes. Taking into consideration all of our data, we propose a central role of IAA in ECM establishment and maintenance through dual auxin signalling pathways.

Auxin production in poplar ECM might contribute to arrested root growth

Owing to the fact that intermingling fungal and plant cells form ECM root was not possible to dissect the IAA concentration in each partner. We however found that the concentration of IAA and the IAA synthesis precursors were higher than in ECM by comparison to control LR root tips, illustrating a dramatic change of the root IAA environment during mycelium colonization. The IAA concentration detected in ECM roots was between 6 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ FW, depending on the samples, corresponding to a molar concentration of 30 to 140 $\text{pM}\cdot\text{mg}^{-1}$ of FW. It is well known that optimal IAA levels are required for the regulation of root growth (Thimann, 1938). We hypothesize that ECM roots contain suboptimal endogenous auxin levels, which then lead to inhibitory effects on root growth. In addition, we propose that microbial auxin may have a role in interfering with plant developmental pathways and in altering auxin biosynthesis and signalling in the host plant.

The IAA metabolome revealed activity of only two of the four known Trp-dependent (IPyA, TRA, IAOx, IAM) IAA biosynthesis pathways in poplar *P. tremula* x *P. alba* roots and *L. bicolor* mycelium, namely the IPyA and TRA pathways. The IPyA pathway is predominant in poplar, as described also for other plant species (Sugawara *et al.*, 2009; Novák *et al.*, 2012; Ljung, 2013). The IPyA-dependant pathway is activated in the host plant during the indirect contact with *L. bicolor*. Also, a higher IPyA concentration was also found in mature ECM roots but not in extramatrical hyphae when compared to free living mycelium. This data suggests an involvement of poplar IAA biosynthesis in the accumulation of IAA in mature ECM roots, which ultimately lead to change auxin homeostasis in host root.

Dual auxin signalling in ECM root: loss of sensitivity to auxin and an activation of auxin signalling

The local auxin gradient in root apices is believed to be essential for the regulation of root growth (Overvoorde *et al.*, 2010). Our study performed in roots of *Populus DR5::GUS* plants revealed a gradual decrease of auxin response during the establishment of ECM, which could possibly be related to the progressive inhibition of root growth. The same observation has been made in the IAA-response of *GH3::GUS* poplar in interaction with *P. involitus* (Luo *et al.*, 2009). A similar dramatic decrease of *DR5::GUS* pattern was observed in conditions with low-P availability in Arabidopsis roots, a change that correlated with a decrease in meristematic activity and thus arrested root growth (López-Bucio *et al.*, 2003). Associated with this effect is that an IAA or NAA application on ECM roots did not change the GUS expression pattern in root apices of *DR5::GUS* poplar plants. This surprising observation in the context of auxin accumulation in ECM suggests that poplar roots lose their ability to respond to auxin during the colonization by ECM fungi. Consistent with this observation is our micro-arrays data, which clearly highlights significant down-regulation of some genes known to be regulated by auxin and some members of auxin-response *PtaAux/IAA* family, such as *PtaIAA3.3*, *PtaIAA3.4*.

Conversely, the relatively high IAA environment detected in mature ECM roots is accompanied by the activation of a part of the auxin signalling. *PtaIAA20.2*, *PtaIAA15*, *PtaIAA12.1*, *PtaARF2.4* and *PtaARF17.2* are upregulated in mycorrhiza. The higher expression of some *PtaGH3* members including *PtaGH3-1*, *PtaGH3-2* is in accordance with the high IAA concentration detected in mature ECM. We also show the capacity of IAA to

stimulate the expression of *PtaGH3-1* in poplar root. *PtaGH3* proteins sequence founded regulated in ECM roots show homology with *Arabidopsis* group II AtGH3 proteins (Felten *et al.*, 2009), which are IAA-amino synthases with the function to maintain IAA homeostasis by conjugating excess IAA to amino acids (Staswick *et al.*, 2005). This data may be correlated with metabolomic results. Since IAA conjugation has not been detected in free-living *L. bicolor* mycelium, we predict that the higher IAAsp concentration observed in mature ECM is derived from the activation of the IAA conjugation pathway through IAAsp formation in poplar root tips since an increase in IAAsp concentration is detected after one week of co-culture. Additionally, we predict that degradation pathways are activated in the host plant in response to *L. bicolor*. These pathways are known to regulate auxin homeostasis and are activated in response to exogenous auxin (Ljung, 2013).

Regulation of auxin concentrations in ECM mediates root colonization by *L. bicolor*

Activated expression of the *GH3* family member was also observed as a response to the presence of plant pathogenic microbes during the fungi colonization (Ding *et al.*, 2008) (González-Lamothe *et al.*, 2012). The IAA production by the fungal partner was described to have a role in the ECM symbiotic organ formation, certainly at least in hyphal penetration of the apoplastic space between epidermal cells during Hartig net formation (Gay and Debaud, 1987; Tranvan *et al.*, 2000) by contributing to the cell wall degradation (Hager, 2003). The formation of mature ECM with an IAA over-expressing fungus leads to a deeper Hartig net involving also cortex and not just epidermis cells (Durand *et al.*, 1992; Gay *et al.*, 1994; Tranvan *et al.*, 2000). During pathogenic interactions it has been suggested that IAA holds a central role in controlling vulnerability of plants to invaders (Ding *et al.*, 2008). All of this data suggests that GH3 enzymes, which are produced by the plant, are likely to allow regulation of the physiological active form of IAA in host cells and finally, inhibit the progression of fungal invasion and Hartig net formation. In addition, a significant decrease of IAA in the poplar root-*L. bicolor* organ after one week of co-culture was observed as well as in extramatrical hyphae when compared to free-living hyphae. Thus, we are hypothesizing here that the production and secretion of an unknown signal from the plant holds the ability to induce changes in auxin homeostasis in the fungus. This signal will thus limit the IAA of the fungi which then limits colonization.

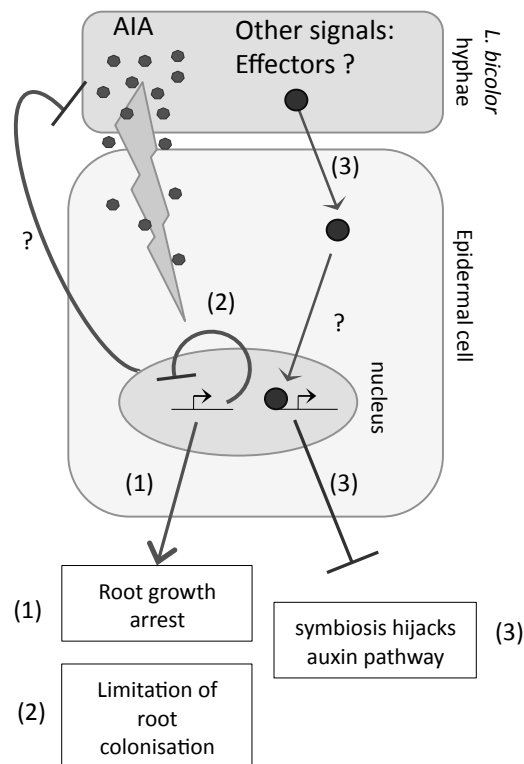


Figure 6. Hypothetical model illustrating the involvement auxin signalling pathways during the establishment of *L. bicolor*-poplar ECM roots.

(1) Auxin produced and secreted in *L. bicolor* hyphae, acts as an effector and activates auxin signalling pathways in host plant, contributing thus to the inhibition of root growth. (2) A resistance-mechanism from the plant which can self-inhibit its own auxin signalling pathway, and finally control the colonization of the fungal mycelium between the epidermal cells. An additional unidentified signal can inhibit the IAA production in *L. bicolor*. (3) Additionally, an unidentified signal secreted from *L. bicolor* can hijack the plant auxin signalling pathways.

CONCLUSION

All data taken into consideration, we would like to propose a hypothetical model illustrating both the activation and inhibition of auxin signalling pathways during the establishment of *L. bicolor*-poplar ECM roots (Fig. 6). In the first pathway, auxin was observed to be produced and secreted by *L. bicolor* mycelium and might act as an effector in turn triggering auxin signalling pathways in the host plant, contributing thus to the root growth inhibition. We can also hypothesize, considering that some auxin signalling pathways are repressed in poplar roots and, since ECM roots lose their ability to respond to exogenous auxin, that a resistance mechanism originating from the plant might self-inhibit its own auxin signalling pathway and in doing so, could contribute to limited fungal colonization in the epidermis. We cannot exclude that another unknown signal might inhibit the IAA production in *L. bicolor*. *L. bicolor* mycelium produces small secreted proteins in contact with host plants, which can enter into the nucleus of the epidermal cell and thus, regulate the expression of auxin-associated genes (Plett *et al.*, 2011). We would also hypothesize that there exists a signal to be identified originating from *L. bicolor* capable of hijack auxin-signalling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Plant and fungi material and growth conditions

Experiments were performed with the hybrid poplar (*Populus tremula* x *Populus alba*; INRA clone 717-1-B4) and the transgenic hybrid aspen *Populus tremula* x *Populus tremuloides* DR5::GUS line. Plants were micro-propagated *in vitro* and grown on half-strength Murashige and Skoog (MS/2) medium (Murashige and Skoog, 1962) in glass culture tubes under a 16-h photoperiod at 24°C in growth chambers. The dikaryotic vegetative mycelium of the ectomycorrhizal fungus *L. bicolor* strain S238N (Maire P.D. Orton) was maintained at 25°C on modified Pachlewski medium P5 in the darkness (Deveau *et al.*, 2007). For auxin metabolite quantification, vegetative mycelium of *L. bicolor* was grown for 10 days, in the darkness, on a cellophane-covered agar plate containing a sugar-reduced Pachlewski medium (Deveau *et al.*, 2007).

For *in vitro* co-culture of *Populus* with *L. bicolor*, we used an existing sandwich co-culture system described by Felten *et al.* (2009). Briefly, rooted stem cuttings from *in vitro* grown *Populus* plants were transferred to Petri dishes containing Pachlewski medium, covered by a cellophane membrane. A mycelium-covered cellophane membrane was placed fungus side down (for direct interaction) or fungus side up (for indirect interaction) on the roots. Petri-dishes for co-cultures were arranged vertically and the lower part of the dish was covered with a small piece of black plastic.

Analysis of root growth

Lateral and adventitious root length was measured in eight individual poplar plants (two or three per Petri dish) in corresponding conditions on images of scanned (EPSON scanner) culture plates using an Image-J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and the SMART ROOT plugin (Lobet *et al.*, 2011). Root lengths were measured at the co-culture time point zero and after 1, 2 or 3 weeks of co-culture with *L. bicolor*.

Analysis of GUS activity

Control LRs, roots of plants grown in co-culture with *L. bicolor* or roots of poplar plants incubated in MS/2 medium containing 10 μ M of indole-3-acetic acid (IAA, Sigma-Aldrich) or α -Naphthalene acetic acid (NAA, Sigma-Aldrich) for 16 h were collected for GUS staining. Roots were then washed three times with MS/2 medium and once with distilled water prior to the GUS tests. β -glucuronidase (GUS) activity was detected in whole root system as described by (Scarpella *et al.*, 2004). All root, system were submerged in 5 ml of GUS staining solution under a vacuum, and samples were incubated at 37°C in the dark for at maximum 2 h. Representative photographs of each line were taken using a Zeiss stereomicroscope (Carl Zeiss Microimaging). Photographs were taken with an AxioCamMRm (Zeiss) camera.

Different GUS detections in mature ECM were tested; samples were incubated in the GUS staining solution entirely or in 60 to 80 μ M sections imbedded in 6% agarose (according to (Svistoonoff *et al.*, 2004) at different times points in the GUS staining solution. The same GUS phenotype was observed in mature ECM root in all protocols as described in Figure 2 (Data not shown).

Quantification of IAA metabolites

For quantification of IAA and its metabolites in poplar LR and in poplar-*L. bicolor* co-culture samples, the first 1 cm of poplar root tips were harvested. Five to six replicates of 20 mg of fresh tissue corresponding to around twenty-five root apices were collected in the respective condition. For quantification of IAA and its metabolites in *L. bicolor* vegetative mycelium, five replicates of 10 mg fresh tissue were harvested, corresponding to four Petri dish cultures for each sample. IAA metabolite measurements of *L. bicolor* tissue in response to IAA treatment was performed on *L. bicolor* mycelium grown for 10 days on Pachlewski medium containing 10 μ M IAA (Sigma-Aldrich). All samples were weighed, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. Quantification of IAA and its metabolites was carried out by LC-MRM-MS (liquid chromatography/ multiple reaction monitoring/mass spectrometry) in accordance with (Novák *et al.*, 2012).

RNA extraction and complementary DNA synthesis

For microarray experiments and for quantitative reverse transcription PCR analyses, three pools of six individual root systems from poplar LR roots as controls or from ECM plants (at three weeks of poplar-*L. bicolor* co-culture) were harvested in two independent experimental series, immediately frozen in liquid nitrogen and then kept at -80°C before RNA extraction.

For the analysis of IAA dependant-response genes in poplar, the root system of three week-old plants were incubated in 10 μ M indole-3-acetic acid (IAA, Sigma-Aldrich) in MS/2 liquid medium during two or six hours. Roots were then washed three times with MS/2 medium and once with water, immediately frozen in liquid nitrogen and then kept at -80°C before RNA extraction.

Total RNA was extracted from poplar samples using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. An on-column digestion step with DNase I (Quiagen) was included in the extraction process. Validation of RNA quality and integrity as well as RNA quantification were carried out prior to synthesis of complementary DNA (cDNA) using Experion StdSens or HighSens capillary gels (Bio-Rad). The DNA content in RNA samples was tested in quantitative Real-Time PCR using the PtaUBI primers and the protocol below. The cDNAs used for the NimbleGen microarrays were synthesized and amplified using the SMARTer PCR cDNA synthesis Kit (Clontech) according to the manufacturer's

instructions. The cDNA used for the Real-Time PCR was synthesized using the iScript Kit (Bio-Rad).

NimbleGen microarray transcript profiling

A *Populus* whole-genome expression array manufactured by NimbleGen systems based on Phytozome version 5.0 was used for the experiments (GEO platform GPL13485). This chip contained three independent, non identical, 60-mer probes from 43,929 annotated genes models of the *Populus trichocarpa* genome version 2 (Phytozome 5.0). The genome version and gene names of *Populus trichocarpa* changed end of 2012, therefore we added a column in Supplemental Table 1 mentioning the new gene names.

Single-dye labelling of samples, the hybridization procedures, and the data acquisition were all performed at the NimbleGen facilities (Reykjavik, Iceland), following their standard protocol. Three biological replicates were performed for each condition. Microarray probe intensities were normalized across chips using ARRAYSTAR software (DNASTAR). Natural log-transformed data were calculated and subjected to the Cyber-T statistical framework (<http://cybert.ics.uci/>; Baldi and Long, 2001) using the one-way ANOVA multiple condition data module and the data module with the standard Student's *t* test unpaired two condition. ANOVA was followed by Turkey's honestly significant difference pair wise post hoc tests. Benjamini and Hochberg multiple-hypothesis testing correction with false discovery rate were used for both the ANOVA and the Student's *t* test. Transcripts with a *q* value (Baesian posterior *P* value; Storey, 2003) of less than 0.05 for the Benjamini and Hochberg test expression between the two sets of microarray analyses were observed to be significantly different. Randomly designed probes present on the array were used to estimate unspecific hybridization. In addition we filtered our data for very low concentrated transcripts in order to avoid artefacts. We only kept transcripts with an expression level ≥ 300 in at least one condition. The poplar genome contains a large number of duplicated genes. Therefore, we added a column in Supplemental Table1 to indicate genes for which all three probes might risk cross hybridization with other transcripts.

In our data, fold changes $>$ and $<$ 2 at the transcript level were considered as significantly different.

Quantitative real-time PCR

We used ubiquitin (*P. trichocarpa* gene model Potri.015G013600.1 (Gutierrez *et al.*, 2008) and PutA (*P. trichocarpa* gene model Potri.009G093200.1 (Kohler *et al.*, 2004) as reference genes since their expression was not significantly modified in our conditions according to our own and previously reported data (Felten *et al.*, 2009). To design specific primer pairs for our target genes, we used the QuantPrime software (Arvidsson *et al.*, 2008). Specific primer sequences can be found in Supplemental Table S3. Quantitative real-time PCR was performed using SYB Green Supermix (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions, a Chromo4 Light Cycler, and OpticonMonitor software (Bio-Rad). The analysis was performed in three biological replicates, independently from microarray samples. Two or three technical replicates were performed using 2.5 ng of cDNA for each reaction. The cycle number at which the fluorescence crosses the threshold is called Ct value. This threshold was placed at 0.10 for all genes tested. The relative gene expressions were based on Δ Ct calculations using the mean of the two reference genes expressions, according to (Pfaffl, 2001). The Δ Ct values were scaled to the average of the control condition and transformed to \log_2 . The means of the three values are presented with the SE associate values. Student's *t* tests associate with Fisher tests were processed with Microsoft Office Excel.

Randomization test

For this test we used the annotation of hormone-response genes described in Nemhausser *et al.*, (2006) for *Arabidopsis*. We used the Phytozone 5.0 annotation for the identification of *Arabidopsis* orthologs of *Populus trichocarpa* genes from our microarray data (Supplemental Table 2). For this test we made the hypothesis that the orthologs of a hormone-response gene of *Arabidopsis* respond in a similar way as in poplar. Data manipulations were performed with R software (R project website: <http://r-project.org/>). As it has been previously described in (Krouk *et al.*, 2010), we tested whether the overlap between two sets of genes was higher than expected by chance. The test consists of randomly selecting 10,000 genes from the poplar genes present on the microarray chip. We thus counted the number (*n*) of times that the intersection size of the random lists were equal or higher than the intersection observed for two tested genes list. A *P*-value was consequently calculated: $n/10,000$.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank P. Vion and JP Lecler for technical assistance, I. Hummel, M-B. Bogeat-Triboulot and Claire Fourrey for helpful discussions.

LITERATURE CITED

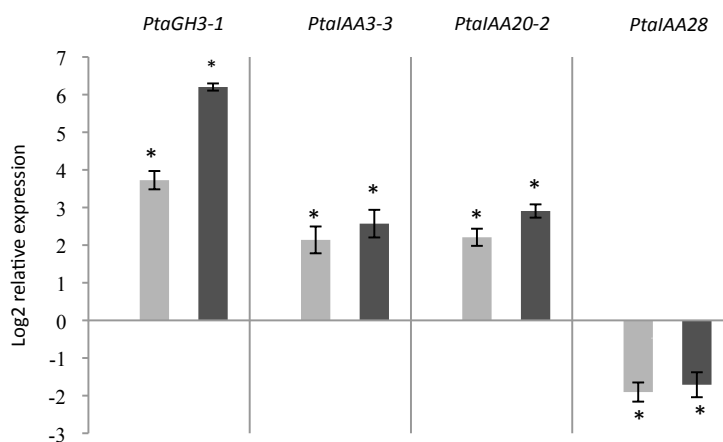
- Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B** (2008) QuantPrime--a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* **9**: 465
- Benkova E, Ivanchenko M, Friml J** (2009) A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends Plant Sci* **14**: 189–193
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N** (1996) In vitro synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza* **6**: 189–196
- Calderon-Villalobos LI, Lee S, Oliveira C De, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard LB, Tan X, Parry G, Mao H, et al** (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* **8**: 477–485
- Carraro N, Tisdale-Orr TE, Clouse RM, Knöllner AS, Spicer R** (2012) Diversification and Expression of the PIN, AUX/LAX, and ABCB Families of Putative Auxin Transporters in *Populus*. *Front Plant Sci* **3**: 17–37
- Chapman EJ, Estelle M** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* **43**: 265–285
- Charvet-Candela V, Hitchin S, Ernst D, Sandermann H, Marmeisse R, Gay G** (2002) Characterization of an Aux/IAA cDNA upregulated in *Pinus pinaster* roots in response to colonization by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytol* **154**: 769–777
- Depuydt S, Hardtke CS** (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* **21**: R365–73
- Deveau a, Palin B, Delaruelle C, Peter M, Kohler a, Pierrat JC, Sarniguet a, Garbaya J, Martin F, Frey-Klett P** (2007) The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytol* **175**: 743–55
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M** (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**: 109–119
- Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X, Wang S** (2008) Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell* **20**: 228–40
- Ditengou F a, Béguiristain 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**: 722–8
- Dreher KA, Brown J, Saw RE, Callis J** (2006) The Arabidopsis Aux / IAA Protein Family Has Diversified in Degradation and Auxin Responsiveness. **18**: 699–714
- Durand N, Debaud JC, Casselton LA, Gay G** (1992) Isolation and preliminary characterization of 5-fluoroindole-resistant and IAA-overproducer mutants of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. *New Phytol* **121**: 545–553
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V** (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* **151**: 1991–2005
- Flores-Monterroso A, Canales J, Torre F de la** (2013) Identification of genes differentially expressed in ectomycorrhizal roots during the *Pinus pinaster*–*Laccaria bicolor* interaction. *Planta* **1–14**
- Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A, Tasaka M** (2005) Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. *Plant J* **44**: 382–395
- Gay G, Debaud JC** (1987) Applied Microbiology Biotechnology Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**: 141–146
- Gay G, NORMAND L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud J c.** (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytol* **128**: 645–657
- González-Lamothe R, El Oirdi M, Brisson N, Bouarab K** (2012) The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell* **24**: 762–777
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre J-F, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, et al** (2008) The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* **6**: 609–618

- Hager A** (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res* **116**: 483–505
- Heller G, Lundén K, Finlay RD, Asiegbu FO, Elfstrand M** (2012) Expression analysis of Clavata1-like and Nodulin21-like genes from *Pinus sylvestris* during ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* **22**: 271–277
- Horan DP, Chilvers GA, Lapeyrie FF** (1988) Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytol* **109**: 451–458
- Kalluri UC, Difazio SP, Brunner AM, Tuskan G a** (2007) Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* **7**: 59
- Karabaghli C, Frey-Klett P, Sotta B, Bonnet M, Le Tacon F** (1998) In vitro effects of *Laccaria bicolor* S238 N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. *Tree Physiol* **18**: 103–111
- Kepinski S, Leyser O** (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446–51
- Kohler A, Blaudez D, Chalot M, Martin F** (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytol* **83**–93
- Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE, Coruzzi GM** (2010) Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol* **11**: R123
- Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943–50
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**: 1090–1104
- Lobet G, Pagès L, Draye X** (2011) A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiol* **157**: 29–39
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280–287
- Ludwig-Muller J** (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* **62**: 1757–1773
- Luo Z-B, Janz D, Jiang X, Göbel C, Wildhagen H, Tan Y, Rennenberg H, Feussner I, Polle A** (2009) Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. *Plant Physiol* **151**: 1902–17
- Martin F, Nehls U** (2009) Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 508–515
- Martin F, Selosse M-A** (2008) The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytol* **180**: 296–310
- Massicotte HB, Peterson RL, E. AA** (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Can J Bot* **65**: 1927–1939
- Nemhauser J, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **467**–475
- Niemi K, Vuorinen T, Ernstsén 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
- Nilsson J, Karlberg A, Antti H, Lopez-Vernaza M, Mellerowicz E, Perrot-Rechenmann C, Sandberg G, Bhalerao RP** (2008) Dissecting the Molecular Basis of the Regulation of Wood Formation by Auxin in Hybrid Aspen. *Plant Cell* **20**: 843–855
- Novák O, Hényková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T, Ljung K** (2012) Tissue-specific profiling of the Arabidopsis thaliana auxin metabolome. *Plant J* **523**–536
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a001537
- Parizot B, Beeckman T** (2013) Genomics of Root Development. *Root genomics soil Interact.* pp 3–28
- Peer WA, Cheng Y, Murphy AS** (2013) Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *J Exp Bot* **64**: 2629–39
- Pencík A, Simonovik B, Petersson S V, Henyková E, Simon S, Greenham K, Zhang Y, Kowalczyk M, Estelle M, Zazimalová E, et al** (2013) Regulation of Auxin Homeostasis and Gradients in Arabidopsis Roots through the Formation of the Indole-3-Acetic Acid Catabolite 2-Oxindole-3-Acetic Acid. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.113.114421
- Petersson S V., Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K** (2009) An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *Plant Cell* **21**: 1659–1668
- Petrásek J, Friml J** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675–88
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45

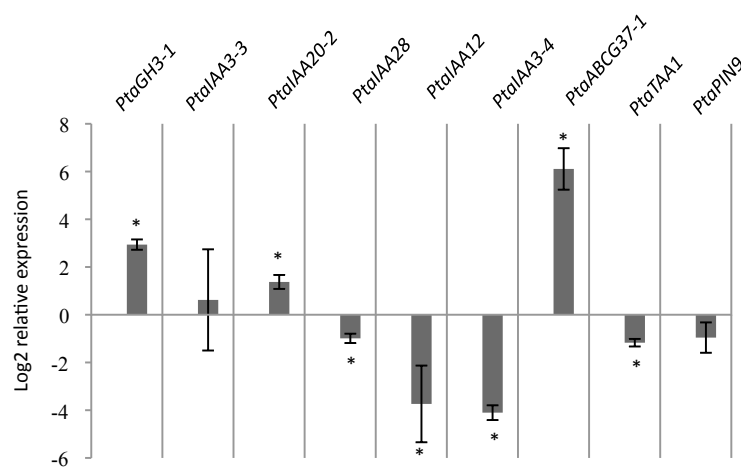
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F** (2011) A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr Biol* **21**: 1197–1203
- Rathnayake AP, Kadono H, Toyooka S, Miwa M** (2008) A novel optical interference technique to measure minute root elongations of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Seibold & Zucc.) seedlings infected with ectomycorrhizal fungi. *Environ Exp Bot* **64**: 314–321
- Reddy SM, Hitchin S, Melayah D, Pandey a K, Raffier C, Henderson J, Marmeisse R, Gay G** (2006) The auxin-inducible GH3 homologue Pp-GH3.16 is downregulated in *Pinus pinaster* root systems on ectomycorrhizal symbiosis establishment. *New Phytol* **170**: 391–400
- Rincón 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 Physiol* **23**: 785–791
- Rosquete MR, Barbez E, Kleine-Vehn J** (2012) Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Mol Plant* **5**: 772–86
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, et al** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**: 463–72
- Scarpella E, Francis P, Berleth T** (2004) Stage-specific markers define early steps of procambium development in *Arabidopsis* leaves and correlate termination of vein formation with mesophyll differentiation. *Development* **131**: 3445–3455
- Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I, Karlovsky P** (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol* **150**: 2018–29
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiriyaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W** (2005) Characterization of an *Arabidopsis* Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *Plant Cell* **17**: 616–627
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H** (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 5430–5
- Sukumar P, Legué V, Vayssières A, Martin F, Tuskan G a, Kalluri UC** (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell Environ* **36**: 909–19
- Svistonoff S, Laplaze L, Liang J, Ribeiro A, Gouveia MC, Auguy F, Fevereiro P, Franche C, Bogusz D** (2004) Infection-Related Activation of the cg12 Promoter Is Conserved between Actinorhizal and Legume-Rhizobia Root Nodule Symbiosis 1. *136*: 3191–3197
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J** (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci C* **63**: 2738–2754
- Tarkka MT, Herrmann S, Wubet T, Feldhahn L, Recht S, Kurth F, Mailänder S, Bönn M, Neef M, Angay O, et al** (2013) OakContigDF159.1, a reference library for studying differential gene expression in *Quercus robur* during controlled biotic interactions: use for quantitative transcriptomic profiling of oak roots in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **199**: 529–540
- Thimann K V** (1938) HORMONES AND THE ANALYSIS OF GROWTH. *Plant Physiol* **13**: 437–449
- 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
- Tzin V, Galili G** (2010) New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant* **3**: 956–72
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**: 309–19
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, et al** (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* **7**: 508
- Wallander H, Nylund E, Sundberg B** (1992) Ectomycorrhiza and nitrogen effects on root IAA: results contrary to current theory. *Mycorrhiza* **1**: 91–92

Supplemental Table S1. List of genes, which transcript level changed in 3 week-old ECM poplar roots in comparison to control LR. The data set includes all genes significantly regulated following criteria: fold change > 2 and Benjamini and Hochberg-corrected ANOVA *P-value* < 0.05.

Supplemental Table S2. List of genes, which transcript level changed in response to auxin and in 3 weeks-old mycorrhiza. The auxin response genes provide provides from previous studies for two sets (1) poplar homologue of *Arabidopsis* auxin response genes (Nemhauser *et al.*, 2006; Phytozom 7.0 annotation) and (2) Poplar auxin response genes in wood forming tissues (Nilsson *et al.*, 2008).



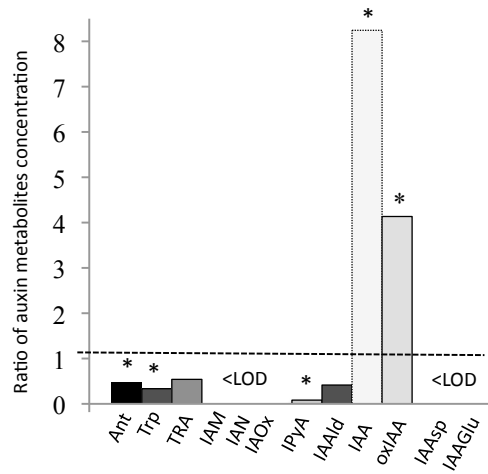
Supplemental Fig. S1. Expression of *PtaGH3-1*, *PtalAA3-3*, *PtalAA20-2* and *PtalAA28-1* in response to IAA 10µM during 2 h (grey bars) and 6 h (dark grey bars). The gene expression was measured by quantitative reverse transcription-PCR method. Expression was normalized to the reference genes and scaled to control root. Levels expression of *PtaPutA* and *PtaUBI* were used as reference genes. Average and SE are derived from the 3 biological replicates. * indicates significant difference, p -value < 0.05 (n=4 to 6) using Student's t test, according to a Fischer test.



Supplemental Fig. S2. Expression of *PtaGH3-1*, *PtalAA20-2*, *PtalAA28*, *PtalAA12*, *PtalAA3-4*, *PtaABCG37-1*, *PtaTAA1* and *PtaPIN9* in 3 week-old ECM

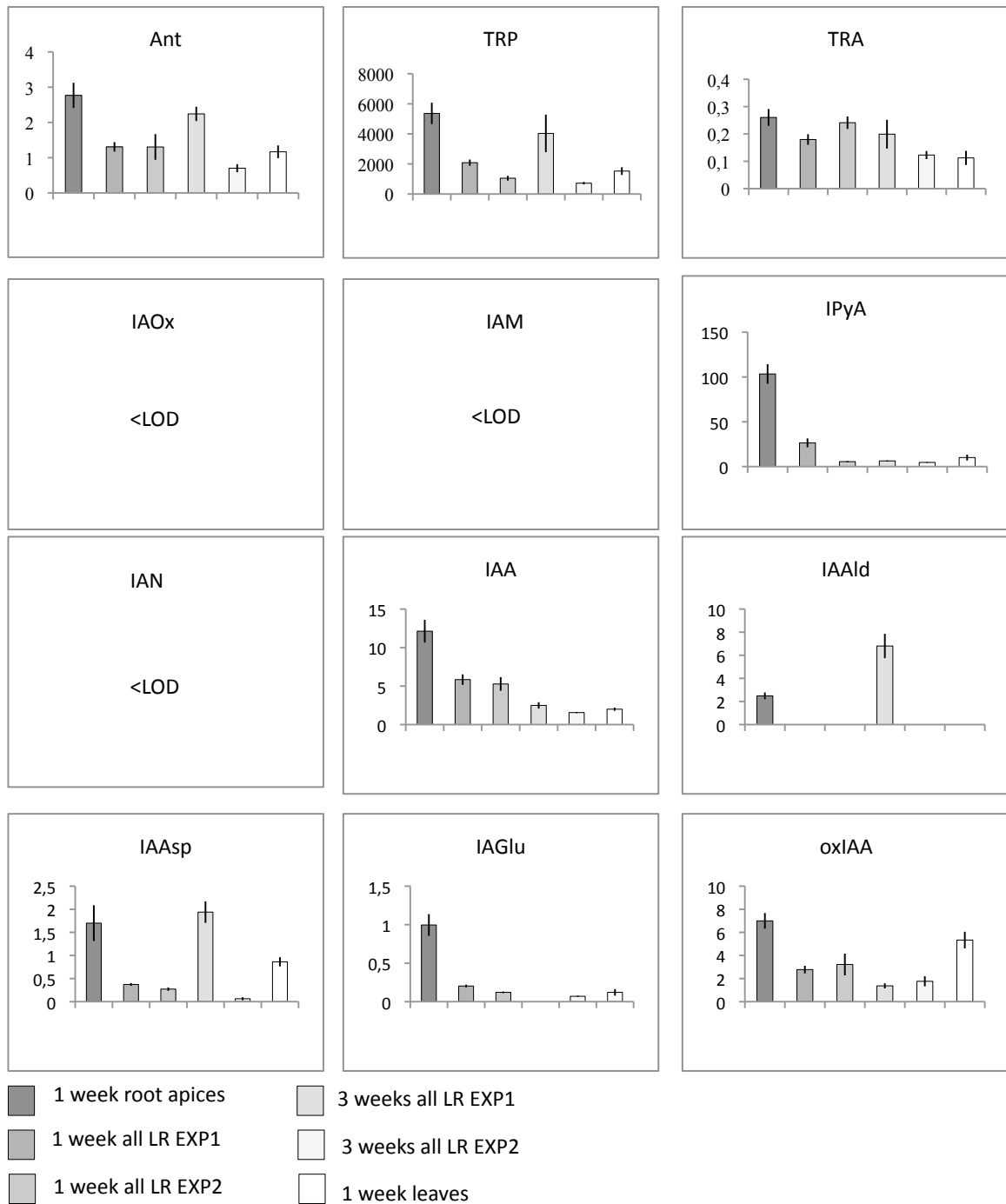
Relative expression of *PtaGH3-1*, *PtalAA4-2*, *PtalAA28*, *PtalAA12*, *PtalAA3-4*, *PtaABCG37-1*, *PtaTAA1* and *PtaPIN9* genes as measured by quantitative RT-PCR in control LR (grey bars) and in 3 week-old ECM poplar roots (black bars). Expressions were normalized to the reference genes and scaled to control LR. We used *PtaPutA* and *PtaUBI* expression as reference genes.

Averages and standard errors are derived from three biological replicates. * indicates significance at a p -value < 0.05 using Student's t test according to a Fisher's test were performed by comparing the two conditions.



Supplemental Fig. S3. Ratio of auxin metabolites content in *L. bicolor* mycelium grown on medium containing 10 μ M of IAA in relation to control mycelium grown on medium without auxin

* indicates significance at a p -value < 0.05 using Student's t test according to a Fisher's test were performed by comparing the two conditions. <LOD, under the detection limite



Supplemental Fig. S4. Measurement of IAA and its associate metabolites in root apices, in all LR and in leaves of poplar plants grown during 1 week or 3 weeks in absence of *L. bicolor*

The content of each compound is represented in pg in pg/mg of fresh weight (FW)

ANT, anthranilate; IAA, indole-3-acetic acid; IAAGlu, IAA-glutamate; IAAlD, indole-3-acetaldehyde; IAAsp, IAA-aspartate; IAM, indole-3-acetamide; IAN, indole-3-acetonitrile; IAOx, indole-3-acetaldoxime; IPyA, indole-3-pyruvic acid; oxIAA, 2-oxoindole-3-acetic acid; TRA, Tryptamine, Trp, L-tryptophan. <LOD, under the detection limite

Partie II : L'arrêt de la croissance racinaire de peuplier est observé en absence de formation du réseau de Hartig

1 Introduction

Dans la littérature, la formation de la racine courte ectomycorhizienne est souvent associée à la présence du réseau de Hartig (Smith & Read, 2008). En effet, les études suggèrent que la présence du manteau fongique puis la mise en place d'hyphes entre les cellules de l'épiderme contribueraient à la formation des racines courtes. Il est supposé que cette contribution proviendrait d'une part, des échanges trophiques entre les deux partenaires et d'autre part, des forces mécaniques exercées par les hyphes denses du manteau fongique.

Nous avons mis en évidence, une inhibition de la croissance de la racine de peuplier (*P. tremula* x *P. alba*) à partir de la première semaine de co-culture avec *L. bicolor* ([Partie I](#)). Cette inhibition conduit progressivement à un arrêt de la croissance entre 2 et 3 semaines ([Partie I](#)).

Au sein de l'équipe, les données transcriptomiques obtenues au cours de la mycorhization entre *L. bicolor* et les plantes hôtes, pin (*Pseudotsuga menziesii*) et peuplier (*Populus trichocarpa*), ont mis en évidence une expression spécifique de gènes de *L. bicolor* codant des petites protéines fongiques prédites sécrétées, nommées MISSP (pour Mycorrhizal Induced Small Secreted Protein (Martin *et al.*, 2008). L'étude de la fonction de l'une de ces protéines, MISSP7 suggère un rôle important de MISSP7 dans la formation du réseau de Hartig (Plett *et al.*, 2011). En effet, les lignées transgéniques de *L. bicolor*, obtenues par stratégie d'ARN interférence et caractérisées par une expression réduite du gène *MISSP7* pendant la mycorhization, (nommées lignées RNAi MISSP7), ne développent pas de réseau de Hartig (Plett *et al.*, 2011).

Parallèlement, le traitement des racines de peuplier par le peptide de synthèse MISSP7 induit notamment une augmentation de l'expression de gènes associés à l'auxine dont *PtaGH3-4*, *PtaAuxIAA19-3*, *PtaIAA7-1* ([Annexe 1](#) ; Plett *et al.*, 2011) et un membre de la famille SAUR (pour Small Auxin Up Regulated, (McClure *et al.*, 1989 ; Plett *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces gènes est régulé après 3 jours de contact indirect avec *L. bicolor* ([Annexe 1](#); Felten *et al.*, 2009).

Dans le cadre de l'étude, nous proposons d'appréhender le rôle éventuel du réseau de Hartig dans la régulation de la croissance racinaire du peuplier, ainsi que dans la localisation tissulaire de la réponse à l'auxine. Nous avons utilisé deux outils disponibles au sein du laboratoire, les lignées transgéniques de *L. bicolor* RNAi MISSP7 et le peptide de synthèse MISSP7.

2 Matériels et méthodes

Les expériences décrites dans cette partie ont été réalisées avec la lignée sauvage de *L. bicolor* (S238N Maire P. D. Orton) nommée WT, ainsi qu'avec 3 lignées d'ARN interférence pour le gène *MISSP7* (RNAi MISSP7) nommées CI03, CI09, CI19 (Plett *et al.*, 2011). Un pourcentage très faible (0 à 2%) de racines de peuplier mycorhizées est observé pour l'ensemble des lignées RNAi MISSP7, alors que 40% de mycorhization est observé lors de l'interaction avec la lignée sauvage de *L. bicolor* (Plett *et al.*, 2011).

Des explants de peuplier de l'hybride *P. tremula* x *P. tremuloides* possédant la construction *DR5::GUS* ont été mis en co-culture avec *L. bicolor* en condition *in vitro* comme décrit par Felten *et al.*, 2009 ([Encadré 6](#)). La longueur des racines de peuplier a été mesurée et comparée en suivant la méthode décrite précédemment (Matériel et Méthode, [Partie I](#)).

L'application du peptide MISSP7 synthétisé par Pi Proteomics (Huntsville, Alabama; Plett *et al.*, 2011) a été réalisée comme suit : après 3 semaines de culture sur milieu MS/2 gélosé des racines de *P. tremula* x *P. tremuloides* possédant la construction *DR5::GUS* ont été mis en contact avec une solution de milieu MS/2 liquide pendant 16h. Ensuite le peptide MISSP7 synthétique a été appliqué à une concentration de 3,4µM pendant 30 min (condition dans laquelle les gènes associés à l'auxine sont différentiellement exprimés; [Annexe 1](#); Plett *et al.*, 2011) ou pendant 4 heures.

Les observations histologiques, les réactions histochimiques ainsi que les observations du signal GUS ont été réalisées, comme décrites précédemment (Matériel et Méthode [Partie I](#)).

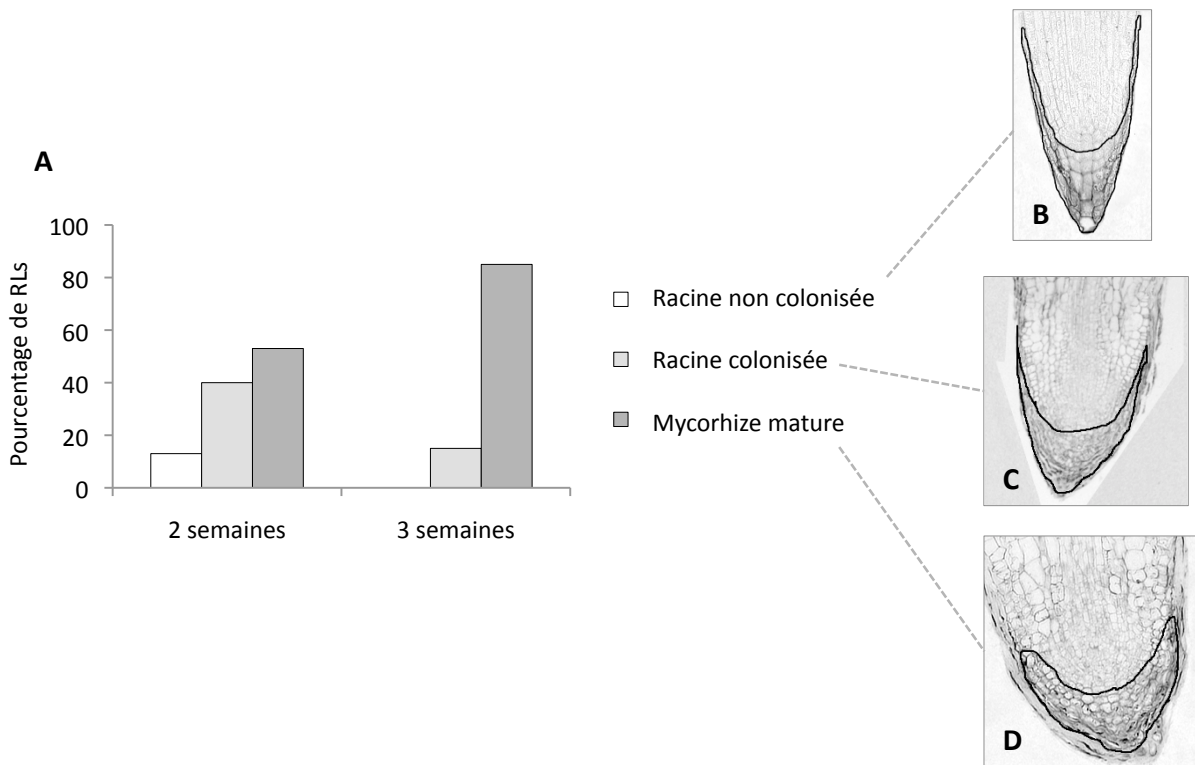


Figure 20 : La majorité des RLs du système racinaire est mycorhizée après 3 semaines de co-culture avec *L. bicolor*

A ; Pourcentage de RLs de l'hybride de peuplier *P. tremula* x *P. tremuloides* après 2 et 3 semaines de co-culture, non colonisées par *L. bicolor* (barres blanches ; B), racines colonisées : le manteau d'hyphe est présent mais ne recouvre pas la coiffe racinaire ; barres grises claires ; C) et mycorhize mature (la coiffe racinaire est arrondie et du réseau de Hartig est présent entre les cellules de l'épiderme ; barres grises foncées ; D). Un échantillonnage représentatif de RLs ont été coupées longitudinalement et observées afin de caractériser le stade de la colonisation de la RL par le champignon (n=20 par stades).

3 Résultats

3.1 L'inhibition de la croissance racinaire semble précéder la formation du réseau de Hartig

Afin de corréler la cinétique de croissance de racines de peuplier avec les événements successifs de l'ontogénèse de la mycorhize, nous avons caractérisé puis quantifié le nombre de racines dans des stades différents ([Figure 20](#)). Après 2 et 3 semaines de co-culture, nous avons récolté des RLs représentatives du système racinaire. Les analyses morphologiques réalisées à partir de coupes longitudinales ont permis d'identifier 3 différents stades, (1) la racine de peuplier non colonisée, (2) la racine colonisée, caractérisée par la présence du manteau fongique et (3) la mycorhize mature, reconnaissable par la présence du manteau fongique recouvrant la coiffe racinaire et du réseau de Hartig. Après 2 semaines de co-culture, seulement 10% des RLs ne sont pas colonisées, 40% du système racinaire est composé de RLs colonisées et 50% de mycorhize mature ([Figure 20](#)). Après 3 semaines de co-culture, près de 80% des RLs sont au stade de mycorhize mature, présentant un réseau de Hartig entre les cellules épidermiques ([Figure 20](#)).

En conclusion, ces observations révèlent que le réseau de Hartig se met en place à partir de la deuxième semaine de co-culture.

Dans les expériences précédentes, nous avons mis en évidence une inhibition de la croissance racinaire observée lors de la première semaine de co-culture entre les racines de *P. tremula* x *P. alba* et *L. bicolor*. Cette inhibition est suivie d'un arrêt de la croissance racinaire à partir de la deuxième semaine de co-culture ([Partie I](#)).

Ainsi, la mise en relation de la dynamique de l'ontogénèse de la mycorhize avec la cinétique de la croissance racinaire suggère que l'inhibition de la croissance racinaire précède la formation du réseau de Hartig.

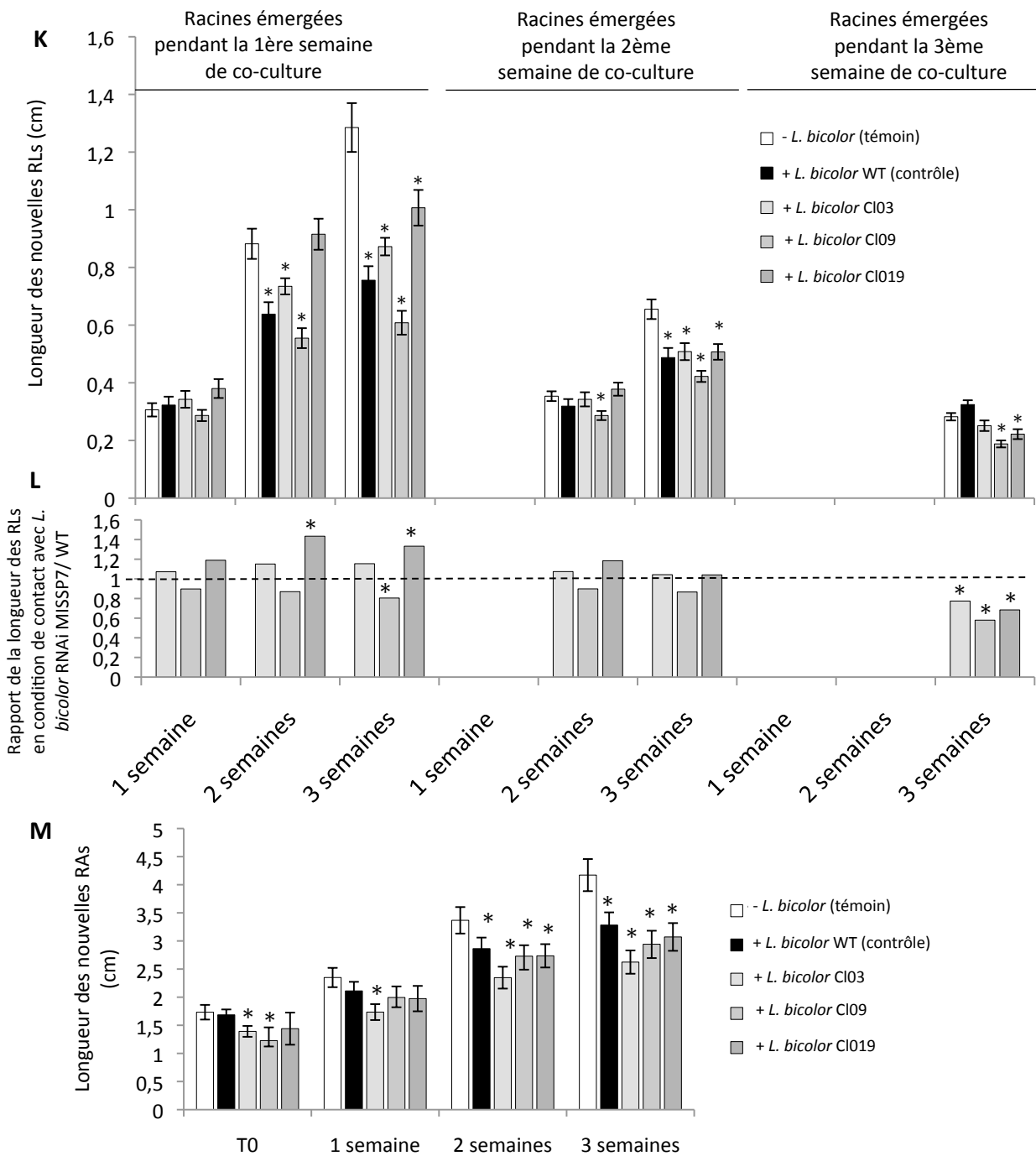
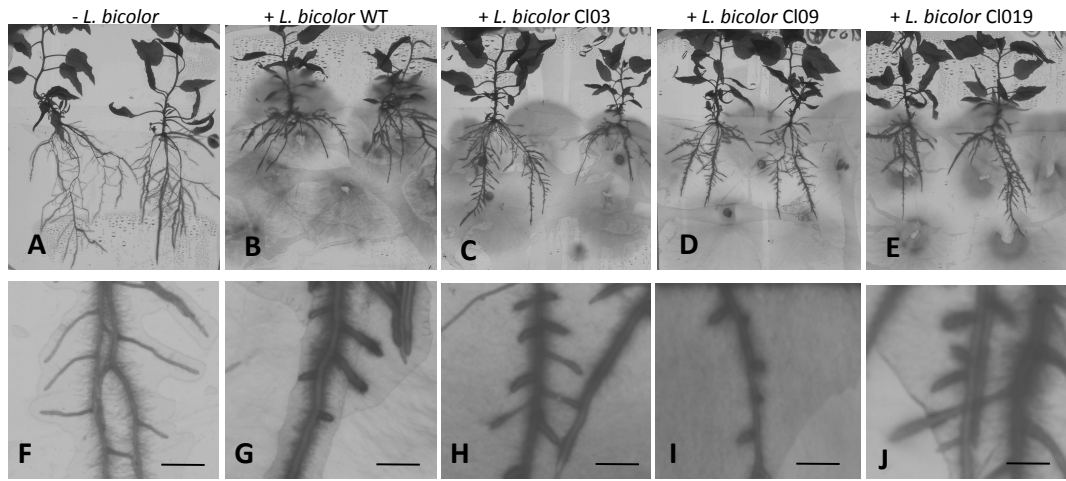


Figure 21 : L'arrêt de la croissance racinaire de peuplier est induite en absence du réseau de Hartig
 Légende page suivante

3.2 L'inhibition de la croissance racinaire de la plante hôte est observée en absence du réseau de Hartig

Une co-culture de 3 semaines entre des racines de *P. tremula* x *P. tremuloides* avec les hyphes de la lignée sauvage de *L. bicolor* ou des trois lignées RNAi MISSP7, conduit à une colonisation fongique sur l'ensemble du système racinaire du peuplier ([Figures 21A à 21E](#)). Les observations morphologiques permettent de suggérer la présence d'un manteau fongique dense autour de la racine ([Figures 21F à 21J](#)).

Les longueurs des racines adventives et latérales ont été mesurées au cours de l'interaction avec la souche sauvage et les 3 souches RNAi MISSP7 de *L. bicolor*. Afin de distinguer la croissance racinaire de l'émergence des RLs, la longueur moyenne a été suivie au cours du temps sur les racines qui ont émergées dans la première, la deuxième et la troisième semaine de co-culture ([Figure 21K](#)). Une augmentation de la longueur moyenne des RLs est observée pour l'ensemble des conditions pour lesquelles les RLs de peupliers sont cultivées en absence de *L. bicolor* ([Figure 21K](#)). La comparaison de la longueur des RLs après interaction avec la souche sauvage de *L. bicolor* avec celle des RLs témoins indiquent que la longueur est significativement plus petite à partir de 2 semaines de co-culture avec *L. bicolor*, pour les racines émergées au cours des première et deuxième semaines de co-culture ([Figure 21K](#)). Les longueurs des racines entre 2 et 3 semaines de contact avec *L. bicolor* ne sont pas significativement différentes ([Figure 21K](#)). Ces résultats indiquent un arrêt de la croissance racinaire des plantules de l'hybride *P. tremula* X *P. tremuloides* à partir de 2 semaines de co-culture.

Aucune différence significative des longueurs des RLs entre 2 et 3 semaines n'est observée pour l'ensemble des conditions pour lesquelles les RLs sont en contact avec les lignées transgéniques RNAi MISSP7 ([Figure 21K](#)). Ainsi, une interaction de 2 semaines des racines de peuplier avec les lignées RNAi-MISSP7 de *L. bicolor* induit un arrêt de la croissance des RLs.

Nous avons ensuite comparé la longueur moyenne des racines de peuplier en co-culture avec chacune des lignées RNAi MISSP7 avec celles des racines en co-culture avec la lignée sauvage de *L. bicolor* ([Figure 21L](#)). En considérant les RLs émergées dans la première semaine de contact, la longueur des racines en interaction avec les lignées Cl09 est identique

Figure 21 : L'arrêt de la croissance racinaire de peuplier est observé en absence du réseau de Hartig

Comparaison des systèmes racinaires de *P. tremula* x *P. tremuloides* possédant la construction *DR5::GUS*, en absence *L. bicolor* (témoin), en contact de la souche sauvage de *L. bicolor* (nommée WT) ou en présence des lignées transgéniques possédant la construction *RNAi MISSP7* (nommée CI03, CI09 et CI19).

A à J ; Observation du système racinaire (A à E) et des racines colonisées (F à J) de peuplier après 3 semaines de culture, en absence *L. bicolor* (témoin, A et F), en présence de la souche sauvage de *L. bicolor* (B et G) ou en présence des lignées *RNAi MISSP7* CI03 (C et H), CI09 (D et I) et CI19 (E et J) de *L. bicolor*. Barres 0,5 cm.

K ; Longueur moyenne (+/- ES (pour Erreur Standard) ; n=6 plantes, n=60 à 260 racines) des racines latérales (RLs) représentées en fonction avec leur émergence (1, 2 ou 3 semaines). Les étoiles indiquent une différence significative entre la longueur des RLs témoins (en absence de *L. bicolor*) et des RLs des plantes en contact avec *L. bicolor* (test de Student accordé à un test de Fischer, *p-value*<0,05).

L ; Rapport de la longueur des RLs en contact avec les hyphes des lignées *RNAi MISSP7* en relation avec celle des RLs en contact avec les hyphes de *L. bicolor* sauvage après 1, 2 et 3 semaines de co-culture. Les étoiles indiquent une différence significative des longueurs des racines de peuplier en contact avec les hyphes des lignées *RNAi MISSP7* en relation avec celles des RLs en contact avec les hyphes de *L. bicolor* sauvage (test de Student accordé à un test de Fischer, *p-value*<0,05).

M ; Longueur moyenne (+/- ES ; n=6 plantes; n=35 à 46 racines) des racines adventives (RAs). Les étoiles indiquent une différence significative entre les longueurs des RAs témoins (en absence de *L. bicolor*) et des RAs des plantes en contact avec *L. bicolor* (test de Student accordé à un test de Fischer, *p-value*<0,05).

avec celle des racines en interaction avec la souche sauvage ([Figure 21L](#)). En revanche, les longueurs des RLs en contact avec *L. bicolor* de la souche sauvage, C103 et C1019 sont différentes ([Figure 21L](#)). En considérant les racines émergées dans la deuxième semaine, aucune différence de la longueur des racines n'est observée en présence des hyphes de *L. bicolor* transgéniques comparées aux racines en contact avec la souche sauvage ([Figure 21L](#)). Concernant les racines émergées dans la troisième semaine, les racines en co-culture avec les hyphes de toutes les lignées, présentent une longueur racinaire moyenne plus petite que celle des peupliers en contact avec la souche sauvage ([Figure 21L](#)). Il est possible que ces différences proviennent d'une grande hétérogénéité entre les lots de racines émergées.

Parallèlement, la longueur des racines adventives a été mesurée. La longueur moyenne des racines est plus petite après 2 et 3 semaines de co-culture avec la lignée de *L. bicolor* sauvage, comparée aux conditions témoins. De plus, la longueur moyenne des racines adventives en contact avec les trois lignées transgéniques RNAi MISSP7 est identique à celle des racines en contact avec la lignée sauvage ([Figure 21M](#)). La longueur des racines de peuplier en interaction avec les différentes lignées sauvage et RNAi de *L. bicolor* n'est pas significativement différente entre 2 et 3 semaines d'interaction, suggérant un arrêt de croissance des racines adventives.

En conclusion, ces données indiquent que la présence de *L. bicolor* induit un arrêt de la croissance des RLs et adventives indépendamment de la présence du réseau de Hartig.

3.3 L'absence de réseau de Hartig ne modifie pas la diminution de la réponse auxinique dans la mycorhize

Après 3 semaines de contact, la réponse auxinique a été analysée à l'apex des racines de *P. tremula* x *P. tremuloides* à partir du patron d'expression de la construction *DR5::GUS*. L'interaction entre les racines de peuplier et la lignée sauvage de *L. bicolor* conduit à une diminution significative du patron de l'expression du *DR5::GUS* (comparaison [Figures 22A et 22B](#)). Ces données confirment une diminution de la réponse à l'auxine dans la racine colonisée par le champignon. De manière identique, après trois semaines de contact avec les hyphes des lignées RNAi MISSP7, une diminution du patron d'expression du *DR5::GUS* est observée dans la zone apicale de la racine ([Figure 22](#)).



Figure 22 : L'absence de réseau de Hartig ne modifie pas la diminution de la réponse auxinique dans la mycorhize

Localisation du patron de réponse à l'auxine à travers l'observation histo-chimique de l'activité GUS des racines de *P. tremula* x *P. tremuloïdes* possédant la construction *DR5::GUS* en condition contrôlée, en absence de *L. bicolor* (A), ou après 3 semaines de co-culture avec la souche sauvage de *L. bicolor* (B) ou avec les lignées RNAi MISSP7 CI03 (C), CI09 (D) et CI019 (E).

Les images sélectionnées sont représentatives d'environ 10 racines par condition. Barres=500µM

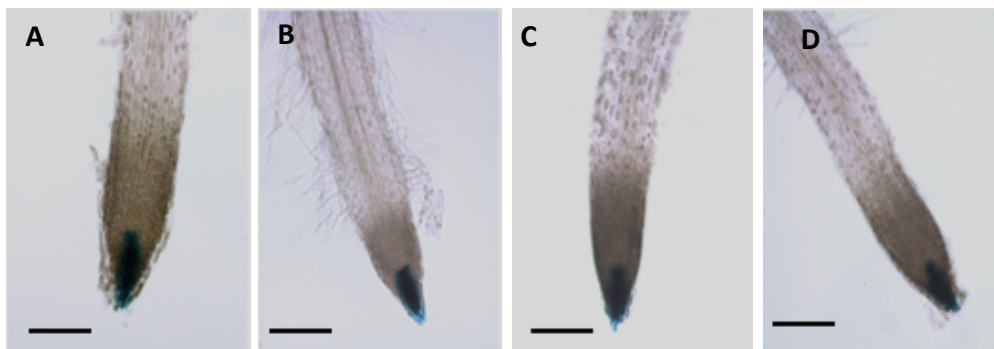


Figure 23 : La présence du peptide MISSP7 ne semble pas modifier la réponse auxinique à l'apex racinaire

Localisation du patron de réponse à l'auxine à travers l'observation histo-chimique de l'activité GUS des racines de *P. tremula* x *P. tremuloïdes* possédant la construction *DR5::GUS* en absence de MISSP7 (A et C), après 30 min (B) ou 4h (D) d'application du peptide MISSP7.

Les images sélectionnées sont représentatives d'environ 20 racines par condition. Barres=250µm

Ainsi, la modification de la réponse à l'auxine observée dans les mycorhizes de peuplier-*L. bicolor* ne semble pas être liée à la présence du réseau de Hartig.

3.4 L'application du peptide MISSP7 ne modifie pas la réponse auxinique à l'apex racinaire

L'application sur des racines de peuplier possédant la construction *DR5::GUS* du peptide synthétique MISSP7 pendant 30 min et 4 h à une concentration connue pour induire des modifications de l'expression de gènes de réponse à l'auxine, ne révèle pas de modification majeure du patron d'expression du *DR5::GUS*, en comparaison de celui observé dans les racines témoins en absence de peptide ([Figure 23](#)).

4 Discussion et perspectives

Cette étude apporte des résultats importants dans la compréhension de la dynamique de la mise en place des événements morphogénétiques des deux partenaires lors de la symbiose ECM et permet de dégager quelques perspectives. Tout d'abord, nos résultats concernant la comparaison de la dynamique des événements morphologiques de la formation de la mycorhize, avec celle de la cinétique de croissance racinaire suggère que la formation du réseau de Hartig n'est pas à l'origine de l'inhibition, puis de l'arrêt de la croissance racinaire de la plante hôte. Cette observation est confirmée par l'analyse de la longueur moyenne des racines en présence des lignées RNAi MISSP7 et nous a permis de conclure que l'arrêt de croissance n'est pas dépendant de la formation du réseau de Hartig ([Figure 24](#)). Ainsi, il semble donc que l'arrêt de croissance ne soit pas induit par la mise en place des échanges trophiques entre les deux partenaires. La présence d'un manteau fongique dense ou d'une molécule fongique encore inconnue, serait suffisante pour induire une modification de la croissance ([Figure 24](#)).

Cette étude permet aussi de suggérer que la diminution de la réponse à l'auxine observée dans les mycorhizes de peuplier-*L. bicolor* n'est pas liée à la présence du réseau de Hartig, ni à la sécrétion du peptide MISSP7. Ces deux résultats sont en cohérence : MISSP7 n'affecte pas la sensibilité à l'auxine. En revanche, ils ne sont pas en accord avec les données

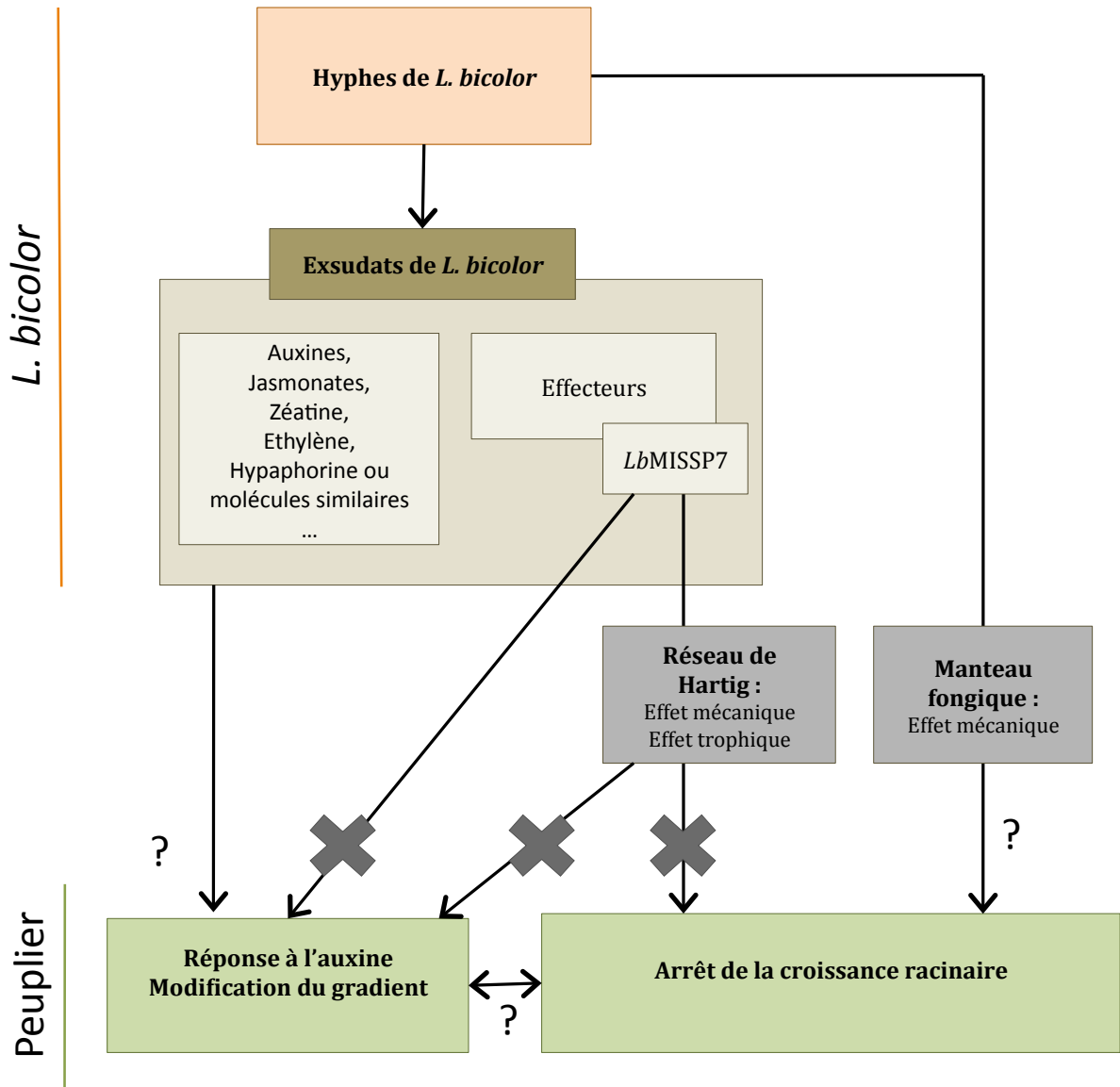


Figure 24 : Modèle hypothétique de l'effet de la colonisation de *L. bicolor* dans la croissance de la racine

La présence du réseau de Hartig ne semble pas être à l'origine de l'arrêt de croissance racinaire observé, ni de la diminution du gradient auxinique, dans la racine colonisée par le champignon. Parallèlement, il ne semble pas que la présence du peptide MISSP7 influence la localisation de la réponse à l'auxine à l'apex racinaire. Il est possible que la présence du manteau fongique et/ou de molécules sécrétées par le champignons dans l'apoplaste (jasmonates, éthylène, hypaphorine/molécules homologues, etc.) soient responsables de ce phénotype.

obtenues précédemment. L'application du peptide MISSP7, induit l'expression de membres de la famille des *PtaGH3*, *PtaAuxIAA* et *PtaSAUR* (Plett *et al.*, 2011). Ces résultats apparemment contradictoires pourraient s'expliquer par une régulation plus fine non visualisable avec notre approche. Des peupliers transgéniques possédant la construction *DR5::GFP* sont disponibles au sein du laboratoire. Des études complémentaires de quantification de la GFP menées avec des racines de peuplier possédant cette construction en réponse au peptide MISSP7 seront réalisées afin de confirmer ou non l'absence de l'impact MISSP7 sur la répartition de la réponse auxinique.

Les hyphes des lignées transgéniques de *L. bicolor* RNAi MISSP7 ne sont pas capables de former de réseau de Hartig mais la colonisation la racine et de formation d'un manteau fongique dense sont observées sur les racines colonisées. Il serait donc essentiel de poursuivre cette étude par l'analyse de l'effet du manteau sur la croissance racinaire. Des lignées transgéniques dont l'expression d'autres membres de la famille des *MISSP* est réduite, ont été analysées au laboratoire. Des résultats préliminaires montrent qu'une de ces lignées forme un manteau plus faible autour de la racine (C. Veneault-Fourrey, communication personnelle). L'analyse du système racinaire en interaction avec ces lignées fongiques sera menée prochainement. La présence de la colonisation du champignon seul est à étudier, surtout la présence du manteau dense localisé à la coiffe racinaire. Comme nous l'avons vu dans la [partie I](#), il semble que l'étape de colonisation soit corrélée avec une nette diminution de la répartition de la réponse auxinique. Les observations des racines de peuplier *DR5::GUS* en interaction avec les lignées transgéniques RNAi MISSP7 présentent une colonisation des hyphes du champignon à la coiffe racinaire ainsi qu'une diminution de la zone de réponse à auxine. Ces données suggèrent que la présence du manteau fongique à la coiffe racinaire n'est pas à l'origine de la diminution de la signalisation auxinique. Des analyses histologiques plus précises seraient nécessaires pour permettre de conclure sur ce point.

Nom du gène ^a	Gene ID ^b	Arabidopsis gene ID ^c	Nom du gène dans Arabidopsis ^d	Rapport peptide MISSP7 / Contrôle ^e	p-value ^f	Rapport racine 3j indirect contact / racine témoin ^g	p-value ^h	Rapport racine mycorhizée / racine témoin ⁱ	p-value ^j
PtGH3-4	Potri.013G151100.1	AT5G54510.1	DFL1/GH3-4	634	0,048	1,8	0,0077	-	-
PtSAUR	Potri.006G278100.1	AT2G24400.1		588	0,00379	3,3	0,0002	-6,6	0,0000
PtIAA19.3	Potri.003G056900.1	AT3G15540.1	IAA19	38	0,0101	3,2	0,0004	-	-
PtSAUR	Potri.004G164400.1	AT4G34760.1		6	0,0272	1,6	0,0110	-4,2	0,0019
PtIAA7.1	Potri.010G078300.1	AT3G23050.1	IAA7	3	0,0207	1,8	0,0316	-	-

^A Nom du gène (Annotations : Kalluri *et al.*, 2009; Felten *et al.*, 2009, Phytozome); ^b Gène ID de la version de Phytozome V9.0, ^c *A. thaliana* gène ID orthologue du *Populus* gene ID (Phytozome annotation), ^d TAIR annotation; ^e Ratio de la fluorescence observée en présence du peptide MISSP7 / condition control; ^f p-value correspondante (Plett *et al.*, 2010); ^g Ratio de la fluorescence observée en condition de 3 jours contact indirect avec *L. bicolor* / condition témoin, sans *L. bicolor*; ^h p-value associée, Felten *et al.*, 2009; ⁱ Ratio de la fluorescence observée en condition de contact avec *L. bicolor* / condition témoin sans *L. bicolor* (3semaines); ^j p-value associée, voir partie II.

Annexe 1 : Régulation de l'expression en réponse à *L. bicolor* des gènes liés à l'auxine, en réponse au peptide MISSP7

Partie III : Implication de PtaPIN9 dans les modifications du développement racinaire du peuplier en réponse à *L. bicolor*

1 Introduction

Lors de l'interaction peuplier-*L. bicolor*, la formation de nombreuses racines courtes mycorhizées implique une étape précoce de stimulation de la formation de RLs (Felten *et al.*, 2009). Une étude menée précédemment au laboratoire a permis de mettre en évidence des acteurs potentiellement impliqués dans la formation des RLs en réponse à *L. bicolor*. L'étude a notamment mis en évidence une augmentation transitoire de l'expression de *PtaPIN9* dans les racines de peuplier après 3 jours de contact avec *L. bicolor* (Felten *et al.*, 2009). PtaPIN9 est orthologue de AtPIN2 (Carraro *et al.*, 2012), qui est responsable du transport basipète de l'auxine à l'apex racinaire d'*A. thaliana* (Luschnig *et al.*, 1998 ; Rashotte *et al.*, 2000). A partir de ces données, Felten et ses collaborateurs ont proposé un modèle de l'activation des cellules fondatrices des RLs dans les étapes précoces de l'interaction avec *L. bicolor* ([Encadré 5](#) ; Felten *et al.*, 2009). En revanche, la fonction de PtaPIN9 n'a pas été explorée.

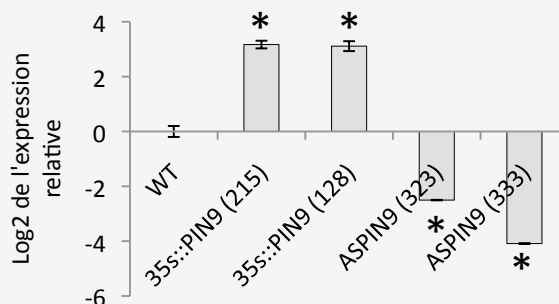
Par ailleurs, le transport polarisé de l'auxine joue un rôle important dans la croissance racinaire (Vanneste & Friml, 2009) ainsi que dans la formation de la racine ECM (Karabaghli *et al.*, 1998 ; Rincón *et al.*, 2003).

Dans ce contexte, un des objectifs de ma thèse a donc été d'appréhender la fonction de PtaPIN9 dans l'interaction peuplier-*L. bicolor* par l'analyse de (1) sa localisation en utilisant une approche d'immunolocalisation et de (2) la caractérisation du système racinaire des lignées transgéniques de peuplier *35S::PIN9* et *ASPIN9* au cours de la formation de la mycorhize.

Les résultats concernant l'implication potentielle de PtaPIN9 dans les modifications du développement racinaire en réponse à *L. bicolor*, seront ensuite discutés à la fin de cette partie.

Encadré 7 : Caractérisation de l'expression de *PtaPIN9* dans les lignées transgéniques *ASPIN9* et *35S::PIN9*

Niveau de l'expression de *PtaPIN9* dans les racines de la lignée sauvage, *35S::PIN9* (333 et 323) et *ASPIN9* (128 et 215)
(Victor Busov communication personnelle)



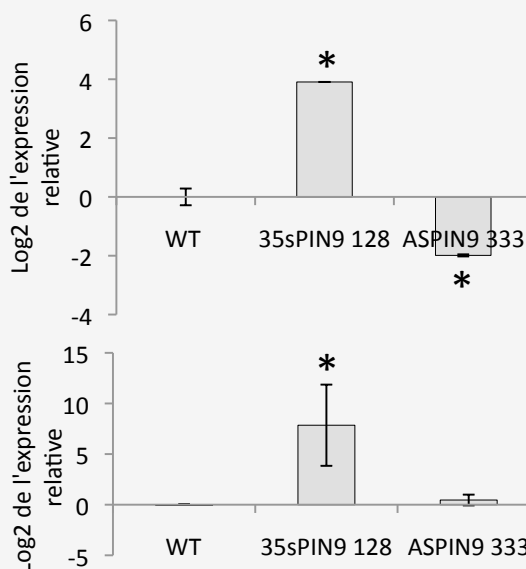
→ La quantification de l'expression du gène *PtaPIN9* dans les racines des lignées *35S::PIN9* (128) et *ASPIN9* (333) a été réalisée au cours de la première année (Expérimentation I) ainsi qu'à la fin de la troisième année de thèse (Expérimentation II).

Expression de *PtaPIN9* de la lignée sauvage, *35S::PIN9* (333) et *ASPIN9* (128)

Représentation de la moyenne (+/-SE) provenant de 3 réplicats biologiques. L'expression du gène a été mesurée par la méthode de retro transcription associée à la PCR-quantitative. Elle a été normalisée par l'expression des gènes de références *PtaEiF* et *PtaUBI* et rapportée à l'expression des échantillons témoin de la lignée sauvage. Les étoiles indiquent une différence significative entre les valeurs d'expression mesurés dans les racines WT et dans les racines des lignées transgéniques (Test de Student associé à un test de Fischer p -value<0,05).

L'expérimentation I a été réalisée sur les plantes âgées de 3 semaines cultivées sur un milieu MS/2.

L'expérimentation II a été réalisée sur les plantes âgées de 3 semaines cultivées sur un milieu MS/2, puis 3 semaines sur milieu P20.



Aucune différence de l'expression du gène *PtaPIN9* dans les racines des peuplier *ASPIN9* (lignée 333) comparée aux racines des peuplier de la lignée sauvage de l'expérimentation II est observée.

→ Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus sur un troisième lot de plante. L'expression de *PtaPIN9* n'a pas été quantifiée dans cette expérimentation. Les conclusions tirées des résultats prennent comme hypothèse que les lignées transgéniques possèdent une expression similaire à celle décrite par V. Busov et ses collaborateurs et dans l'expérimentation I. Mais il est évident, que des expérimentations complémentaires sont nécessaire à la validation de ces résultats.

En Annexe 2 se trouvent les résultats des expérimentations obtenus en première année de thèse sur le nombre de RLs des différentes lignées en réponse à *L. bicolor* et les résultats sont similaires à ceux obtenus dans cette partie.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Caractérisation du matériel végétal et du système de culture

Les expériences décrites dans cette partie, ont été réalisées en utilisant différentes lignées de peuplier *P. tremula* x *P. alba* (clone INRA 717-1-B4), la lignée sauvage (nommée WT), deux lignées transgéniques de surexpression de *PtaPIN9*, *35S::PIN9* (nommées 128 et 215) et deux lignées anti-sens pour *PtaPIN9*, *ASPIN9* (nommées 323 et 333). Les lignées de sur-expression et de sous-expression ont été obtenues par l'équipe de V. Busov (Gou *et al.*, 2010). Au cours de la thèse, le niveau d'expression de *PtaPIN9* dans les racines des lignées transgéniques a été quantifié à plusieurs reprises. Les données obtenus sont présentées dans l'[Encadré 7](#).

Les données d'expression des gènes, présentées dans cette partie ont été obtenues en suivant le protocole décrit dans « Matériel et Méthode » de la [partie I](#).

La caractérisation du système racinaire des lignées transgéniques a été réalisée en utilisant le matériel et la méthode décrit dans la [partie I](#). La densité de RLs est obtenue en divisant le nombre de RLs par la longueur de la racine parent. Cette densité a été calculée pour chaque racine parent, porteuse de racines latérales.

2.2 Immunolocalisation de PtaPIN9

2.2.1 Obtention des anticorps

Les expérimentations d'immunolocalisation ont été réalisées en utilisant des anticorps obtenus dans le lapin après injection de peptides de synthèse. La séquence du peptide a été dessinée dans la boucle cytosolique de la protéine PtaPIN9. Le choix de la séquence a été réalisé par Eurogentec (Seraing, Belgique), en prenant soin que les peptides soient spécifiques de la séquence de PtaPIN9. La séquence choisie est : H2N-SGKWSGEKEHDVEDGC-CONH2. Le peptide synthétisé est utilisé comme antigène pour la production d'anticorps dans le lapin. Les anticorps sont obtenus et purifiés à partir du sérum

sanguin du lapin par la société Eurogentec. Dans les premières réactions d'immunolocalisation, aucun signal immunologique n'a été détecté avec l'anticorps anti-PIN9 purifié. Nous avons donc poursuivi les études en utilisant le sérum non purifié comme « anticorps primaire ».

2.2.2 Protocole d'immunolocalisation

Les réactions d'immunolocalisation ont été réalisées sur des racines de peuplier témoin, en contact avec *L. bicolor* pendant 3 à 7 jours ou 3 semaines (nommées mycorhizes matures), en adaptant le protocole de Paciorek et collaborateurs (Paciorek *et al.*, 2006). Les échantillons sont préalablement fixés pendant 1 heure sous vide dans une solution contenant du paraformaldehyde 4% (p/v), tamponnée avec du tampon MTSB (Microtubule-Stabilising Buffer ;PIPES 50mM, EGTA 5mM, MgSO₄, 5mM Triton X-100 à 0,1%, pH7). Les échantillons sont rincés pendant 1 heure, puis sont ensuite inclus dans l'agarose 6% (p/v). Des coupes longitudinales de racines d'épaisseur de 30 µm sont réalisées avec un vibratome (Leica) et recueillies dans du tampon MTSB. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 minutes dans une solution de tampon bloquant contenant 2% d'albumine bovine sérique (p/v) et 0,05% de Tween 20 (v/v) dans du tampon MTSB. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire, dilué au 1/1000 dans du tampon bloquant pendant une nuit à 4°C. Pendant cette étape, les coupes témoins sont incubées dans du tampon bloquant. Après 5 rinçages dans du MTSB contenant 0,05% de Tween 20, les coupes sont mises à incuber pendant 2 heures avec l'anticorps secondaire IgG AlexaFluor 488 (Life technologie, CA), dilué au 1/500 dans du tampon bloquant à température ambiante. Les coupes sont ensuite rincées 5 fois dans une solution de MTSB contenant 0,05% de Tween 20, puis rincées une fois dans de l'eau. Toutes ces étapes sont réalisées dans des petits paniers afin de ne pas abimer les échantillons. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans une solution « antifading » (Slow Fade Gold ; Life technologie, CA). Les coupes sont observées avec un microscope confocal à balayage laser Radiance 2100 AGR3Q-BLD Rainbow (Bio-Rad) en utilisant les objectifs X60 (O.N 1,4) et X100 (O.N 1,4). La fluorescence émise par l'Alexa 488 est observée entre 490 et 550 nm après une excitation avec un laser Argon à 488 nm.

Afin de valider la spécificité du signal, une immunolocalisation a été réalisée en utilisant l'anticorps anti-AtPIN2 d'*A. thaliana* (commercialisé par Agrisera, Suède) dans les racines de peuplier. L'anti IgG AlexaFluor 488 a été utilisé comme anticorps secondaire. La localisation

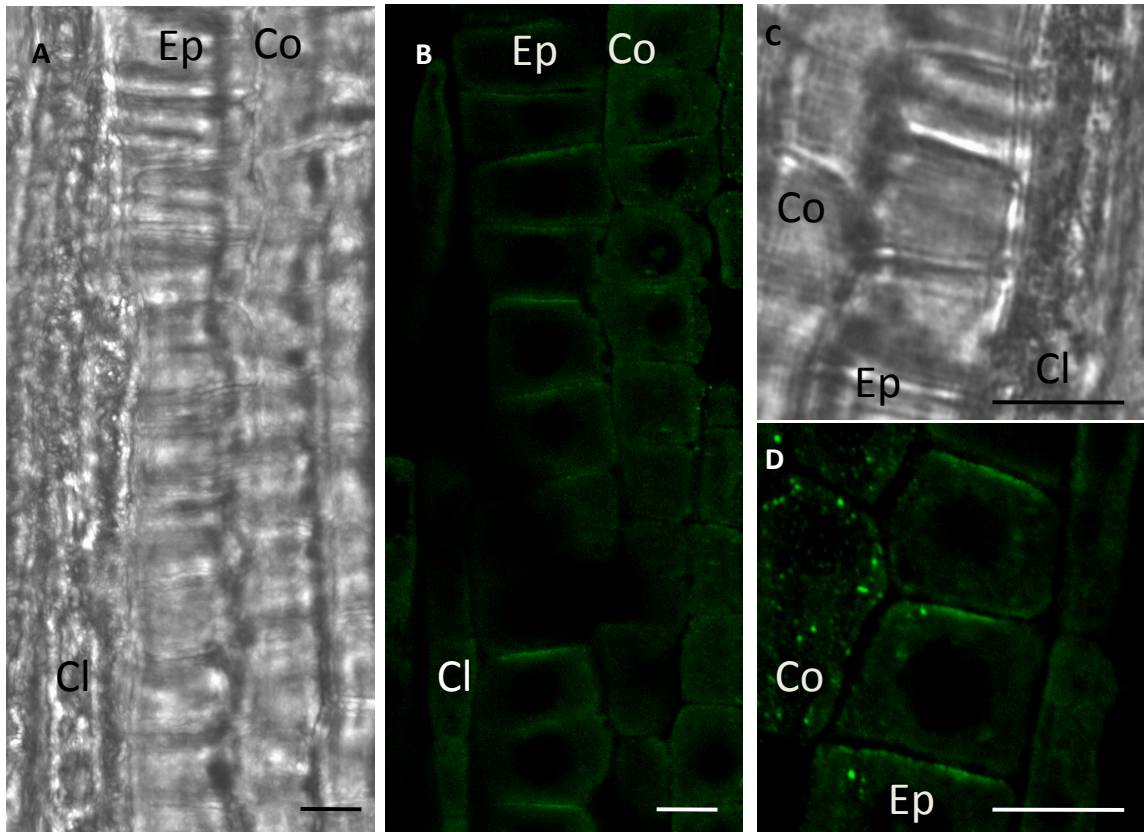


Figure 25 : Localisation cellulaire de PtaPIN9 dans les apex racinaires de *P. tremula x P. alba*

L'immunomarquage de la protéine PtaPIN9, réalisé sur des coupes longitudinales de RLs de peuplier, révèle la présence d'un signal polarisé sur la membrane plasmique des cellules épidermiques, situées dans la zone méristématique (B). Le signal est détecté sur la partie apicale des cellules épidermiques (D).

A et C ; Images obtenues en microscopie à contraste de phase, B et D ; images obtenues en microscopie confocale à balayage laser. Le signal fluorescent est visible en vert grâce à l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé au marqueur fluorescent Alexa 488. Barres = 5µm

Ep : cellules épidermiques, Co : cellules du cortex ; Cl : cellules de la coiffe latérale

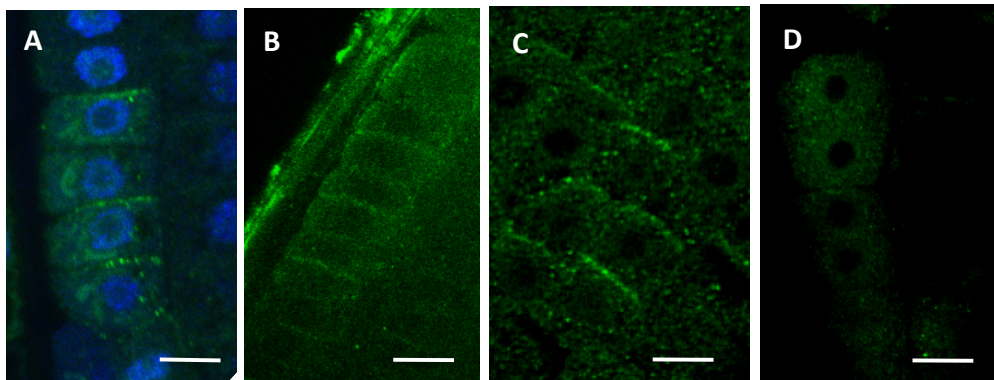


Figure 26 : PtaPIN9 homologue de AtPIN2 par sa localisation dans la racine

A ; Observation du signal de fluorescence de l'anticorps anti-AtPIN2 couplé à un anticorps secondaire associé à l'Alexa 488 dans la racine de peuplier *P. tremula x P. alba*, la couleur bleu représente un marquage fluorescent de l'ADN au DAPI. B ; Observation du signal de fluorescence de l'anticorps anti-PtaPIN9 couplé à un anticorps secondaire associé à l'Alexa 488 dans les racines d'*A. thaliana*. C et D ; Observation du signal de fluorescence de l'anticorps anti-PtaPIN9 couplé à un anticorps secondaire associé à l'Alexa 488 dans les racines de peuplier 35S::PIN9 (C) et ASPIN9 (D). Barres = 5µm

de l'anticorps anti-PtaPIN9 du peuplier dans les racines d'*A. thaliana* a été réalisée selon le protocole décrit par Friml et ses collaborateurs (Friml *et al.*, 2003).

Malgré les nombreux protocoles testés, un bruit de fond est observé sous forme de points fluorescents. Ce bruit de fond n'a pas été observé après une immunolocalisation contrôle, en utilisant le sérum du lapin obtenu avant injection du peptide de synthèse.

2.3 Observation du réseau de Hartig après coloration avec l'iodure de propidium

Des mycorhizes matures formées entre *L. bicolor* et les racines *P. tremula* x *P. abla* des lignées sauvage (WT), 35S::PIN9 (128) et ASPIN9 (333) ont été récoltées, fixées et incluses dans l'agarose, comme décrit précédemment en utilisant du tampon PBS (Phosphate Salin Buffer ; NaCl 137mM, KCl 2,5mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM , pH7). Des coupes transversales de racines de 30 µm ont été réalisées puis mises à incuber dans une solution d'iodure de propidium (dilution 1:100; Sigma-Aldrich). Les coupes ont ensuite été rincées 3 fois dans du tampon PBS et montées entre lames et lamelles dans un solution de glycérol 50% (v/v). L'observation des coupes a été réalisée en utilisant un microscope à épifluorescence inversé Zeiss Axio Observer Z1, combiné à un outil Apotome (Zeiss Technology, Allemagne). Le marquage fluorescent obtenu après excitation à 370 nm et récupéré à 630 nm de l'iodure de propidium, nous permet de mettre en évidence l'organisation cellulaire des 2 partenaires.

3 Résultats

3.1 PtaPIN9 est homologue de AtPIN2 de par sa localisation racinaire

Afin de localiser la protéine PtaPIN9 dans la racine de peuplier, une technique d'immunolocalisation a été mise au point. Les marquages immunologiques sont observés dans l'épiderme de la zone méristématique de la racine ([Figure 25](#)). Au niveau cellulaire,

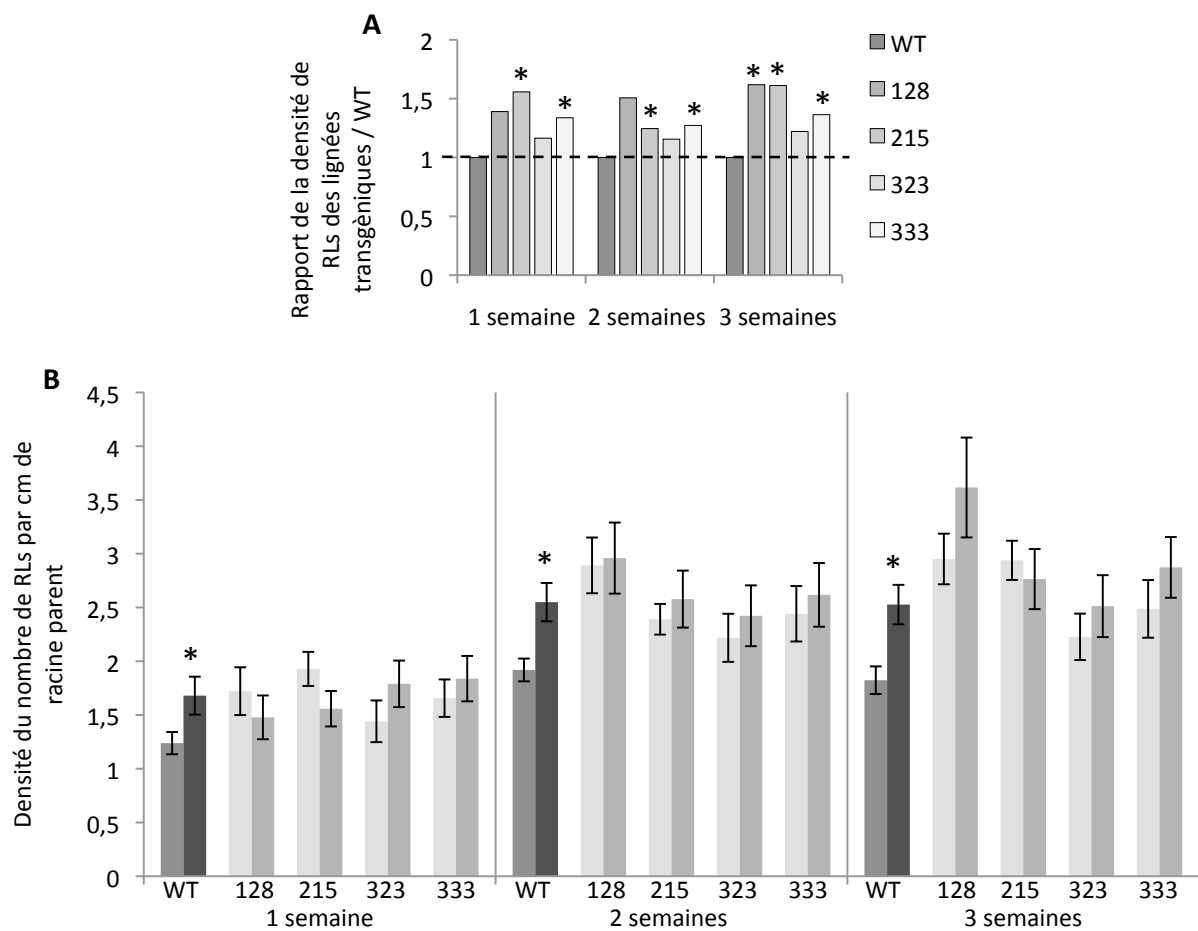


Figure 27 : La co-culture avec *L. bicolor* n'induit pas de stimulation des RLs dans les peupliers *ASPIN9* et *35S::PIN9*.

A, Rapport de la densité moyenne des RLs des racines de peupliers *35S::PIN9* et *ASPIN9* sur la densité moyenne des RLs de peuplier sauvage (WT) en absence de contact avec *L. bicolor*. Les étoiles indiquent une différence significative entre les densités de RLs des plantes WT et des lignées transgéniques (test de Student accordé à un test de Fischer, $p\text{-value} < 0,05$; $n=35$ à 57 racines parents).

B, Densité moyenne (+/- ES) des RLs des peupliers de la lignée sauvage (WT), des lignées transgéniques *35S::PIN9* (lignées 128 et 215) et *ASPIN9* (lignées 323, 333) après 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de contact avec *L. bicolor*. Les étoiles indiquent une différence significative entre les conditions témoins et de contact avec *L. bicolor* (test de Student accordé à un test de Fischer, $p\text{-value} < 0,05$; $n=35$ à 57 racines parents).

PtaPIN9 est clairement localisée de façon polarisée dans la partie apicale de la cellule ([Figures 25 B et 25C](#)).

Afin de vérifier la spécificité du marquage, nous avons réalisé des réactions d'immunolocalisation en utilisant l'anticorps anti-AtPIN2 dans les racines de peuplier. Nous avons aussi réalisé des réactions d'immunolocalisation sur des racines d'*A. thaliana* en utilisant l'anticorps anti-PtaPIN9. La présence d'un signal polarisé dans la membrane plasmique des cellules de la zone méristématique est détectée ([Figures 26A et 26B](#)). Ces observations supportent donc l'hypothèse d'une localisation de PtaPIN9 similaire à celle de AtPIN2. Une localisation identique est observée dans les cellules méristématiques des racines des peuplier *35S::PIN9* ([Figure 26C](#)). Aucun signal n'est observé sur les coupes des racines de peuplier *ASPIN9* ([Figure 26D](#)). L'ensemble de ces observations confirme la spécificité des marquages observés avec l'anticorps anti-PtaPIN9.

3.2 La modification de l'expression de *PtaPIN9* ne conduit pas à une stimulation des RLs en réponse à *L. bicolor*

La densité de RLs a été réalisée pour les 2 lignées transgéniques de peuplier *35S::PIN9* (128 et 215) ainsi que pour les deux lignées *ASPIN9* (323 et 333). En absence de contact avec *L. bicolor*, une densité racinaire significativement plus importante de RLs, est observée pour les 4 lignées transgéniques analysées en comparaison aux plantes sauvages ([Figure 27A](#)).

En réponse à *L. bicolor*, dans les plantes de la lignée sauvage (nommées WT), à partir d'une semaine de co-culture une plus forte densité de RLs a été observée (+36%), comparée aux plantes contrôles, cultivées en absence de *L. bicolor* ([Figure 27B](#)). Contrairement aux peupliers de la lignée sauvage, le système racinaire des lignées *35S::PIN9* et *ASPIN9* ne présente pas de différence significative dans la densité de RLs au cours de la co-culture avec *L. bicolor* ([Figure 27B](#)). Ces données suggèrent que la modulation de l'expression de *PtaPIN9* à travers l'utilisation des lignées transgéniques *35S::PIN9* et *ASPIN9*, ne permet pas la stimulation de la formation de RLs en réponse à *L. bicolor*.

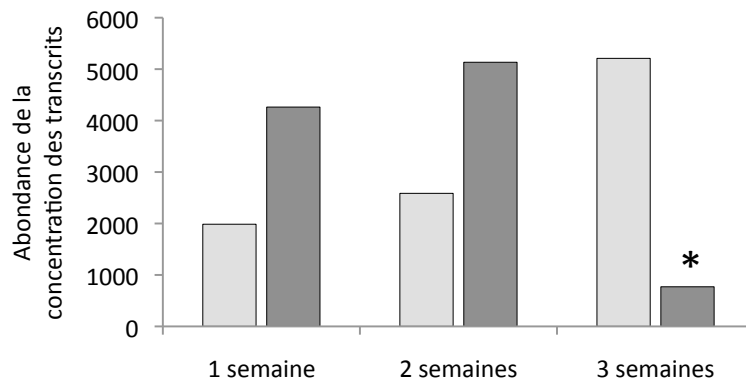


Figure 28 : L'analyse transcriptomique révèle une diminution de l'expression de *PtaPIN9* dans la mycorhize mature

Abondances des transcrits de *PtaPIN9* (*Potri.018G139400.1*), obtenues en analyse transcriptomique des racines de peuplier en absence de contact avec *L. bicolor* (indiqué en gris clair) et après 1, 2 et 3 semaines de contact avec *L. bicolor* (indiqués en gris foncé). L'étoile indique une différence significative entre les conditions témoins (en absence de *L. bicolor*) et en co-culture avec *L. bicolor*. Les tests statistiques ont été réalisés avec le test ANOVA, corrigé de Benjamini et Hochberg ($p\text{-value} < 0,05$).

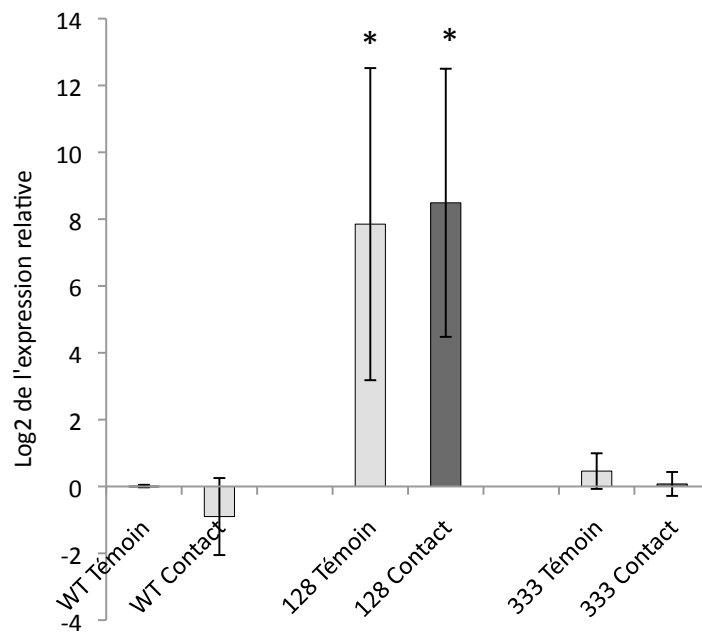


Figure 29 : Niveaux de l'expression de *PtaPIN9* dans les racines mycorhizées de peuplier sauvage (WT), 35S::*PIN9* (lignée 128) et ASPIN9 (lignée 333)

Quantification de l'expression de *PtaPIN9* dans les RLs (barres grises claires) racines mycorhizées (barres grises foncées) de peuplier sauvage (WT), 35S::*PIN9* (lignée 128) et ASPIN9 (lignée 333).

Représentation de la moyenne (+/-ES). L'expression du gène a été mesurée par la méthode de retro transcription associée à la PCR-quantitative, puis normalisée par l'expression des gènes de références *PtaEiF1* et *PtaUBI* et rapportée à l'expression des échantillons témoin de la lignée sauvage.

Les étoiles indiquent une différence significative entre les valeurs d'expression dans les racines des plantes sauvages et lignées transgéniques (test de Student accordé à un test de Fischer, $p\text{-value} < 0,05$; $n=3$).

3.3 La localisation de PtaPIN9 en réponse à *L. bicolor* dans les phases précoces ne semble pas être affectée

L'immunolocalisation de PtaPIN9 réalisée sur les racines de peuplier après 3 et 7 jours de co-culture avec *L. bicolor*, dans les stades où la stimulation des RLs est observée, n'a pas permis de détecter des différences dans la localisation de la protéine au niveau tissulaire dans la zone méristématique, ni de changement de polarité de la protéine au niveau cellulaire (données non montrées).

3.4 L'expression et la localisation de PtaPIN9 semblent être affectées dans la mycorhize mature

L'analyse transcriptomique, réalisée sur des racines de peuplier après 1, 2, 3 semaines de co-culture avec *L. bicolor* révèle une diminution significative du niveau des transcrits de *PtaPIN9* à partir de 3 semaines de co-culture, dans les mycorhizes matures ([Figure 28](#)). Le rapport effectué entre le niveau des transcrits de *PtaPIN9* dans les racines mycorhizées et celui des racines témoin est de 0,15 ($p\text{-value}=1,41^{-06}$). En revanche, l'expression de *PtaPIN9* dans les racines mycorhizées n'est pas significativement différente de celle des racines témoins après analyse en RT-PCR quantitative réalisée dans une autre expérimentation biologique ([Figure 29](#)). Cette contradiction pourrait s'expliquer par une différence de la cinétique de la mise en place des mycorhizes en condition de culture *in vitro*.

Les expériences d'immunolocalisation réalisées dans des mycorhizes matures (après 3 semaines de contact avec *L. bicolor*) ne révèlent pas la présence de signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique ([Figure 30](#)). A ce stade de la colonisation par le champignon, l'anatomie des cellules de l'épiderme est affectée ([Figure 30A](#); Massicotte *et al.*, 1987 ; Horan *et al.*, 1988). Ainsi, cette disparition du signal d'immunolocalisation pourrait s'expliquer par le remodelage de la zone d'expression de *PtaPIN9*.

Nous avons aussi quantifié par une technique de RT-qPCR l'expression de *PtaPIN9* après 3 semaines de contact dans les mycorhizes de la lignée sauvage, et dans les mycorhizes des lignées transgéniques *35S::PIN9* (128) et *ASPIN9* (333). Pour la lignée transgénique

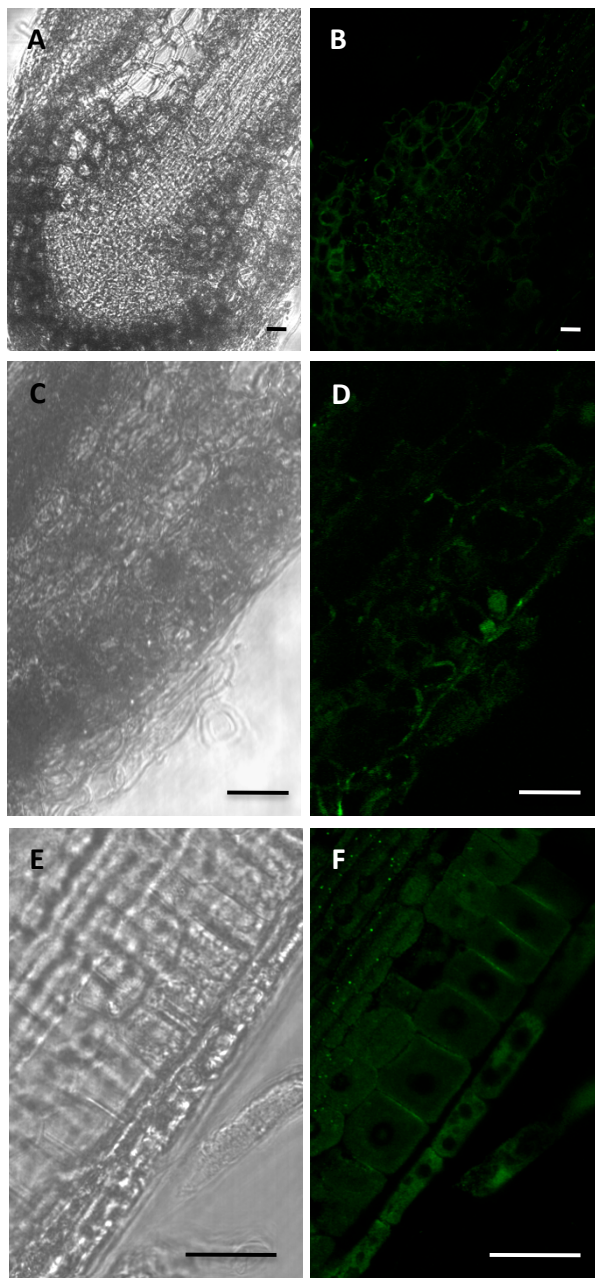


Figure 30 : Absence du signal d'immunolocalisation spécifique de PtaPIN9 dans les mycorrhizes matures

Immunomarquage de la protéine PtaPIN9 dans la mycorrhize mature (A et B), dans la zone méristématique (C et D) en comparaison au signal observé dans la RLs témoin de peuplier, cultivés sans *L. bicolor* (E et F).

Aucun signal immunofluorescent n'est détecté dans l'apex de la mycorrhize mature comprenant la coiffe et la zone méristématique ainsi que dans la zone de formation du réseau de Hartig. A, C et E ; Images obtenues en microscopie de contraste de phase, correspondant aux images obtenues en microscopie confocale à balayage laser (B, D et F). Le signal fluorescent est visible en vert grâce à l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé au marqueur fluorescent Alexa 488.

Barres = 10µm

35S::PIN9, aucune différence de l'expression de *PtaPIN9* dans les mycorhizes comparées au RLs n'a été mesurée ([Figure 29](#)). Il faut noter qu'aucune différence significative de l'expression de *PtaPIN9* n'a été observée entre les lignées sauvage et *ASPIN9* ([Figure 29](#), pour information voir [Encadré 7](#)).

3.5 Les modifications de l'expression de *PtaPIN9* n'affectent pas l'arrêt de la croissance racinaire lors de la formation de la mycorhize

Les longueurs des RLs et adventives (RAs) des plantes sauvages (WT) ainsi que celles des deux lignées transgéniques de peuplier 35S::PIN9 (lignées 128 et 215) et *ASPIN9* (lignées 323 et 333) ont été mesurées et comparées ([Figure 31](#)).

La longueur moyenne des RLs des lignées transgéniques est inférieure à la longueur moyenne des RLs des plantes de la lignée sauvage à partir de 2 et 3 semaines de culture en absence de *L. bicolor* ([Figure 31A](#)). En revanche, la longueur moyenne des RAs n'est pas affectée dans les lignées transgéniques ([Figure 31B](#)).

En réponse à *L. bicolor*, dans les racines des plantes sauvages, la longueur moyenne des RLs totales a été observée plus petite en comparaison aux plantes témoins après 1, 2 et 3 semaines ([Figure 31C](#)). Ces résultats suggèrent donc une inhibition de la croissance racinaire en réponse à *L. bicolor* dès la première semaine de contact avec *L. bicolor*. La différence entre les racines formées dans la première semaine de contact ([Figure 31C](#)) suivie entre 2 et 3 semaines a été testée. Pour les racines, en contact avec *L. bicolor*. Aucune différence significative entre ces deux temps n'est observée. En revanche, pour les racines témoin une croissance est observée ([Figure 31C](#)). En conclusion, les RLs après 2 semaines contact avec *L. bicolor* sont en arrêt de croissance.

L'analyse des longueurs moyennes des RLs de peuplier 35S::PIN9 et *ASPIN9*, pour les RLs formées lors de la première semaine de co-culture avec *L. bicolor* indiquent aucune différence significative de la longueur à 1 semaine de co-culture, exceptée pour la lignée 323 (*ASPIN9*). En revanche, une différence est observée à 2 et 3 semaines ([Figure 31C](#)). En considérant les longueurs moyennes des RLs suivies à 2 et 3 semaines, aucune différence

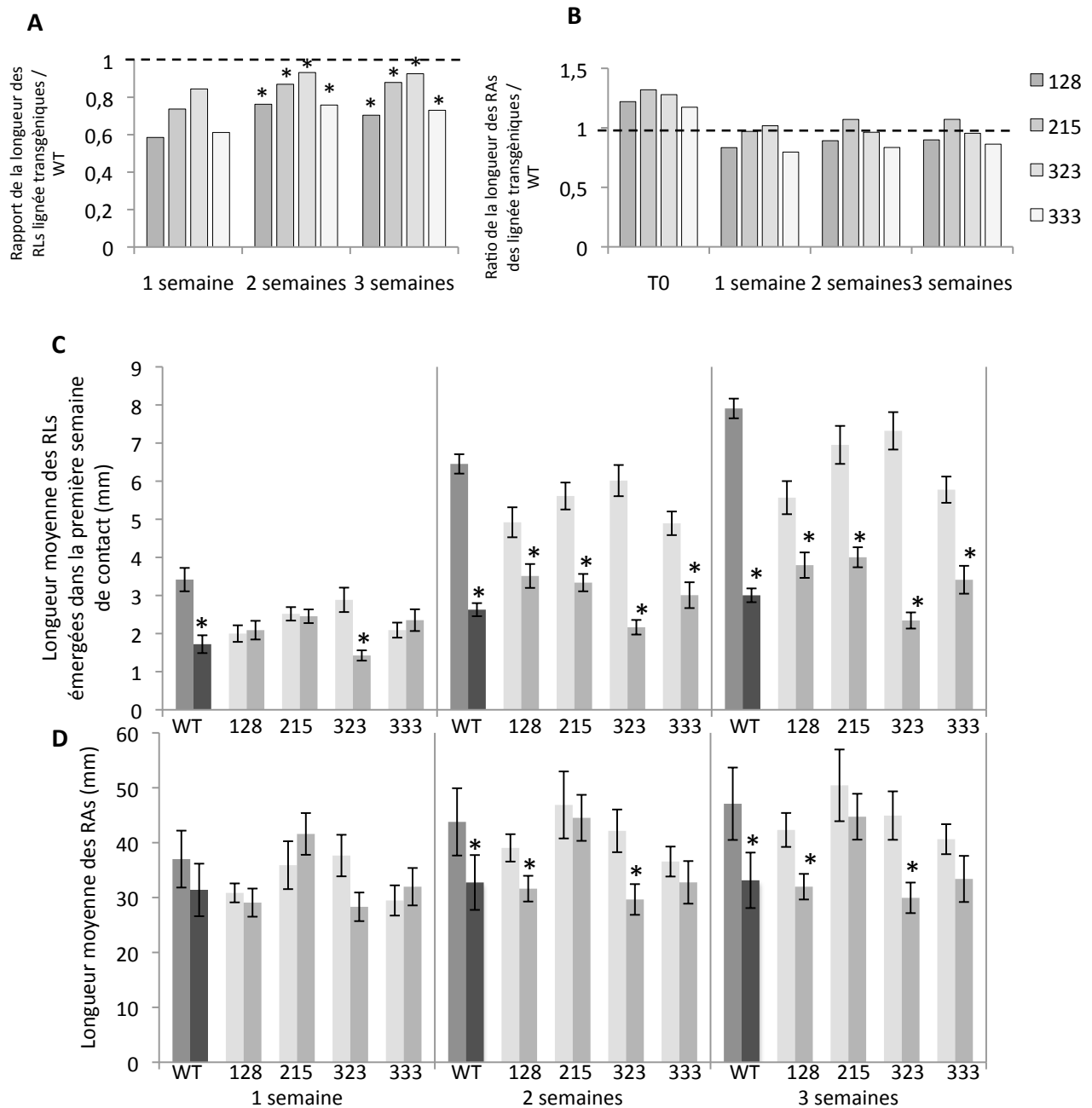


Figure 31 : Un arrêt de croissance racinaire est observé dans racines des plantes transgéniques *ASPIN9* et *35S::PIN9* mycorhizées par *L. bicolor*

A et B ; Rapport de la longueur moyenne des RAs (formées dans la 1^{er} semaine de co-culture ; A) et adventives (RAs) (B) des lignées transgéniques *35S::PIN9* (128 et 215) et *ASPIN9* (323, 333) / longueur moyenne de la lignée sauvage après une, deux et trois semaines. Les étoiles indiquent une différence significative entre la longueur des racines de la lignée sauvage et celles des lignées transgéniques (test de Student en accord avec un test de Fischer $p \leq 0,05$; $n=6$ à 7 plantes).

C et D ; longueur moyenne (+/- SE) des RAs formées dans la première semaine de contact (C), des racines adventives (RAs) ; E, des peuplier de lignées sauvages des lignées transgéniques en contact avec *L. bicolor* (barres grises claires) ou en condition témoin (barres grises foncées) après 1, 2 et 3 semaines. Les étoiles représentent une différence significative entre la longueur des racines en contact avec *L. bicolor* et en condition contrôlée (test de Student en accord avec un test de Fischer $p \leq 0,05$; $n=6$ à 7 plantes).

significative de la longueur des RLs n'est observée pour les racines en co-cultures avec *L. bicolor* ([Figure 31C](#)). Ces résultats montrent que la sur-expression ou sous-expression de *PtaPIN9* n'affecte pas l'arrêt de croissance des RLs en réponse à *L. bicolor*. Il est néanmoins possible que les modifications d'expression de *PtaPIN9* modifient la cinétique d'inhibition de croissance en réponse à *L. bicolor*.

Concernant la longueur moyenne des RAs ([Figure 31D](#)), pour les peupliers de la lignée sauvage, les racines sont plus petites après 2 et 3 semaines de co-culture avec *L. bicolor* ([Figure 31D](#)). Dans le cas des plantes transgéniques *35S::PIN9* et *ASPIN9*, les racines sont plus courtes en contact avec *L. bicolor* pour une des lignées (128 et 323), alors que pour l'autre (lignées 215 et 333), aucune différence significative de la longueur moyenne est observée ([Figure 31D](#)). Ce phénotype peut s'expliquer par un arrêt de croissance des RAs témoins entre 2 et 3 semaines, dû aux limites de nos conditions de culture. En effet aucune différence significative n'est observée entre 2 et 3 semaines pour l'ensemble des lignées sauvage et transgéniques dans les conditions témoins.

3.6 Les modifications de l'expression de *PtaPIN9* n'affectent pas la formation de la mycorhize

PtaPIN9 étant localisée dans l'épiderme de la racine ([Figure 25](#)), et pourrait être impliquée dans le transport polarisé de l'auxine. La capacité des lignées transgéniques *35SPIN9* et *ASPIN9* à former des mycorhizes a donc été évaluée.

Après 3 semaines de contact avec *L. bicolor*, les RLs colonisées des lignées transgéniques *35S::PIN9* (lignée 128) et *AS::PIN9* (lignée 333) possède un manteau dense d'hyphes fongiques et un arrondissement de l'apex racinaire similaire aux racines de la lignée sauvage (comparaison des [Figures 32A, E et I](#); flèches noires). L'observation de coupes transversales de ces racines met en évidence la présence entre les cellules de l'épiderme du réseau de Hartig ([Figures 32B, C, F, G, J et K](#)).

En absence de contact avec *L. bicolor*, la répartition des RLs selon leurs longueurs après 3 semaines révèle que 40% des RLs du système racinaire des peupliers de la lignée sauvage, ont une longueur inférieure à 3mm. Dans les lignées transgéniques *ASPIN9* (333), et *35S::PIN9* (128), 54% et 70% des RLs respectivement présentent cette caractéristique

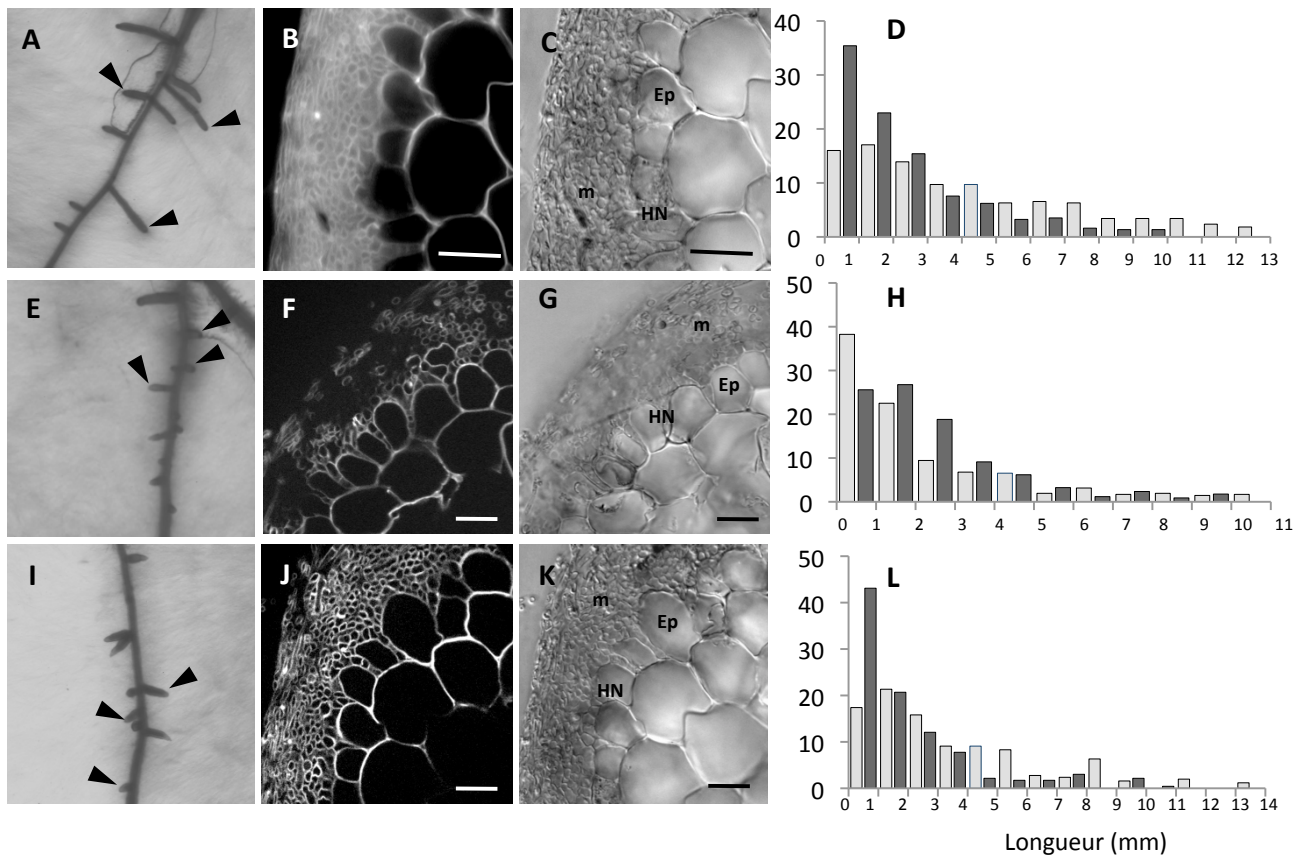


Figure 32 : Les lignées de peuplier 35S::PIN9 et ASPIN9 forment des mycorhizes

Caractérisation des mycorhizes matures formées après 3 semaines de contact entre *L. bicolor* et les racines des lignées de peuplier sauvages (A-D), des lignées transgéniques 35S::PIN9 (128 ; E-H) et ASPIN9 (333 ;I-L) ; observations macroscopiques (A, E, I), observations microscopiques de coupes transversales des mycorhizes colorées à l'iodure de propidium; B, E, H : observation en épifluorescence ; C, F, I : observation en fond clair ; Répartition en pourcentage de racines totales, des racines latérales après 3 semaines de contact avec *L. bicolor* (barres grises foncées) et en condition témoin (barres grises claires ; D, H, L). Les racines représentant moins de 1% des racines totales ne sont pas représentées.

Ep : cellule épidermique, HN : Réseau de Hartig ; m : manteau fongique Barres = 20 µm

(Figures 32D, H, L). Cette diminution peut s'expliquer par une plus forte densité de racines nouvellement émergées et donc plus courte. En présence de *L. bicolor*, 72 à 75% des racines en contact avec *L. bicolor* sont inférieures à 3 mm chez les plantes WT ainsi que pour les lignés transgéniques *35S::PIN9* et *ASPIN9* (Figures 32D, H, L). Il semble donc que les modifications de l'expression de *PtaPIN9* ne modifient pas la capacité de la plante à former de nombreuses racines courtes avec un réseau de Hartig développé.

4 Discussion et perspectives

La localisation polarisée de PtaPIN9 à la partie apicale de la membrane plasmique des cellules de la zone méristématique met clairement en évidence un rôle putatif de PtaPIN9 dans le transport basipète de l'auxine, au niveau de l'apex des racines de peuplier, de manière identique à AtPIN2 (Luschnig *et al.*, 1998 ; Rashotte *et al.*, 2000).

Les lignées transgéniques *35S::PIN9* et *ASPIN9* présentent une densité de RLs plus importante dans nos conditions de culture comparée à la lignée sauvage. Gou et ses collaborateurs (2010) ont également décrit une augmentation de la densité des RLs des lignées *35S::PIN9*, mais aucune différence n'a été observée pour les lignées *ASPIN9* (Gou *et al.*, 2010). Les densités de RLs plus importantes observées dans nos conditions de culture confirment une fonction de PtaPIN9 dans la formation des RLs chez le peuplier. Curieusement, le phénotype racinaire des lignées *35S::PIN9* est identique à celui des lignées *ASPIN9*. Chez *A. thaliana*, les transporteurs PINs sont régulés par des mécanismes complexes, à différents niveaux : transcriptionnels, leurs modifications post-transcriptionnels, leurs adressages polarisés à la membrane plasmique ainsi que leurs interaction avec d'autres protéines à la membrane plasmique (Petrásek & Friml, 2009). Il est donc possible que le niveau de protéines actives à la membrane plasmique ne soit pas régulé de manière identique dans les lignées *35S::PIN9* et *ASPIN9*. De plus, les niveaux de l'expression d'autres membres de la famille des *PtaPIN* sont affectés dans les racines des lignées transgéniques *ASPIN9* et *35S::PIN9* (V. Busov, communication personnelle). Ces données supposent un réseau complexe de la régulation de l'expression des membres de cette famille entre elles. Par ailleurs, dans les racines *A. thaliana* il a été montré une redondance fonctionnelle et de localisation des protéines PINs notamment pour AtPIN2 (Blilou *et al.*, 2005). Ainsi les simples mutants de la famille des PINs n'ont pas de phénotype racinaire prononcé en terme de RLs

ou de longueur de la racine. A l'opposé de ce qui a été décrit chez *A. thaliana*, chez le peuplier (*P. tremula* x *P. alba*) la modification de l'expression d'un membre de la famille *PtaPIN9* induit des modifications de l'expression des différents membres et un phénotype visible de la formation des RLs ainsi que de leur croissance. Nous pouvons donc suggérer des régulations différentes des membres de cette famille entre *A. thaliana* et *P. tremula* x *P. alba*.

Contrairement à la lignée sauvage, dans les lignées *35S::PIN9* et *ASPIN9*, *L. bicolor* n'induit pas de stimulation de formation des RLs.

Nos résultats suggèrent que les lignées transgéniques de peuplier, sur-exprimant ou sous-exprimant *PtaPIN9* sont insensibles à *L. bicolor* en terme de stimulation de formation de RLs. Dans l'analyse de ce résultat, l'augmentation de la densité de RLs dans les lignées transgéniques (*35S::PIN9* et *ASPIN9*) comparées à la lignée sauvage en condition contrôle est à prendre en considération. Ainsi, deux hypothèses s'offrent à nous ;

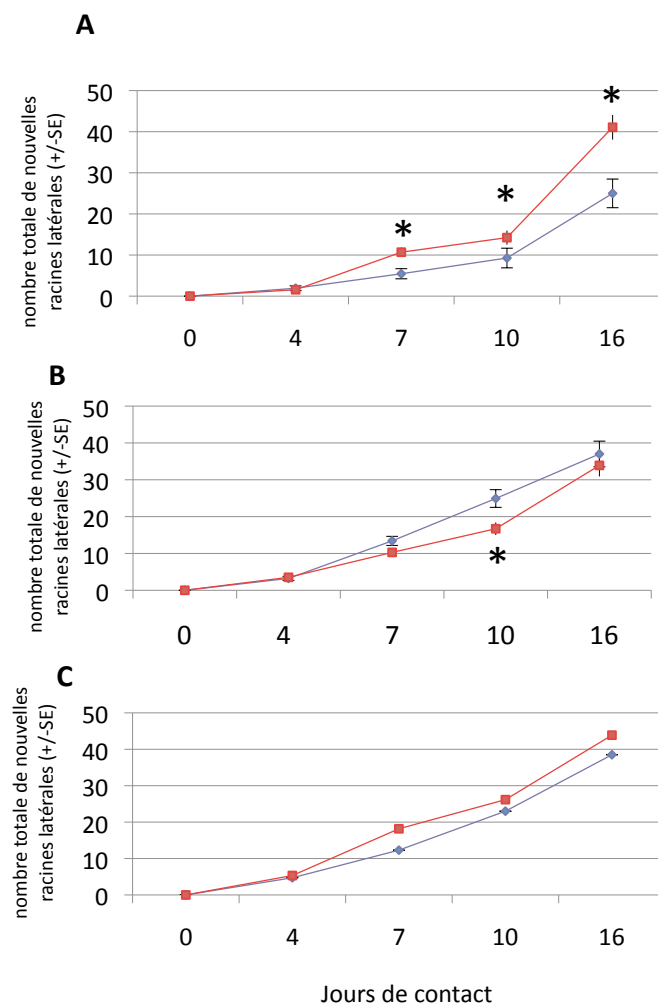
- Nos résultats indiquent qu'une perturbation trop importante de l'expression de *PtaPIN9* dans les lignées *35S::PIN9*, ne conduit pas à une augmentation du nombre de RLs en présence de *L. bicolor*. En effet, en réponse à *L. bicolor* l'expression de *PtaPIN9* est augmentée de 4 fois (Felten *et al.*, 2009), alors qu'elle est de plus de 10 fois dans les lignées *35S::PIN9* (Gou *et al.*, 2010 ; [Encadré 7](#)). De plus, aucune modification de localisation majeure de la localisation de *PtaPIN9* n'a été observée en immunolocalisation en réponse à *L. bicolor* chez les plantes sauvage. Ce qui supporte la nécessité d'une régulation « très fine » de *PtaPIN9* lors de la stimulation RLs. Il est possible que cette augmentation soit seulement d'intensité, ce qui n'est pas quantifiable sur des coupes de racines. Toutefois, des données préliminaires de l'analyse du signal de fluorescence des lignées *pAtPIN2::AtPIN2::GFP* chez *A. thaliana* en réponse à *L. bicolor* n'indiquent pas de modification majeure de l'intensité du signal de fluorescence. Il semble donc que *PtaPIN9* soit impliqué dans la formation des RLs en réponse à *L. bicolor* mais des analyses plus précises de sa localisation et de son intensité sont à réaliser pour comprendre son rôle.
- Nous ne pouvons exclure que *L. bicolor* n'induit pas de formation de nouvelles RLs chez les lignées transgéniques *ASPIN9* et *35S::PIN9* car celles-ci possèdent déjà un nombre élevé de RLs, suggérant que le signal de *L. bicolor* n'est pas additif à celui

observé chez les lignées transgéniques et donc que la stimulation de nouvelles RLs passe par la modification de l'expression de *PtaPIN9*.

Dans les étapes plus tardives de formation de la mycorhize, les lignées transgéniques *ASPIN9* et *35S::PIN9* sont capables de former des mycorhizes possédant un réseau de Hartig. L'implication du transport polarisé dans la formation du réseau de Hartig par *L. bicolor* (Karabaghli-Degron *et al.*, 1998 ; Rincón *et al.*, 2003) suggère qu'il existe d'autres acteurs dans ce transport qui pourraient être impliqués. De plus, il a déjà été montré, dans d'autres systèmes d'interactions plante-microorganisme la localisation spécifique de ces transporteurs dans les tissus de la plante hôte en contact avec le partenaire (Grunewald *et al.*, 2009b ; Perrine-Walker *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2011).

La diminution de l'expression de *PtaPIN9* dans les mycorhizes, observée dans les données transcriptomiques, peut être mise en relation avec l'absence de PtaPIN9 dans la mycorhize. A ce stade de la colonisation, la formation du réseau de Hartig s'accompagne par une élongation radiale et une différenciation des cellules épidermiques (Massicotte *et al.*, 1987 ; Horan *et al.*, 1988). Ainsi, cette disparition du signal d'immunolocalisation s'expliquerait par un remodelage de la zone d'expression principale de *PtaPIN9*. Toutefois, une expression de *PtaPIN9* est encore quantifiable dans les mycorhizes des lignées transgéniques *35S::PIN9*, ce qui suggère que la zone d'expression, de *PtaPIN9* est toujours présente dans la mycorhize mature. Ce résultat est à confirmer en immunolocalisation.

En conclusion, la modification de l'expression de *PtaPIN9* dans les racines de peuplier *35S::PIN9* et *ASPIN9* induit des modifications du développement racinaire. En réponse à *L. bicolor*, la régulation « fine » de l'expression *PtaPIN9* est importante dans le phénotype de stimulation de la formation des RLs. PtaPIN9 ne semblent pas avoir un rôle important dans l'arrêt de croissance racinaire lors de la formation de la mycorhize, ainsi que la formation du réseau de Hartig, malgré la disparition de PtaPIN9 dans les mycorhizes matures.



Annexe 2 : La co-culture avec *L. bicolor* n'induit pas de stimulation de RLs dans les racines de peupliers *ASPIN9* et *35sPIN9*.

Nombre de nouvelles RLs formées des peupliers *P. tremula* x *P. alba* (A), de la lignée *ASPIN9* (lignée 333 ; B) et *35S::PIN9* (lignée 128; C), au cours de la co-culture avec *L. bicolor* (courbe rouge) ou en condition témoin (courbe bleu). Les étoiles représentent une différence significative entre la longueur des racines avec ou sans *L. bicolor* (test de Student, accordé à un test de Fischer $p\text{-value} < 0,05$; $n=15$ plantes).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans la littérature, les observations de l'architecture racinaire de la plante hôte en réponse aux champignons ECMs ont révélé leurs effets dans deux processus développementaux majeurs, la formation de nouvelles RLs et la croissance racinaire (Sukumar *et al.*, 2013). La stimulation de la formation de nouvelles RLs en réponse aux champignons ECM a été caractérisée et certains gènes candidats ont été identifiés dans notre modèle d'étude peuplier-*L. bicolor* (Felten *et al.*, 2009).

Les études que j'ai réalisées, ont mis en évidence un arrêt de la croissance racinaire lors de l'interaction entre le peuplier et *L. bicolor* et suggèrent que la formation du réseau de Hartig ne participe pas à l'arrêt de la croissance.

Mon travail s'est ensuite focalisé sur l'implication de l'auxine dans la formation de la mycorhize. Les résultats de ce travail ont permis de révéler des modifications de la réponse, de la signalisation ainsi que du métabolisme de l'auxine dans la mycorhize. Il a aussi été possible d'évaluer la quantité d'auxine apportée par le champignon dans notre système. De plus, une analyse globale de l'expression des gènes a permis de révéler de nombreux candidats qui pourraient être impliqués dans l'arrêt de croissance racinaire.

L'implication d'un acteur du transport polarisé de l'auxine, PtaPIN9, a été étudiée dans les deux processus développementaux. Les résultats obtenus indiquent que la modulation de l'expression de *PtaPIN9* inhibe la stimulation de la formation des RLs mais n'affecte pas la croissance racinaire en réponse au champignon.

Dans cette dernière partie, je propose une discussion générale qui intègre l'ensemble des résultats obtenus. Parallèlement, je proposerai des perspectives à court terme, qui permettront de compléter les études réalisées. Des perspectives à plus long terme, concernant les mécanismes de compréhension de l'interaction peuplier-*L. bicolor* seront finalement décrites.

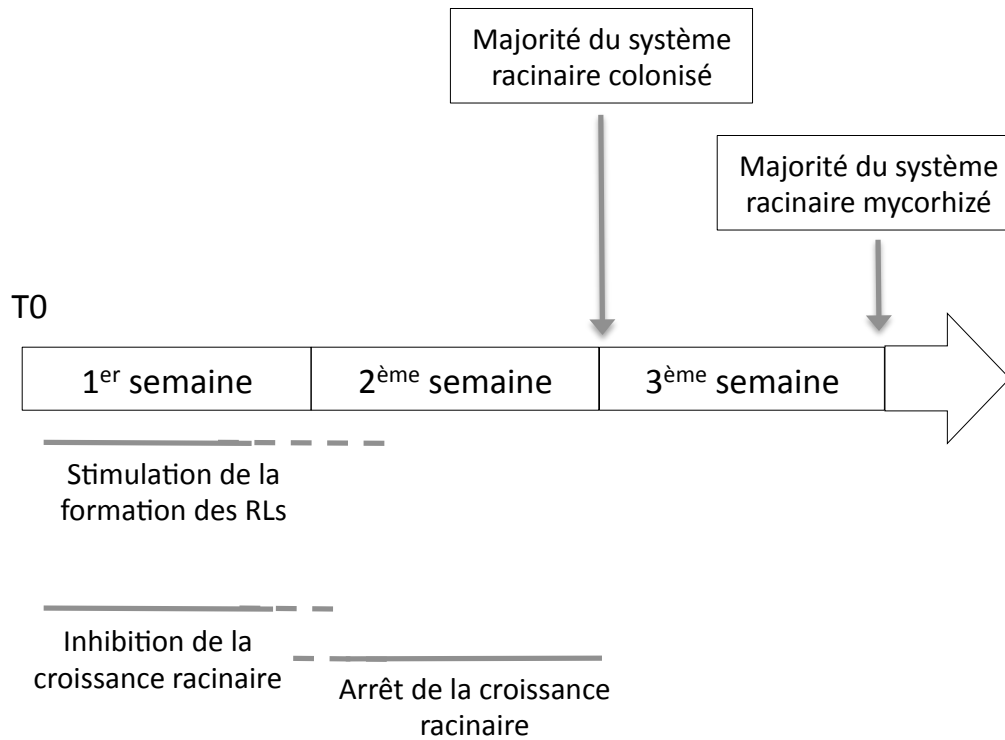


Figure 33 : Cinétique des événements observés au cours de la formation de la mycorhize entre l'hybride de peuplier *P. tremula x P. alba* et *L. bicolor* en condition de culture *in vitro* sandwich

La comparaison de la longueur des racines avec ou sans *L. bicolor* a permis de montrer une inhibition de la croissance des racines adventives et latérales dès la première semaine de contact et un arrêt de croissance, à partir de 2 semaines de contact. Notez que ces événements ont lieu avant que la majorité du système racinaire soit mycorhizé.

1 Arrêt de la croissance racinaire de la plante hôte dans le contexte ECM

1.1 Cinétique de l'arrêt de la croissance racinaire

Nous avons débuté notre étude par l'analyse de l'effet de la colonisation de *L. bicolor* sur la croissance racinaire du peuplier *P. tremula* x *P. alba*. Les résultats indiquent une inhibition de la croissance des RLs et des racines adventives dès la première semaine de contact avec *L. bicolor*. Avec l'hybride de peuplier *P. tremula* x *P. tremuloides* (clone UPSC, T89 ; possédant la construction DR5::GUS), l'inhibition de la croissance racinaire induite par *L. bicolor* est observable à partir de 2 semaines de co-culture. Cette différence peut s'expliquer par une croissance plus lente de cet hybride, comparé à l'hybride de *P. tremula* x *P. alba*. Cette inhibition se traduit par la suite par un arrêt de croissance à partir de 2 semaines de contact avec *L. bicolor* ([Figure 33](#)).

Une inhibition de croissance racinaire a déjà été décrite dans d'autres interactions ECM dont *Cistus incanatus*-*Tuber sp.* (Splivallo *et al.*, 2009). En revanche, d'autres observations, réalisées sur des plantes hôtes appartenant au sous-embranchement des gymnospermes, décrivent une augmentation de la longueur racinaire en réponse à différents champignons ECMs (Karabaghli *et al.*, 1998 ; Tranvan *et al.*, 2000 ; Niemi *et al.*, 2002 ; Rathnayake *et al.*, 2008). Il semble donc que le phénotype est dépendant du couple de partenaires étudiés. Ces différences peuvent aussi s'expliquer par les protocoles de co-cultures utilisés (Müller *et al.*, 2013). En effet, dans nos conditions, nous appliquons le champignon directement sur la racine de peuplier déjà développée (voir [encadré 6](#)), alors que dans d'autres systèmes de culture, les deux partenaires vont se développer en parallèle dans le même environnement. Ce deuxième type de disposition des partenaires peut modifier la croissance des plantes afin que celle-ci se développe vers le partenaire fongique.

Une étude précédente a montré que la stimulation des RLs en réponse à *L. bicolor* est observée à partir de 3 jours de contact ([Figure 33](#) ; Felten *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'examiner la dynamique de chacun de ces deux événements ainsi que leur coordination.

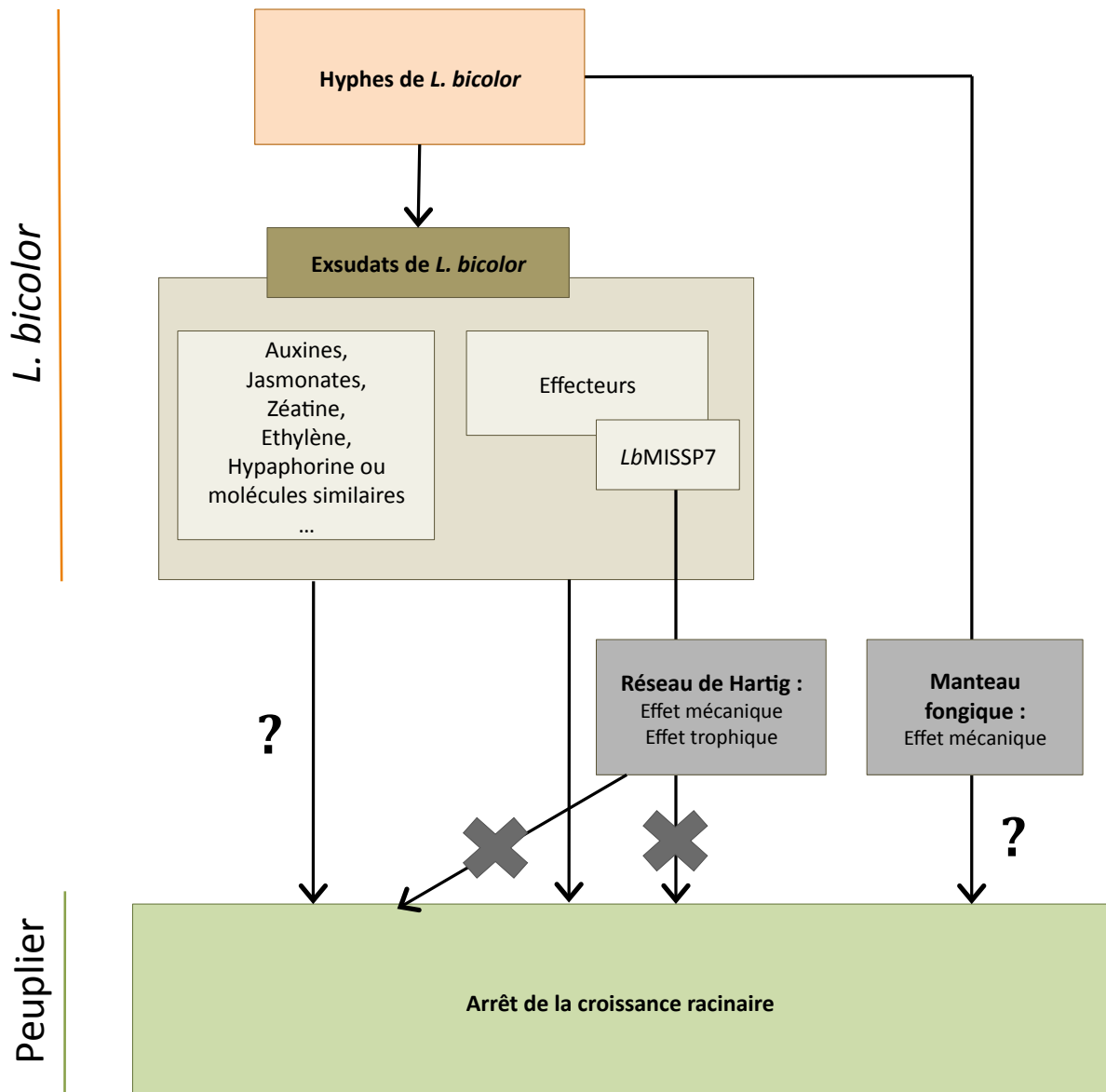


Figure 34 : Modèle hypothétique de l'impact de *L. bicolor* dans la croissance de la racine

La présence du réseau de Hartig n'est pas à l'origine de l'arrêt de la croissance racinaire observé. Il ne semble pas que le peptide MISSP7 influence la signalisation auxinique. Il est possible que seule la présence du manteau fongique et des molécules sécrétées par le champignon dans l'apoplaste soit responsable de ce phénotype. D'autres pistes, telles que des molécules connues pour arrêter la croissance sont à suivre (jasmonates ou l'éthylène produit par le champignon).

1.2 L'arrêt de la croissance racinaire est-elle dépendante de la colonisation de la racine par le partenaire fongique?

Nous avons tenté de comparer la cinétique d'arrêt de croissance avec celle des étapes de colonisation de la racine par le champignon. Nos observations ont montré qu'après 1 et 2 semaines de co-culture, la majorité des RLs ne sont pas encore à un stade appelé « mycorhize mature ». A ce stade, la racine est entourée d'un manteau fongique mais ne présente pas de réseau de Hartig. Néanmoins, la croissance racinaire est inhibée ([Figure 33](#)). Il semble donc que l'inhibition et l'arrêt de croissance racinaire ne soient pas dépendants de présence du réseau de Hartig.

Parallèlement, l'observation de l'arrêt de croissance racinaire des plants de peuplier en contact avec des lignées transgéniques de *L. bicolor* incapables de former du réseau de Hartig, confirme que le réseau de Hartig ne participe pas à l'arrêt de croissance racinaire ([Figure 34](#)). Ces deux résultats nous permettent donc de conclure que les relations trophiques entre les deux partenaires ou que l'effet mécanique du réseau de Hartig ne conditionne pas la croissance des racines de peuplier en contact avec *L. bicolor*. L'arrêt de la croissance pourrait être dépendant de la présence mécanique du manteau fongique à la coiffe racinaire ([Figure 34](#)), haut lieu de captation des signaux du sol (Barlow, 2003 ; Iijima *et al.*, 2004 ; Hahn *et al.*, 2008). La première perspective à court terme, sera d'analyser la croissance racinaire de peuplier en contact avec des lignées transgéniques de *L. bicolor* formant un manteau fongique réduit autour de la racine (Claire Veneault-Fourrey communication personnelle).

De plus, il est possible que seule la présence d'une ou plusieurs molécules produites par le champignon soit capable d'influencer la croissance de la racine de peuplier ([Figure 34](#)). L'analyse de la croissance racinaire en contact indirect, où les hyphes du champignon sont séparés de la plante hôte par la présence d'une membrane perméable, sera réalisée afin de répondre à cette question. Des analyses préliminaires ont montré que dans ces conditions, une inhibition de la croissance est observée. Elle est néanmoins plus faible que celle décrite dans la formation de la mycorhize en contact direct (Felten, 2009).

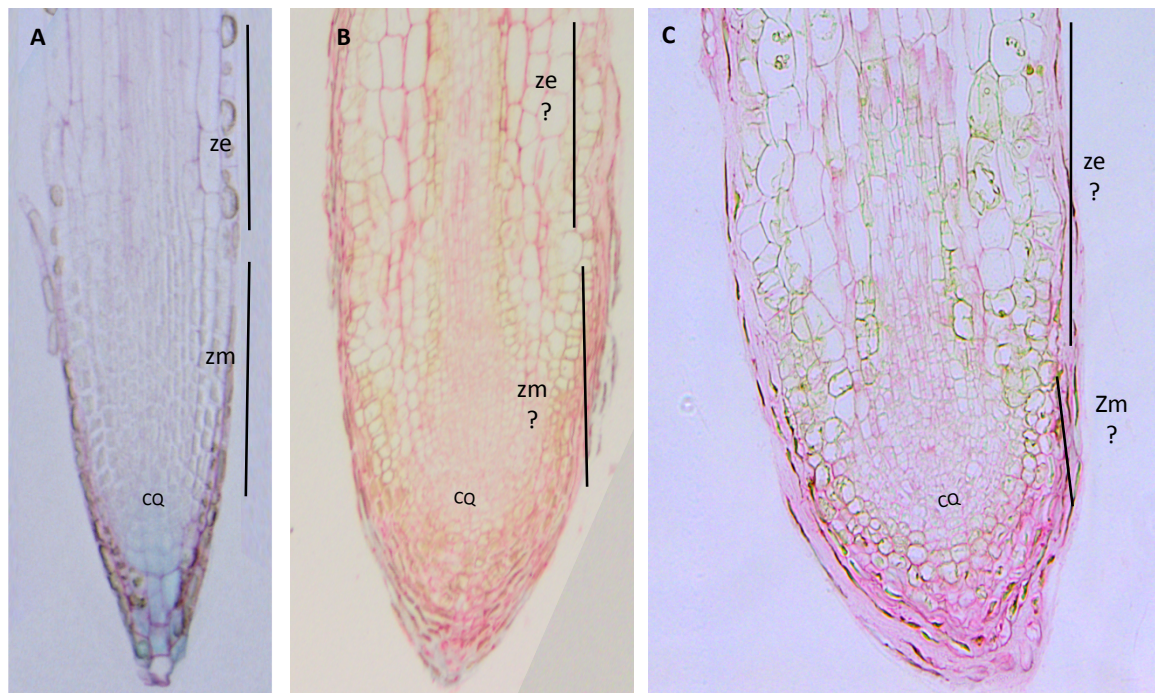


Figure 35 : Observation de la structure de la racine dans la formation de la mycorhize

Coupes semi fines en résine (5 μ m) de racines récoltées à 2 semaines en condition témoin (A), en contact avec *L. bicolor*, stade de colonisation (B) et dans la mycorhize mature (C), colorées au rouge de Ruthenium. Observation de la zone méristématique (zm) et d'élongation/différenciation cellulaire (ze). CQ : centre quiescent.

1.3 Quels sont les mécanismes de l'équilibre division-élongation/différenciation impliqués dans l'inhibition de croissance racinaire ?

Les cellules de la coiffe racinaire sont produites par les cellules initiales et sont sujettes à un renouvellement important (Barlow, 2003). La présence du manteau fongique dense à la coiffe racinaire pourrait inhiber cette dynamique. De plus, « la route de l'auxine » à l'apex de la racine emprunte les cellules de la coiffe latérale (Petrásek & Friml, 2009).

L'étude cytologique de la taille de la coiffe racinaire, de la zone méristématique ainsi que de la zone d'élongation-différenciation est un préambule important dans la recherche des acteurs cibles des signaux du champignon. Les premières observations réalisées sur des coupes longitudinales à différents stades de la mycorhization indiquent un raccourcissement de la coiffe racinaire. De plus, elles indiquent que les cellules proches de l'apex racinaire de la mycorhize mature ne sont pas allongées mais présentent un état de différenciation avancé ([Figure 35](#)). Nous savons que les *primordia* racinaires sont visibles dans la zone de différenciation (Malamy & Benfey, 1997). La comparaison de la distribution du dernier *primordia* racinaire formé le long de la racine principale nous a permis de constater que celui-ci est plus proche de l'apex racinaire dès la première semaine de co-culture avec *L. bicolor*, suggérant que la zone méristématique est progressivement réduite au cours de la formation de la mycorhize. Par ailleurs, il est donc essentiel d'analyser l'état de différenciation des cellules dans l'apex racinaire. Au cours de ma thèse, j'ai initié ce travail ([Figure 35](#)). Cette étude est maintenant reprise dans le cadre du projet Post-Doctoral de R. Teixeira.

A partir des données transcriptomiques, nous avons mis en évidence la régulation de l'expression de certains membres de la famille des SCR (pour SCRarecrow) et AGL (pour AGamous Like) qui sont considérés comme des régulateurs de l'activité méristématique (Lenhard *et al.*, 2001 ; Sabatini *et al.*, 2003). Une partie du projet de recherche de R. Teixeira vise à caractériser la fonction de certains facteurs de transcription connus chez *A. thaliana* pour être impliqués dans la régulation de l'activité méristématique et dont l'expression des gènes est régulée dans la mycorhize.

De plus, la caractérisation de l'organisation des tissus racinaires mycorhizés comparés aux racines témoins permet d'aller plus loin dans l'étude de l'expression globale des gènes régulés au sein de l'organe. En effet, dans le cadre de l'étude de l'expression des gènes dans un processus développemental induisant des modifications morphologiques, il est essentiel de distinguer si le changement de l'expression des gènes est à l'origine du phénotype (1) ou si la modification des tissus va induire une modification d'expression des gènes étudiés (2).

(1) $A \rightarrow B \rightarrow$ Modification du tissu X en Y

(2) $A \rightarrow$ Modification du tissu X en Y $\rightarrow B$

En d'autres termes, l'analyse nous permettra de conclure si la modification des gènes observée est la cause ou la conséquence de ces changements morphologiques.

2 Les changements de l'homéostasie auxinique dans la mycorhize expliquent-ils le phénotype d'arrêt de la croissance racinaire ?

La régulation du gradient auxinique à l'apex racinaire joue un rôle majeur dans la croissance de la racine (Parizot & Beeckman, 2013). En effet, la régulation de sa concentration *via* les acteurs du transport polarisé de l'auxine maintient la transition entre la division et l'élongation/différentiation cellulaires (Jones & Ljung, 2012). L'analyse de la localisation du gradient auxinique ainsi que la quantification de l'AIA dans les tissus, ont été nos principales directions de recherche. Elles nous permettront de comprendre le rôle de l'auxine dans l'arrêt de croissance racinaire.

2.1 Le gradient auxinique à l'apex racinaire est-il modifié dans la mycorhize?

L'un des objectifs de la thèse a été d'analyser le gradient auxinique dans la formation de la mycorhize. Dans un premier temps, nous avons utilisé un outil couramment utilisé : le promoteur rapporteur de la réponse à l'auxine nommé DR5::GUS. Une plus faible réponse de ce promoteur est observée dans la mycorhize mature comparée aux RLs témoins. Un

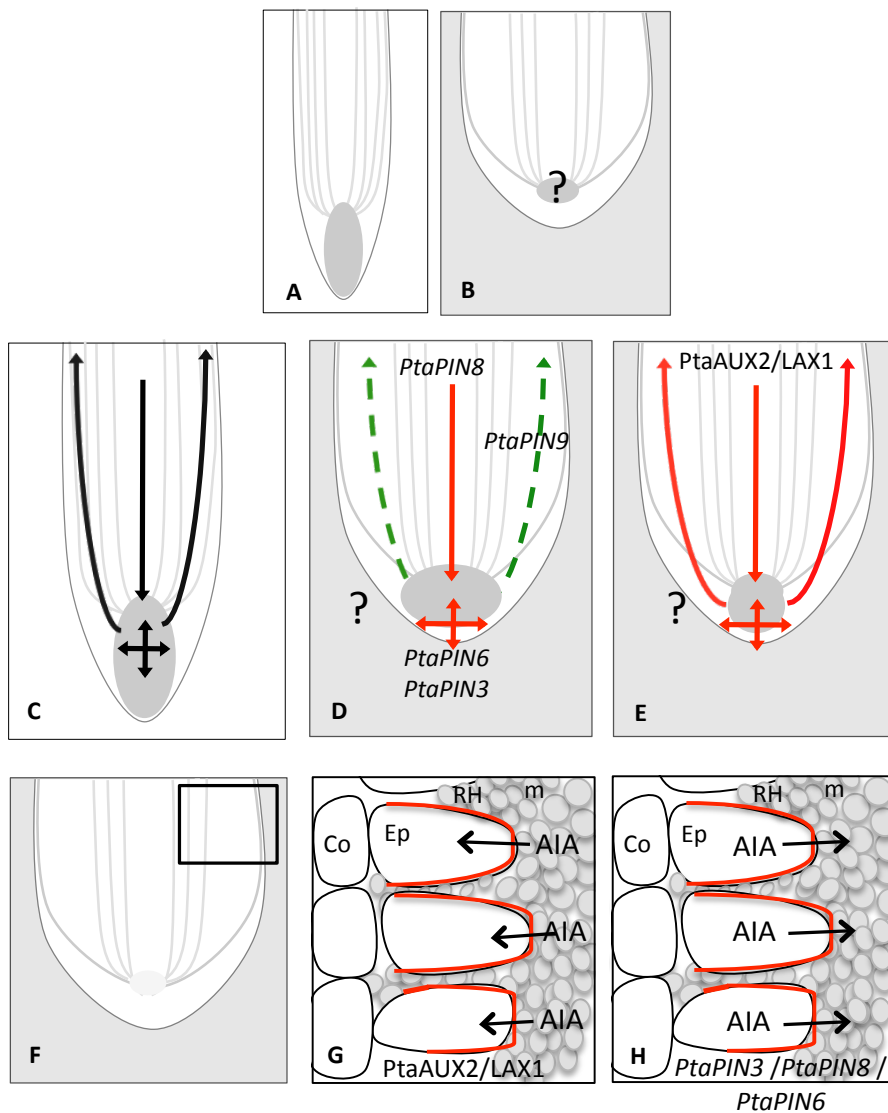


Figure 36 : Représentation hypothétique des flux d'auxine dans la mycorhize mature

A et B ; Schématisation d'une racine de peuplier témoin (sans *L. bicolor* ; A), et des tissus de la racine dans la mycorhize mature (B). Le rond gris représente le gradient auxinique observé à l'apex racinaire en utilisant la lignée promoteur rapporteur DR5::GUS. Dans la mycorhize mature, cet outil ne peut être utilisé comme rapporteur de la réponse à l'auxine. C ; Flux d'auxine connu pour réguler le gradient auxinique à l'apex racine d'*A. thaliana*. D à E ; Observations putatives du gradient auxinique à l'apex racinaire selon les flux d'auxine, pouvant être régulés dans la mycorhize mature. Les flèches représentent des flux d'auxine dans les tissus selon l'acteur du transport de la famille des PtaPIN (D) et PtaAUX/LAX (E). La flèche est rouge si l'expression du gène associé est régulée positivement dans la mycorhize et verte si celle-ci est régulée négativement. L'hypothèse que la protéine orthologue de peuplier a une fonction et une localisation homologue de celle connue chez *A. thaliana* a été supposée vraie (annotation Carraro *et al.*, 2012).

Nous pouvons aussi supposer comme il a été décrit chez d'autres interactions symbiotiques ou pathogènes, que les transporteurs d'auxine, dans la mycorhize ne sont plus spécifiques de la même lignée cellulaire que dans les conditions témoins, mais ont une localisation spécifique aux tissus en contact avec le microorganisme (Péret *et al.*, 2007; Perrine-Walker *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

F à G : Dans le réseau de Hartig (F ; carré noir), PtaAUX2/LAX1 (G), PtaPIN8 et PtaPIN6 pourraient être impliquées dans l'import ou l'export de l'AIA dans les cellules épidermiques. Co : cellules du cortex ; Ep : cellules de l'épiderme ; RH : réseau de Hartig, m, manteau d'hyphes fongiques.

résultat identique a été obtenu dans les mycorhizes de la lignées de peuplier *P. tremula* x *P. alba* possédant la construction GH3::GUS en interaction avec *P. involutus* (Luo *et al.*, 2009). Dans notre cas, nous observons aussi une perte de réponse du promoteur DR5 suite à l'application exogène d'auxine dans les tissus mycorhiziens. Dans la mycorhize mature l'activité du promoteur DR5 ne reflète donc pas la quantité d'auxine perçue par la racine ([Figures 36A et 36B](#)).

Les modèles mathématiques utilisés dans la modélisation des flux d'auxine ont montré que la localisation spatiale des protéines PINs explique le gradient auxinique à l'apex de la racine (Grieneisen *et al.*, 2007). Notre analyse transcriptomique a mis en évidence que les expressions de *PtaPIN8* (orthologue à *AtPIN1*), *PtaPIN3* et *PtaPIN6*, (orthologues à *AtPIN3*), sont régulées positivement dans la mycorhize alors que *PtaPIN9* (orthologue à *AtPIN2*), est régulé négativement. Nous savons, à travers l'immunolocalisation de *PtaPIN9*, que la protéine n'est plus présente dans la mycorhize mature. Si on tente de schématiser ces flux en fonction des gènes régulés ([Figures 36C à 36E](#)), on peut suggérer une augmentation du flux auxinique dans le cylindre central vers l'apex racinaire *via* *PtaPIN8*, ainsi qu'une augmentation de sa redistribution dans la coiffe racinaire *via* *PtaPIN3* et *PtaPIN6*. En revanche, si *PtaPIN9* ne transporte plus l'auxine de manière basipète, l'auxine devrait s'accumuler en concentration plus importante à l'apex racinaire ([Figure 36D](#)). Parallèlement, l'expression du gène *PtaAUX2/LAX1* orthologue au gène *AtAUX1*, codant un transporteur d'influx de l'auxine dans *A. thaliana*, est régulée positivement dans la mycorhize. *AtAUX1* participe au transport basipète de l'auxine dans la coiffe latérale et dans l'épiderme de la racine, ce qui suggère une régulation plus complexe des flux d'auxine à l'apex racinaire mycorhizé ([Figure 36E](#)). De plus, l'expression de *PtaABCB19* orthologue à *AtABCB19* est aussi régulée positivement, la protéine *PtaABCB19* pourrait être impliquée dans les flux d'auxine à l'apex racinaire, car la localisation polarisée de *AtABCB19* a été décrite dans les racine d'*A. thaliana* (Titapiwatanakun *et al.*, 2009). La localisation des autres membres du transport polarisé de l'auxine pourrait donc être utilisée comme outil afin d'estimer les flux d'auxine à l'apex racinaire et de ce fait le gradient d'auxine.

Cette stratégie de localisation de ces transporteurs pourrait s'accompagner de la modélisation des flux d'auxine. En combinant ce modèle avec les données cytologiques de l'évolution de la taille cellulaire, cela nous donnera une idée plus claire des changements du gradient d'auxine.

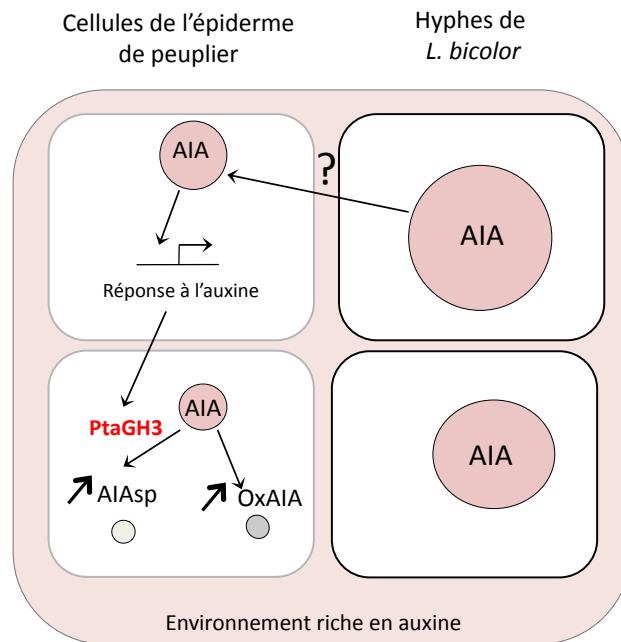



Figure 37 : Observations suggérant un fort environnement auxinique des cellules épidermiques de la plante en contact avec les hyphes de *L. bicolor*

Les hyphes de *L. bicolor* contiennent une concentration plus élevée en AIA (10 à 25 fois) que dans l'apex de peuplier. Si celle-ci est transportée vers la plante hôte, elle induit la signalisation auxinique et l'activation de gènes de réponse à l'auxine dont *PtaGH3-1*. Ce gène code une AIA-amino-synthase, connue pour conjuguer l'AIA avec des acides aminés dont l'AIAsp (pour IAA-aspartate). L'AIAsp et le métabolite de dégradation OxIAA (pour acide 2-oxoindole-3-acétique) sont en plus grande quantité dans les racines en contact avec *L. bicolor* et dans la formation de la mycorhize

 Représentation de la quantité d'AIA dans la cellule

2.2 L'environnement auxinique est-il affecté en contact avec *L. bicolor* ?

Afin d'estimer la quantité d'auxine perçue par la racine en contact avec les hyphes de *L. bicolor*, notre stratégie a été de quantifier l'auxine et ses métabolites associés dans les deux partenaires ainsi que dans la mycorhize. Dans nos conditions de culture, une forte quantité d'AIA et de ses précurseurs (IPyA et Ant) ont été détectés dans les hyphes de *L. bicolor*, 10 à 25 fois plus importante que celle mesurée dans l'apex racinaire de peuplier.

De plus, les analyses du métabolome réalisées dans les différentes étapes de formation de la mycorhize, ont révélé une quantité importante de composés de la conjugaison de l'auxine IAAsp (pour IAA-aspartate), qui proviendrait de la plante hôte. Une augmentation de l'oxAIA (pour acide 2-oxoindole-3-acétique), métabolite de dégradation de l'AIA, a été observée dans les racines de peuplier en contact indirect, ainsi que dans des racines colonisées par le champignon ([Figure 37](#)). Ces deux métabolites indiquent la présence d'une forte concentration en auxine (Ostin *et al.*, 1998 ; Novák *et al.*, 2012 ; Ljung, 2013). De plus, l'activation de l'expression du gène de réponse à l'auxine *PtaGH3-1*, codant une AIA-amino-synthase, est observée à toutes les étapes de formation de la mycorhize. Ces résultats suggèrent une augmentation de la quantité d'auxine dans les deux partenaires lors de l'interaction ([Figure 37](#)). L'analyse du métabolome dans la mycorhize mature révèle une forte quantité d'AIA (2 à 8 fois plus importante).

La mycorhize étant un organe composite, il n'a donc pas été possible de statuer de manière formelle sur l'origine des métabolites régulés dans la racine de peuplier ou dans les hyphes du champignon. De plus la localisation tissulaire de l'auxine dans la mycorhize n'est pas connue. En revanche, ces données suggèrent la présence d'un fort environnement auxinique dans la mycorhize ([Figure 37](#)).

2.3 Comment estimer la quantité et la localisation de l'auxine dans la mycorhize ?

Plusieurs éléments suggèrent que la quantité d'auxine pourrait être plus importante à l'apex racinaire de la mycorhize mature. Tout d'abord, l'environnement riche en auxine. De plus, les modifications anatomiques de l'apex racinaire traduiraient une accumulation de l'auxine dans cette zone ([Figure 35](#)). Même si la caractérisation de ce phénotype est encore à compléter par des données quantitatives, nos observations combinées avec les données de la littérature (Massicotte *et al.*, 1987 ; Horan *et al.*, 1988) montrent un arrondissement et un rétrécissement de la coiffe racinaire ([Figure 35](#)). Cette anatomie est similaire à celle des racines d'*A. thaliana* en présence d'inhibiteur du transport de l'auxine (NPA ; Ding & Friml, 2010), conduisant à une accumulation de l'auxine à l'apex racinaire (Ding & Friml, 2010).

Afin de localiser et quantifier l'auxine dans la racine en contact avec *L. bicolor*, il est donc important de développer d'autres outils (voir [encadré 3](#)). L'immunolocalisation de la molécule d'AIA peut être une stratégie envisageable (Benková *et al.*, 2003). De plus, des traceurs fluorescents de l'auxine sont en cours de développement et permettraient de suivre le flux de l'auxine des hyphes de *L. bicolor* à la plante hôte ou simplement de la répartition de l'auxine à l'apex des mycorhizes comparée aux RLs témoins (Hayashi, 2012b).

Afin d'estimer la localisation de la signalisation auxinique à l'apex racinaire, une autre stratégie serait de développer d'autres lignées rapportrices de la signalisation auxinique chez le peuplier, telles que des plantes transgéniques possédant la construction DII::Venus (Brunoud *et al.*, 2012). La fixation de l'auxine sur la protéine TIR1 induit directement une dégradation de la protéine chimérique contenant un domaine DII provenant des AuxIAA et ainsi de la protéine fluorescente Venus, ce qui rend cet outil plus sensible à la dynamique de la signalisation auxinique (Brunoud *et al.*, 2012).

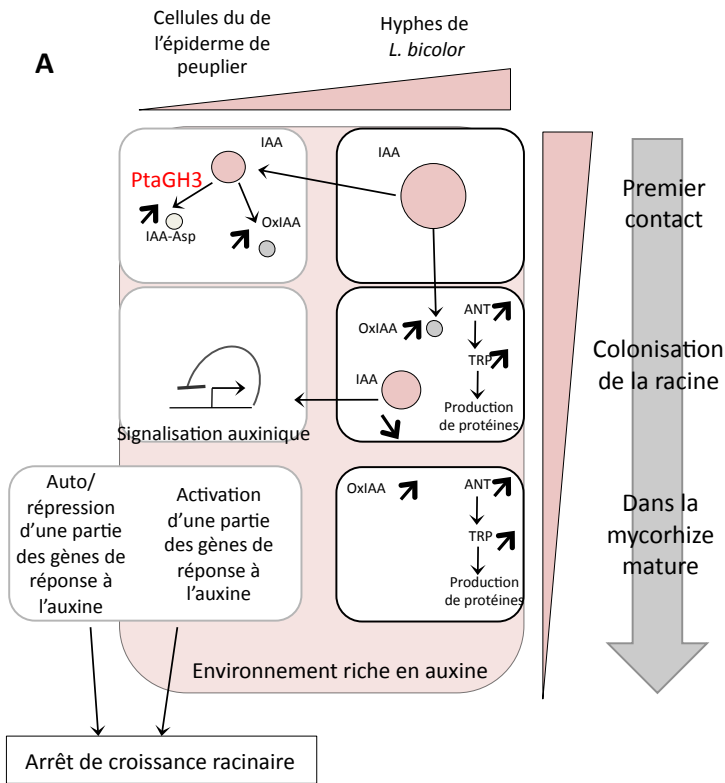
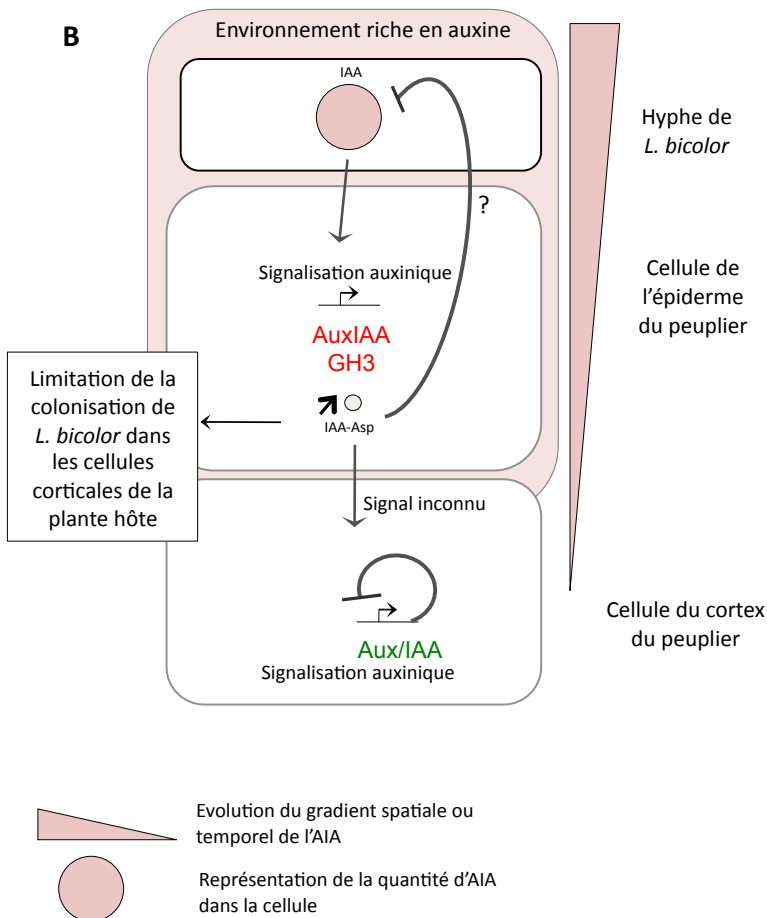


Figure 38 : Modèle hypothétique de la dynamique temporelle (A) ou spatiale (B) de la régulation de l'auxine dans la plante et dans *L. bicolor* pouvant modifier la signalisation auxinique



2.4 Comment expliquer la double réponse auxinique dans la mycorhize ?

Dans la mycorhize mature, des modifications majeures de l'expression d'acteurs de la signalisation auxinique ont été observées, concernant *PtaAux/IAA3.3*, *PtaAux/IAA3.4*, *PtaAux/IAA12.1*, *PtaAux/IAA15*, *PtaAux/IAA20.2*, *PtaAux/IAA28-1*, *PtaAux/IAA28-2* et *PtaARF2.4*, *PtaARF17.2*. Deux patrons de l'expression des gènes de signalisation et de réponse à l'auxine ont été identifiés. En effet une partie de l'expression de ces gènes est activée (*PtaGH3-1*, *PtaAuxIAAs*) alors qu'une autre partie est inhibée (*PtaAuxIAA*, *pDR5*). Plusieurs hypothèses ont déjà été suggérées dans la discussion du manuscrit ([Partie I ; Figure 6](#)).

Les différents patrons d'expression des gènes de la signalisation auxinique observés peuvent s'expliquer par une régulation spatiale et/ou temporelle de ces gènes ([Figure 38](#)). Des régulations génétiques peuvent être différentes au cours de la formation de la mycorhize, mais non identifiables dans notre étude, car l'expression globale des gènes a été réalisée sur un ensemble de racines, à différents stades de la formation de la mycorhize ([Figure 38A](#)). Associée à une quantité importante d'AIA dans la mycorhize, une dégradation de l'AIA dans les hyphes de *L. bicolor* en contact avec la plante est détectée ([Figure 38A](#)). Il est possible que la quantité d'AIA fournie par le champignon à la plante diminue au cours du temps ([Figure 38A](#)). Du côté de la plante, une application prolongée d'une quantité importante de l'auxine pourrait induire des voies « rétro-contrôles » de sa signalisation et donc à son inhibition. Au niveau spatial, l'environnement riche en auxine de la mycorhize peut se limiter aux cellules de l'épiderme de la plante ([Figure 38B](#)). La réponse à l'auxine serait donc différente dans l'épiderme et le cortex de la racine. Afin de valider cette hypothèse, l'expression spatiale des gènes pourrait être réalisée en utilisant une approche de microdissection laser couplée à une technique de PCR quantitative disponible dans notre laboratoire (Hacquard *et al.*, 2010 ; Hacquard *et al.*, 2013)

3 L'auxine fongique : une molécule signal ?

3.1 L'auxine fongique est-elle responsable de l'arrêt de croissance racinaire ?

Deux hypothèses peuvent être proposées concernant le rôle de l'auxine dans l'arrêt de croissance ; (1) La synthèse puis la sécrétion de l'auxine fongique vers la plante hôte serait en quantité suffisante pour induire l'arrêt de la croissance racinaire et (2) l'auxine fongique jouerait un rôle d'effecteur et induirait la modification de la signalisation de la plante et la répartition de l'auxine de l'auxine dans la racine.

- (1) L'accumulation de l'auxine fongique induit l'arrêt de croissance racinaire. En effet, la concentration d'AIA dans les hyphes de *L. bicolor* est de 50pg par mg de matière fraîche, ce qui est une concentration 20 fois plus importante que celle mesurée à l'apex racinaire de peuplier dans nos conditions de culture. Si on suppose que cette concentration d'AIA est sécrétée par *L. bicolor*, la racine est dans un environnement riche en auxine, lors du contact avec les hyphes du champignon ([Figure 38A](#)). Pour valider cette hypothèse, l'effet de l'application de l'auxine sur la croissance des racines de peuplier nous permettrait de connaître la sensibilité des racines de peuplier vis à vis de l'auxine.

- (2) Si l'environnement riche en auxine ne participe pas l'arrêt de croissance racinaire, il est possible que l'AIA, associé ou non à un autre signal, puisse modifier la signalisation auxinique de la plante hôte. Récemment, il a été décrit l'implication d'effecteurs fongiques dans la symbiose ECM (Plett *et al.*, 2011). Dans le cas des interactions pathogènes, ces petites protéines sont capables d'influencer les voies hormonales de la plante dont celles de l'acide jasmonique, l'acide salicylique (Pieterse *et al.*, 2009) et de l'auxine (Lee *et al.*, 2011; Evangelisti *et al.*, 2013). Récemment au laboratoire, des analyses d'interactions protéines-protéines ont identifié une interaction entre MISSP7 et PtaJAZ6, protéine impliquée dans la signalisation des jasmonates (F. Martin, communication personnelle). Il serait donc intéressant de rechercher des interactions entre des acteurs des voies de signalisation de l'auxine et d'autres petites protéines supposées sécrétées (MISSPs) par différentes approches (double hybride en levures, complémentation biomoléculaire de protéines fluorescentes en protoplastes de peuplier).

3.2 Rôle de l'auxine fongique dans la colonisation de la plante par le champignon

En plus des études sur les modifications du développement racinaire dans le contexte symbiotique, notre travail a permis d'avancer sur le rôle de l'auxine dans l'ontologie de la mycorhize.

Il est déjà reconnu que l'ajout d'auxine produite par la lignée de champignon ECM *Hebeloma cylindrosporum* surexprimant un gène de la biosynthèse d'auxine induit une augmentation de la taille du réseau de Hartig (Gay *et al.*, 1994 ; Tranvan *et al.*, 2000). Les comparaisons des métabolites associés à l'auxine dans la mycorhize, comparées aux hyphes contrôles, ainsi que dans les hyphes extramatriciels comparés aux hyphes contrôles ont suggéré une concentration plus faible d'AIA et une concentration plus élevée du métabolite de dégradation de l'AIA, oxAIA, dans les hyphes en contact avec la plante hôte. Ces résultats ont révélé une régulation de l'AIA dans les hyphes de *L. bicolor* lors de la formation de la mycorhize ainsi que dans la mycorhize mature ([Figure 38A](#)). Nous pouvons donc penser que *L. bicolor* « reconnaît » la plante hôte et régule sa quantité d'auxine active par sa dégradation afin de limiter sa colonisation et respecter sa relation symbiotique. Il n'est pas exclu que la plante envoie des signaux au champignon qui limiterait la quantité d'auxine active produite par celui-ci. La régulation de la quantité d'auxine active dans les champignons ECMs pourrait être un des critères qui différencie les organismes pathogènes des microorganismes symbiotiques.

Dans le couple *Picea abies-L. bicolor*, l'apport exogène d'un inhibiteur du transport polarisé de l'auxine (TIBA ; acide 2,3,5-triidobenzoïque), empêche la formation du réseau de Hartig entre les cellules de l'épiderme (Karabaghli *et al.*, 1998; Rincón *et al.*, 2003). PtaPIN9 étant localisée dans l'épiderme de la racine, nous avons donc testé la capacité des lignées transgéniques sur-exprimant ou sous-exprimant le gène *PtaPIN9* à former du réseau de Hartig. La formation du réseau de Hartig n'est pas affectée dans les racines des lignées transgéniques.

Le fait que le partenaire fongique produit de l'auxine et que le transport polarisé de l'auxine joue un rôle dans ce mécanisme suggèrent le détournement d'acteurs du transport polarisé de l'auxine dans les cellules en contact ([Figures 36F à 36H](#)). Nos transporteurs

candidats, PtaAUX2/LAX1, PtaPIN3, PtaPIN6 et PtaPIN8 sont orthologues respectivement à AtAUX1, AtPIN1 et AtPIN3 chez *A. thaliana* (Carraro *et al.*, 2012). De manière intéressante, ce sont des orthologues à des membres des familles AtAUX et AtPINs qui ont été observés dans les cellules des tissus en contact avec les microorganismes, lors de l'interaction symbiotique entre *Casuarina glauca* et *Frankia* (Péret *et al.*, 2007 ; Perrine-Walker *et al.*, 2010), ainsi que dans l'interaction pathogène entre le nématode *Heterodera glycines* et *A. thaliana* (Grunewald *et al.*, 2009a ; Lee *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant d'analyser la localisation des acteurs du transport polarisé de l'auxine, PtaAUX2/LAX1, PtaPIN3, PtaPIN6 et PtaPIN8, pour savoir si elle coïncide avec les cellules du réseau de Hartig. Un effecteur du nématode nommé Hg19C07 interagit physiquement avec AtLAX3 (Lee *et al.*, 2011). Ainsi il serait intéressant d'examiner les interactions protéines-protéines entre les petites protéines prédites sécrétées MISSP de *L. bicolor* et nos transporteurs candidats dans notre modèle d'étude.

4 Un réseau complexe de la régulation des voies hormonales dans la racine ectomycorhizée

L'analyse préliminaire des données transcriptomiques dans la mycorhize nous a permis de constater qu'avec les voies de réponse à l'auxine, un ensemble de voies hormonales semble être en partie induites et réprimées dans la mycorhize. De plus, il a été décrit dans la littérature que d'autres hormones, sont capables d'induire une inhibition de croissance racinaire tels que l'éthylène, les jasmonates et les cytokinines (Dello Iorio *et al.*, 2007 ; Swarup *et al.*, 2007 ; Wasternack, 2007). Ces hormones sont produites par certains champignons ECMs (Graham & Linderman, 1980 ; Rupp & Mudge, 1985 ; Miersch *et al.*, 1999 ; Splivallo *et al.*, 2009).

L'éthylène et les jasmonates sont aussi connus pour induire la biosynthèse de l'auxine, ce qui participerait à l'inhibition de l'élongation cellulaire (Stepanova *et al.*, 2005 ; Růžička *et al.*, 2007 ; Swarup *et al.*, 2007 ; Sun *et al.*, 2009). Dans notre modèle, nous avons suggéré une augmentation de la biosynthèse de l'AIA par la plante. De plus, il a été décrit que les jasmonates et l'éthylène sont capables d'induire l'expression des gènes *ASA1* et *TAA1*

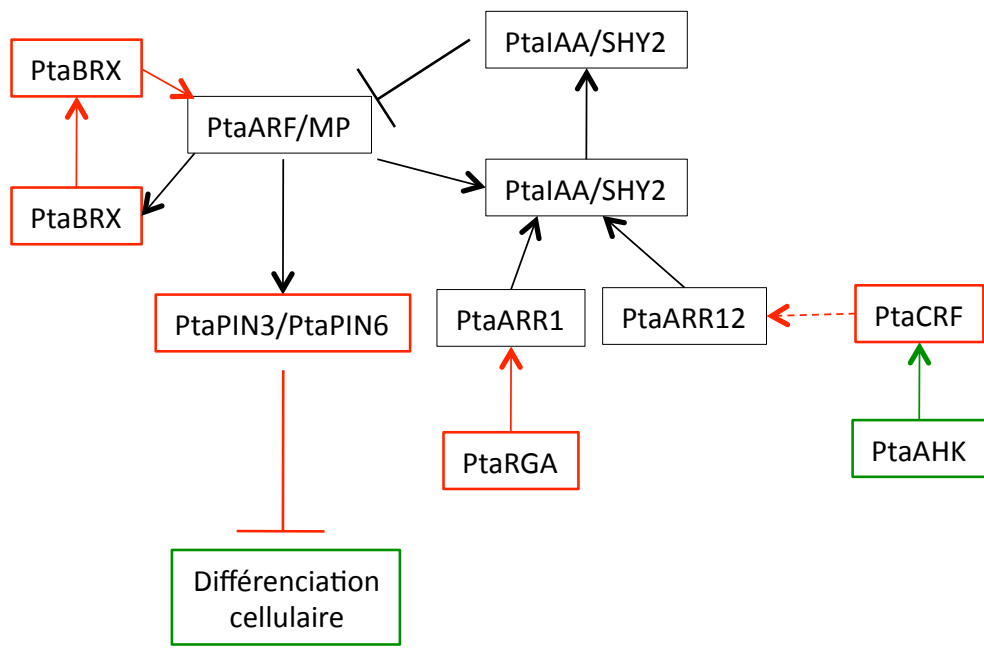


Figure 39 : Impact de la mycorhize dans le modèle de la régulation de la différenciation dans la zone de transition par les acteurs des différentes voies hormonales
 Les gènes encadrés en rouge sont régulés positivement dans la mycorhize et les gènes en vert négativement

(Stepanova *et al.*, 2005 ; Růžička *et al.*, 2007 ; Sun *et al.*, 2009). L'expression de des deux gènes étant régulée positivement dans les phases précoces de l'interaction avec *L. bicolor* ([Annexe 2](#)). De plus, TAA1 pour tryptophan aminotransferase 1 est l'enzyme qui catabolise la réaction du Trp en IpyA. A travers l'étude des données métabolomiques, nous avons suggéré que la biosynthèse de l'AIA dans la plante hôte en réponse à *L. bicolor* est due à une activation de la voie de l'IpyA. Ces deux phytohormones, jasmonate et éthylène, sont donc deux candidats de choix dans la compréhension des mécanismes d'arrêt de croissance en réponse au champignon.

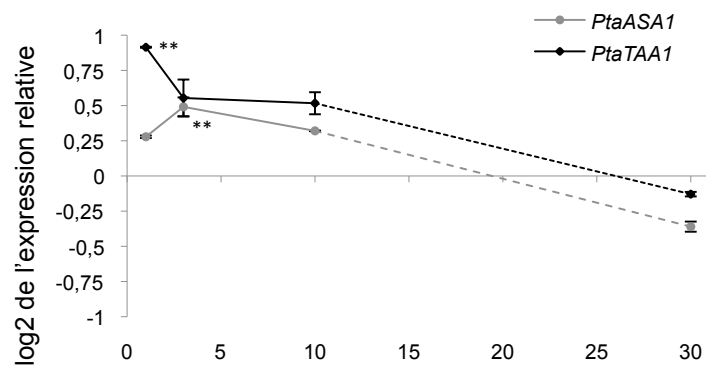
Dans la régulation de la taille de la zone méristématique, le dialogue croisé entre l'auxine, les cytokinines, les gibbérellines et les brassinostéroïdes régule le transporteur AtPIN3 chez *A. thaliana* et donc le gradient auxinique (Depuydt & Hardtke, 2011). De nombreux acteurs de ce dialogue, orthologues de ceux identifiés chez *A. thaliana*, sont régulés dans la mycorhize mature ([Figure 39](#)). Dans ce modèle, la régulation de l'expression de *PtaPIN3/PtaPIN6* (orthologue à *AtPIN3*) fait plutôt penser à une augmentation du gradient auxinique et donc à une inhibition de la différenciation cellulaire. Il serait donc intéressant de poursuivre des études dans cette direction.

L'analyse de la production des autres hormones par *L. bicolor* et leurs impacts sur la croissance de la racine de peuplier seraient des études à envisager. L'analyse des composés volatiles produits par *L. bicolor* en contact avec le peuplier sera publiée prochainement (Franck Ditengou, communication personnelle). Ces données nous permettront d'identifier les signaux symbiotiques ainsi que leurs concentrations.

5 Vers la compréhension des mécanismes moléculaires de la régulation de la croissance racinaire du peuplier

Notre travail a donc permis d'identifier de nombreux gènes régulés dans les « racines courtes », en arrêt de croissance. Malgré le fait qu'une majorité d'entre eux peuvent être impliquée dans d'autres processus moléculaires (modification de la structure des parois, échanges de nutriments, réponse au stress biotiques et abiotiques, etc...), certains gènes spécifiques de notre processus développemental d'intérêt pourrait être identifiés. Les données transcriptomiques produites au cours de cette thèse, croisées avec d'autres données transcriptomiques obtenues en réponse à des stress induisant un arrêt de

croissance de la racine du peuplier, permettraient d'identifier des acteurs impliqués dans la croissance. Des données transcriptomiques des racines de peuplier en réponse à un stress hydrique induisant une inhibition de croissance racinaire (Merret *et al.*, 2010) sont disponibles (Cohen *et al.*, 2010). De plus, nous avons vu que les deux hybrides de peuplier *P. tremula* x *P. alba* et *P. tremula* x *P. tremuloides* ne se développent pas à la même vitesse. Les données d'analyse globale de plus en plus conséquentes dans la communauté scientifique du peuplier, ainsi que le développement de bases de données de génomique de peuplier (Sjödin *et al.*, 2009) nous permettront d'identifier des acteurs de la croissance racinaire. L'établissement de réseaux de gènes conduira à l'identification des acteurs de la croissance racinaire.



Annexe 2 : Régulation de *PtaASA1* et *PtaTAA1* dans les racines de peuplier dans les phases précoces de l'interaction avec *L. bicolor*

Quantification en RT-PCR quantitative de *PtaASA1* et *PtaTAA1* après 1, 3 et 10 jours de contact indirect avec *L. bicolor*, et 30 jours de contact direct. Les étoiles représentent une différence significative entre les valeurs d'expression des racines en contact avec *L. bicolor* et des racines témoins (test de Student, $p\text{-value} < 0,01$)
Données de thèse Judith Felten 2009.

COMPLEMENT D'ETUDE

Analyse transcriptomique des racines de peuplier au cours de la formation de la mycorhize

1 INTRODUCTION

L'étude présentée dans ce chapitre est un complément de l'analyse transcriptomique réalisée dans la mycorhize et décrite dans la [Partie I](#).

Une cinétique de mycorhization, à 1, 2 et 3 semaines en co-culture des plants de peuplier *P. tremula* x *P. alba* (clone INRA 717-1-B4) en co-culture avec *L. bicolor* comparée aux conditions témoins (système *in vitro* sandwich, [Encadré 6](#)), a été réalisée afin d'identifier des gènes régulés dans les différentes étapes de la formation de la mycorhize. Après 1 et 2 semaines, le système racinaire entier des plantes a été échantillonné. En revanche, à 3 semaines, seules les mycorhizes, en comparaison avec les RLs témoins ont été récoltées ([Partie I](#)).

L'obtention des données de transcriptomique obtenues après 1, 2 et 3 semaines de culture des plantules de *P. tremula* x *P. alba*, en présence ou non de *L. bicolor*, ainsi que les méthodes d'analyse sont décrites dans le [Matériels et Méthodes de la Partie I](#). Ainsi, nous disposons des données transcriptomiques nommées « racines témoins » correspondant au niveau d'expression des gènes dans les racines de peupliers cultivées pendant 1, 2 et 3 semaines en absence de *L. bicolor*. Parallèlement, nous disposons des données transcriptomiques des racines de peuplier cultivées pendant 1, 2 et 3 semaines en co-culture avec *L. bicolor*, qui seront nommées « racines en co-culture ». A partir de ces données, nous avons réalisé le rapport du niveau des transcrits « racines en contact »/« racines témoins » pour chacun des gènes et ceci aux 3 temps de l'interaction. Nous avons considéré les gènes différentiellement exprimés si le rapport d'expression est supérieur ou inférieur à 2 et si le test ANOVA corrigé de Benjamini et Hochberg présente une *p-value* < 0,05 (voir [Matériels et Méthodes ; Partie I](#)).

Les analyses réalisées dans la partie I se sont focalisées principalement sur l'identification des gènes de réponse à l'auxine ainsi que sur les acteurs de la signalisation, des voies du métabolisme et du transport de l'auxine. Les données transcriptomiques obtenues après 1

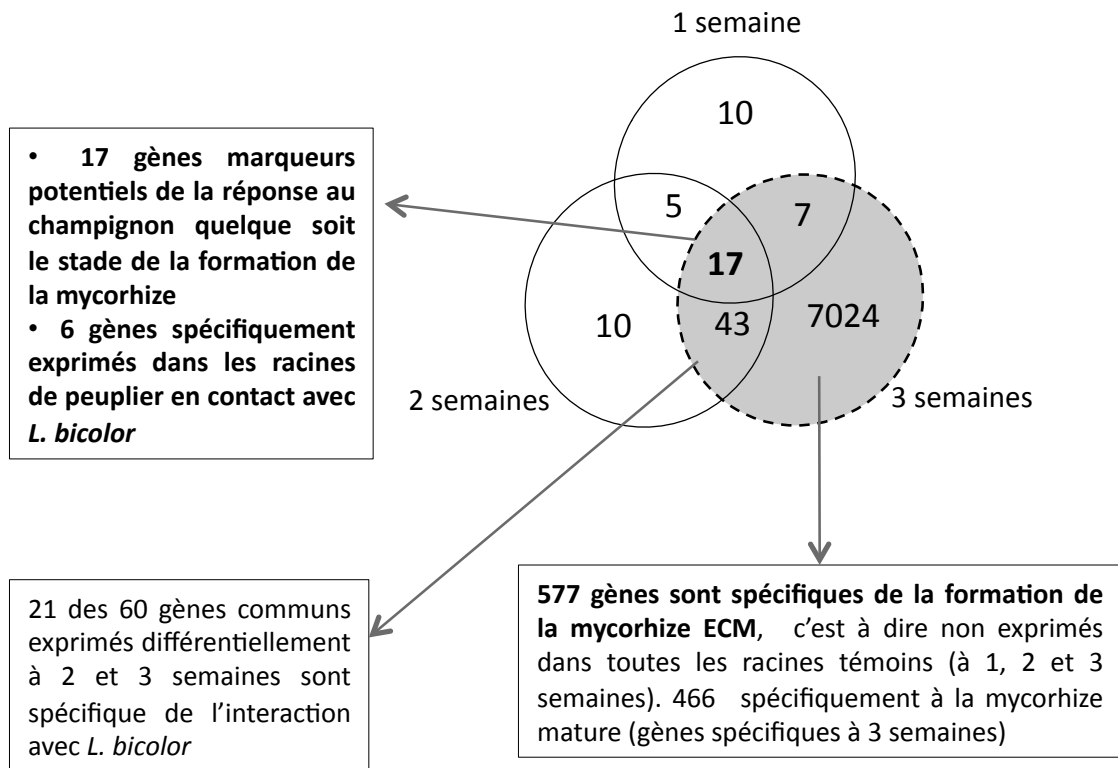


Figure 40 : L'analyse globale des gènes différemment exprimés dans la cinétique de mycorhization révèle des acteurs de la réponse au champignon et de la mycorhize mature

Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes régulés de manière différentielle entre les racines conditions contrôles et les racines en contact avec *L. bicolor* après 1, 2 et 3 semaines de co-culture. Les gènes sont considérés régulés s'ils suivent les critères suivants : rapport $>$ ou $<$ 2, test ANOVA corrigé de Benjamini et Hochberg possédant une *p-value* $<$ 0,05).

et 2 semaines n'ont pas permis d'identifier des gènes impliqués dans les voies de l'auxine régulés dans les différentes étapes de la formation de la mycorhize.

Néanmoins, cette étude complémentaire à travers l'analyse des gènes régulés à tous les stades de la formation de la mycorhize nous a permis d'identifier des gènes marqueurs putatifs de l'interaction ECM peuplier-*L. bicolor*. L'identification des gènes marqueurs est essentielle dans la compréhension des signaux symbiotiques. L'analyse de la dynamique d'expression de ces gènes pourrait permettre d'identifier des molécules signal de l'interaction ECM. Particulièrement dans le cas de la symbiose ECM où peu de données disponibles concernant les signaux symbiotiques précoces sont connues (Martin & Nehls, 2009). De plus, une analyse de l'étude sans *a priori* des gènes régulés dans la mycorhize à 2 et 3 semaines de co-culture à travers l'analyse de l'ontologie des gènes (GO) et des voies de réponse des différentes hormones est en cours de réalisation.

2 RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Analyse des gènes différentiellement exprimés lors de la formation de la mycorhize

Après 1 semaine de co-culture avec *L. bicolor*, l'analyse transcriptomique obtenue révèle une expression différentielle significative pour 39 gènes ([Figure 40](#) et [Tableau S4](#)). Parmi ces 39 gènes, 34 de ces gènes présentent une accumulation de transcrits plus importante en co-culture avec *L. bicolor*, comparée au conditions témoins. De plus, dans cette liste, 14 gènes ont une expression spécifique en réponse à *L. bicolor* (c'est à dire non exprimé dans les racines témoins ; [Tableau S4](#)). Après 2 semaines de co-culture, les niveaux des transcrits de 75 gènes sont significativement différents entre les racines en co-culture et les racines témoins ([Figure 40](#) et [Tableau S5](#)). Pour 43 d'entre eux, l'expression est induite uniquement lors de l'interaction avec *L. bicolor* ([Tableau S5](#)). Après 3 semaines, 7091 gènes sont différentiellement exprimés ([Figure 40](#)). Le faible nombre de gènes différentiellement exprimés après 1 ou 2 semaines de co-culture pourrait être s'expliquer par l'existence d'une variabilité dans la cinétique de colonisation du champignon au sein des systèmes racinaires à

Gènes différenciellement exprimés après 2 semaines de co-culture avec <i>L. bicolor</i>		
Nom du GO	Ontologie du gène (GO)	Nombre de gènes régulés
GO:0030414	peptidase inhibitor activity	8
GO:0004866	endopeptidase inhibitor activity	8
GO:0045735	nutrient reservoir activity	7
GO:0004857	enzyme inhibitor activity	9
GO:0050660	FAD binding	8
GO:0004867	serine-type endopeptidase inhibitor activity	5
GO:0009611	response to wounding	5
GO:0009605	response to external stimulus	5
GO:0030234	enzyme regulator activity	9
GO:0050662	coenzyme binding	8
GO:0016491	oxidoreductase activity	15
GO:0048037	cofactor binding	8
GO:0006950	response to stress	8
GO:0050896	response to stimulus	8
GO:0004497	monooxygenase activity	5
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	8
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	8
GO:0006351	transcription, DNA-dependent	8
GO:0032774	RNA biosynthetic process	8
GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	5
GO:0003824	catalytic activity	30
GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	5
GO:0020037	heme binding	5
GO:0046906	tetrapyrrole binding	5
GO:0005506	iron ion binding	5
GO:0016070	RNA metabolic process	8

Gènes différenciellement régulés après 3 semaines de co-culture avec <i>L. bicolor</i>		
Nom du GO	Description du GO	Nombre de gènes régulés
GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	143
GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	133
GO:0046872	metal ion binding	472
GO:0043167	ion binding	472
GO:0043169	cation binding	472
GO:0016491	oxidoreductase activity	382
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	198
GO:0005507	copper ion binding	63
GO:0005506	iron ion binding	143
GO:0046914	transition metal ion binding	395
GO:0020037	heme binding	129
GO:0046906	tetrapyrrole binding	129
GO:0005976	polysaccharide metabolic process	53
GO:0016684	oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	50
GO:0004601	peroxidase activity	50
GO:0004568	chitinase activity	16
GO:0042221	response to chemical stimulus	93
GO:0000272	polysaccharide catabolic process	21
GO:0015979	photosynthesis	33
GO:0006026	aminoglycan catabolic process	16
GO:0006030	chitin metabolic process	16
GO:0006032	chitin catabolic process	16
GO:0008061	chitin binding	16
GO:0030247	polysaccharide binding	16
GO:0001871	pattern binding	16
GO:0000786	nucleosome	15
GO:0032993	protein-DNA complex	15
GO:0009521	photosystem	23
GO:0006022	aminoglycan metabolic process	16
GO:0009579	thylakoid	25
GO:0006979	response to oxidative stress	46
GO:0003777	microtubule motor activity	37
GO:0003774	motor activity	41
GO:0003700	transcription factor activity	171
GO:0034357	photosynthetic membrane	23
GO:0008152	metabolic process	1567
GO:0055114	oxidation reduction	179
GO:0007018	microtubule-based movement	33
GO:0003824	catalytic activity	1522
GO:0007017	microtubule-based process	37
GO:0034728	nucleosome organization	17
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	17
GO:0031497	chromatin assembly	17
GO:0006334	nucleosome assembly	17
GO:0006323	DNA packaging	17
GO:0016209	antioxidant activity	51

Tableau 2 : Descriptions des gènes différenciellement exprimés dans les racines de peuplier à 2 et 3 semaines de co-culture avec *L. bicolor*

L'analyse des GOs

(pour Gene Ontologie ; <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/> ; Du *et al.* 2010) a été réalisée. A 1 semaine de co-culture avec *L. bicolor*, du au petit échantillon de gènes régulés on ne peut identifier d'enrichissement en GO.


 GO identifié enrichi dans la liste de gènes différenciellement exprimés à 2 et 3 semaine de co-culture avec *L. bicolor*

Tableau 2 suite

Gènes différentiellement exprimés après 3 semaines de co-culture avec <i>L. bicolor</i> suite		
Nom du GO	GO	Nombre de gènes régulés
GO:0009523	photosystem II	16
GO:0004857	enzyme inhibitor activity	56
GO:0003676	nucleic acid binding	562
GO:0004867	serine-type endopeptidase inhibitor activity	15
GO:0030234	enzyme regulator activity	79
GO:0045449	regulation of transcription	309
GO:0019219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	309
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	309
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	34
GO:0030528	transcription regulator activity	233
GO:0004497	monooxygenase activity	87
GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	309
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	309
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	309
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	312
GO:0010468	regulation of gene expression	309
GO:0044436	thylakoid part	15
GO:0050896	response to stimulus	170
GO:0006950	response to stress	140
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	196
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	196
GO:0009055	electron carrier activity	139
GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	48
GO:0009611	response to wounding	13
GO:0043565	sequence-specific DNA binding	121
GO:0005509	calcium ion binding	20
GO:0016787	hydrolase activity	487
GO:0006350	transcription	324
GO:0006351	transcription, DNA-dependent	203
GO:0009415	response to water	26
GO:0009605	response to external stimulus	13
GO:0032774	RNA biosynthetic process	203
GO:0009654	oxygen evolving complex	11
GO:0009628	response to abiotic stimulus	35
GO:0006073	cellular glucan metabolic process	31
GO:0044042	glucan metabolic process	31
GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	22
GO:0003677	DNA binding	341
GO:0044264	cellular polysaccharide metabolic process	32
GO:0044036	cell wall macromolecule metabolic process	22
GO:0071103	DNA conformation change	17
GO:0005375	copper ion transmembrane transporter activity	6
GO:0019898	extrinsic to membrane	9
GO:0016160	amylase activity	10
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	311
GO:0009269	response to desiccation	23
GO:0009414	response to water deprivation	23
GO:0005618	cell wall	37
GO:0000785	chromatin	15
GO:0019222	regulation of metabolic process	314
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	311
GO:0030001	metal ion transport	50
GO:0004506	squalene monooxygenase activity	7
GO:0019104	DNA N-glycosylase activity	8
GO:0016760	cellulose synthase (UDP-forming) activity	15
GO:0016759	cellulose synthase activity	15
GO:0008725	DNA-3-methyladenine glycosylase I activity	7
GO:0004556	alpha-amylase activity	5
GO:0015018	galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase activity	5
GO:0015020	glucuronosyltransferase activity	5
GO:0016070	RNA metabolic process	240
GO:0016758	transferase activity, transferring hexosyl groups	60
GO:0004091	carboxylesterase activity	49
GO:0030312	external encapsulating structure	41
GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	17
GO:0003905	alkylbase DNA N-glycosylase activity	7
GO:0006825	copper ion transport	6
GO:0030599	pectinesterase activity	36
GO:0016757	transferase activity, transferring glycosyl groups	75
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	11
GO:0005085	guanyl-nucleotide exchange factor activity	11
GO:0005576	extracellular region	22
GO:0004866	endopeptidase inhibitor activity	21
GO:0030414	peptidase inhibitor activity	21
GO:0008194	UDP-glycosyltransferase activity	29
GO:0016799	hydrolase activity, hydrolyzing N-glycosyl compounds	8
GO:0005089	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	8
GO:0005088	Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity	8
GO:0008234	cysteine-type peptidase activity	23
GO:0048046	apoplast	14

1 et 2 semaines. En effet, nous avons observé différents stades de formation de la mycorhize, après 1 et 2 semaines de co-culture ([Partie II](#)). A ces temps de co-culture, le système racinaire entier des plantes a été récolté, il serait donc plus judicieux à l'avenir de comparer les stades morphologiques afin d'identifier des gènes régulés, spécifiques de chacun des stades.

L'analyse des GOs (pour Gene Ontologie ; <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/> ; Du *et al.*, 2010) a été réalisée afin d'évaluer les processus cellulaires pouvant être impliqués dans la formation de la mycorhize. A 1 semaine de co-culture avec *L. bicolor*, nous n'avons pas identifié d'enrichissement en GO, du au faible nombre de gènes régulés. Cependant, les gènes correspondent, entre autres, à des activités inhibitrices d'enzymes, de réponse à la blessure et aux *stimuli* extérieurs. Après deux et trois semaines, un enrichissement de ces GOs a aussi été observé ([Tableau 2](#)). De plus, la majorité des processus identifiés dans les gènes régulés à 2 semaines de co-culture sont identifiés pour les gènes régulés à 3 semaines de co-culture ([Tableau 2](#) ; lignes grises). On peut noter la présence de GO des voies de la transcription (GO:0051252 ; GO:0006355 ; GO:0032774 ; GO:0004553) suggérant un fort remodelage de l'expression des gènes lors de la formation de la mycorhize. A 3 semaines, correspondant au stade de mycorhize mature, des GOs correspondant à des voies du métabolisme de l'azote, des polysaccharides et des macro-molécules, sont enrichis ([Tableau 2](#)). Ces analyses sont en accord avec la fonction symbiotique de la mycorhize.

2.2 Identification de gènes marqueurs de la symbiose ECM peuplier-*L. bicolor*

Parmi les gènes différentiellement exprimés après 1, 2 et 3 semaines de co-culture avec *L. bicolor*, 17 gènes sont communs à tous les stades ([Figure 40](#)). Parmi ces 17 gènes ([Tableau 3](#)), 3 gènes codent des protéines impliquées dans les voies métaboliques associées à l'auxine ([Tableau 3](#) ; gènes en gras). Le niveau des transcrits de *PtaGH3-1* s'accumule dans les racines après 1, 2 et 3 semaines de co-culture. De plus, la cinétique de transcriptomique à 1 et 2 semaines confirme donc la réponse de la plante à *L. bicolor* par une augmentation de l'expression d'une enzyme la conjugaison de l'AIA, comme il a été observé dans les données métabolomiques à 1 semaine en contact direct et indirect ([Partie I](#) ; [Figure 5](#)). *PtaGH3-1* est

Tableau 3 : L'analyse globale des gènes différentiellement exprimés dans la cinétique de la formation de la mycorhize révèle des gènes marqueurs potentiels de la symbiose ECM

Nom du gène ^a	Gene ID ^b	Gene ID ^c	<i>A. thaliana</i> gene ID ^d	<i>A. thaliana</i> gene name	Expression dans les racines témoins à 1 semaine	Expression dans les racines témoins à 2 semaines	Expression dans les racines témoins à 3 semaines
<i>Pta</i> FS1.45 <i>CYP81S8</i>	POPTR_0010s20860.1	Potri.010G201000.1	AT1G17010.1		nd	nd	368
	POPTR_0019s10730.1	Potri.019G078600.1	AT5G36110.1	AtCYP716A1	552	495	566
	POPTR_0005s18730.1	Potri.005G143900.1	AT4G37370.1	CYP81D8	845	330	476
	POPTR_0006s22880.1*	Potri.006G212200.1	AT2G38870.1		nd	nd	nd
	POPTR_0006s22860.1*	Potri.006G212000.1	AT2G38870.1		361	nd	nd
	POPTR_0002s07360.1*	Potri.002G072800.1	AT1G21460.1	AtSWEET1	nd	nd	nd
	POPTR_0002s07350.1*	Potri.002G072600.1	AT1G21460.1	AtSWEET1	nd	nd	nd
	POPTR_0002s07370.1*	Potri.002G072700.1	AT1G21460.1	AtSWEET1	nd	nd	nd
	POPTR_0013s04910.1*	Pas de blast dans la version V9.0	AT5G39110.1		4343	2424	5172
	POPTR_0013s04920.1*	Potri.013G052100.1	AT5G39110.1		2131	981	2538
<i>Pta</i> GH3-1	POPTR_0455s00200.1	Potri.010G153700.1	AT3G53480.1	AtPDR9/ ABCG37	nd	nd	nd
	POPTR_0010s16340.1	Potri.010G153600.1	AT3G53480.1	AtPDR9/ ABCG37	316	nd	nd
	POPTR_0013s04880.1*	Potri.013G052300.1	AT3G05950.1		2798	1452	3377
	POPTR_0013s04870.1*	Potri.T151800.1	AT5G39110.1		2934	1448	3192
	POPTR_0007s10350.1	Potri.007G050300.1	AT2G14960.1	AtGH3-1	3498	2907	3969
	POPTR_0011s04090.1	Pas de blast dans la version V9.0	Pas de blast dans arabidopsis		870	522	3097
	POPTR_0014s02640.1	Potri.014G026600.1	AT5G67360.1	ARA12	nd	nd	nd

^aNom du gène annoté dans la version 9.0 du génome du peuplier disponible sur Phytozome; ^bGene modèle de la version 7.0; ^cGene modèle de la version V9.0, ^d *A. thaliana* gene ID orthologue to *Populus* gene ID (Phytozome annotation). nd: non détecté (random<300). Les étoiles représentent une possibilité d'hybridation croisées des amorces sur la puce

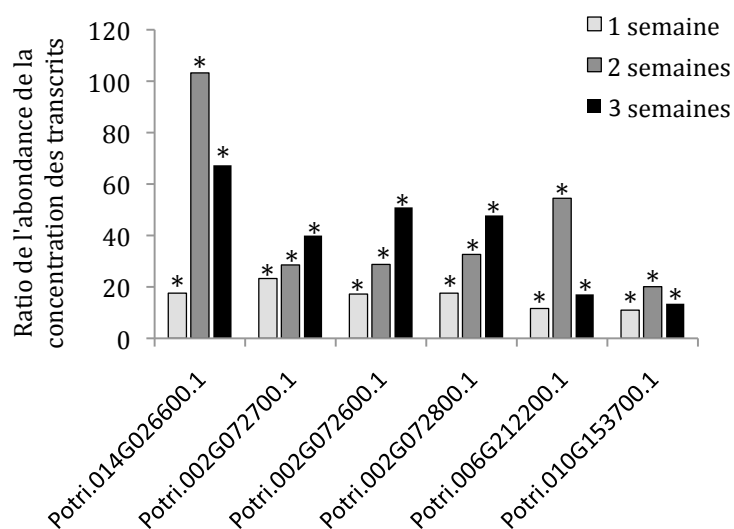


Figure 41 : L'analyse globale des gènes régulés dans la cinétique de la formation de la mycorhize révèle des gènes dont l'activité est spécifique de l'interaction avec *L. bicolor*

Ratio de l'absorbance des transcrits quantifié pour les 6 gènes régulés à 1, 2 et 3 semaines de la formation de la mycorhize, dont l'expression dans la racine du peuplier est spécifique à l'interaction avec *L. bicolor*, (l'expression des racines contrôles à 1, 2 et 3 semaines possède une fluorescence < 300)

Les gènes sont considérés régulés si ils suivent les critères suivants : ratio > 2 et que le test ANOVA corrigé de Benjamini et Hochberg (*p-value* < 0,05).

un gène de réponse à l'accumulation d'auxine chez le peuplier ([Partie I](#) ; [Figure S1](#)). **Ce qui suggère une réponse à l'auxine dans la plante quelque soit le stade de la mycorhize.**

Potri.010G153600.1 et *Potri.010G153700.1* présentent une très forte homologie avec *AtPDR9/ABCG37* d'*A. thaliana*. Il a été décrit que *AtPDR9/ABCG37* code un transporteur d'IBA (Ruzicka *et al.*, 2010). De par leurs localisations polarisées à la membrane plasmique dans l'épiderme et la coiffe latérale de la racine vers l'extérieur, il a été suggéré que ces transporteurs joueraient un rôle dans le transport de l'IBA vers la rhizosphère (Ruzicka *et al.*, 2010). Récemment, il a été montré que *AtPDR9/ABCG37* intervient dans l'homéostasie du Fer, en transportant un composé phénolique, la scopoluntine à l'extérieur de la racine (Fourcroy *et al.* 2013). La modification de l'expression de *PtaABGG37* a été confirmée dans la mycorhize mature ([Partie I](#) ; [FigureS2](#)). ***PtaABCG37* serait un bon candidat dans les échanges de signaux entre les racines de peuplier et *L. bicolor*.**

De façon intéressante, le niveau d'expression de *PtaGH3-1* et *PtaABCG37* est aussi augmenté après 3 jours de contact indirect avec *L. bicolor* (Felten *et al.*, 2009). Ainsi *PtaGH3-1* et *PtaABCG37* peuvent être considérés comme des marqueurs précoces de l'interaction peuplier-*L. bicolor*.

Parmi les 17 gènes différentiellement exprimés aux 3 stades de la colonisation ([Tableau 3](#)), 6 gènes possèdent un niveau de fluorescence < 300, indiquant une absence d'expression de ces gènes dans les racines de peupliers témoins. Leurs expressions sont donc induites spécifiquement dès les premières étapes de l'interaction, puis est maintenue au cours de la formation du réseau de Hartig ([Figure 41](#)). Il s'agit de *Potri.014G026600.1*, *Potri.002G072800.1*, *Potri.002G072600.1*, *Potri.002G072700.1*, *Potri.006G212200.1* et *Potri.010G153700.1*.

Parmi ces gènes, *Potri.014G026600.1*, que j'ai nommé *Pta12*, présente une très forte homologie avec *ARA12* d'*A. thaliana*. *ARA12* code une subtilisine et son expression est modulée en réponse aux jasmonates et aux métaux lourds (Gollack *et al.*, 2003). De façon intéressante, il a été montré dans l'interaction des plantes actinorhiziennes avec *Frankia*, que *Ag12* (d'*Alnus glutinosa*) et *Cg12* (de *Casuarina glauca*) sont des gènes marqueurs de la symbiose actinorhizienne (Ribeiro *et al.*, 1995 ; Laplaze *et al.*, 2000 ; Svistoonoff *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données nous amène à suggérer *Pta12* comme gène-marqueur de la symbiose ECM entre le peuplier et *L. bicolor*. Néanmoins, l'expression de *Cg12* n'est pas

induite en réponse au champignon ECM *Pisolithus alba* dans les racines de *Casuarina glauca* (Svistoonoff *et al.*, 2003).

L'expression de *Potri.002G072800.1*, *Potri.002G072600.1* et *Potri.002G072700.1* est aussi induite spécifiquement dans les racines de peuplier en contact avec *L. bicolor* ([Tableau 3](#) et [Figure 41](#)). Ces 3 gènes sont des orthologues de *AtSWEET1* chez *A. thaliana* et *MtN3* chez *Medicago truncatula*. *MtN3* est considéré comme un gène marqueur de la formation du nodule dans les racines de *Medicago truncatula* (Gamas *et al.*, 1996). De plus, certains orthologues de ces gènes dans d'autres plantes hôtes sont différentiellement exprimés dans d'autres interactions ECMs (A. Kohler, communication personnelle). Ces gènes seraient de bons candidats à étudier comme gènes marqueurs de la réponse à *L. bicolor* ainsi qu'en réponse à d'autres champignons ECMs. De plus, la fonction des AtSWEET comme transporteurs de saccharose (Baker *et al.*, 2012) en fait des candidats de choix dans notre contexte symbiotique.

Parallèlement, l'expression de *Potri.006G212200.1* dans les racines de peuplier est aussi spécifique à l'interaction avec *L. bicolor* ([Tableau 3](#) et [Figure 42](#)). Ce gène code pour une protéine orthologue à un peptide prédit de la sous famille des PR6 (pour Pathogenic-Related 6 ; Chassot *et al.*, 2007). L'expression de ce gène n'est pas induite après 3 jours de contact indirect avec *L. bicolor* (Felten *et al.*, 2009), mais il est différentiellement exprimé dans les mycorhizes matures peuplier-*L. bicolor*, obtenues en serres (A. Kohler, communication personnelle). Bien que ces données doivent être confirmées, nous suggérons que l'expression de ce gène est modulée lors d'un contact direct avec les hyphes fongiques.

Ainsi, à partir de l'analyse des données transcriptomiques, nous avons débuté l'identification de gènes marqueurs de la réponse du peuplier au contact direct ou indirect avec *L. bicolor*. Il serait maintenant nécessaire de confirmer leur cinétique d'expression en réponse à *L. bicolor* et aussi d'examiner la localisation de leur expression dans les racines en réponse à *L. bicolor*. De plus, les expressions des orthologues de ces gènes dans d'autres modèles d'études ECMs seraient intéressantes à tester afin d'identifier des marqueurs communs des interactions ECMs.

	Mycorhize mature	IAA	Mja	ACC	CK	ABA	GA	BR
		791	1518	540	498	2934	125	655
Mycorhize mature		315	623	208	170	1012	35	267
IAA	0		138	72	39	148	16	62
Mja	0			80	64	310	16	96
ACC	0				32	89	11	46
CK	0					75	4	23
ABA	0						23	112
GA	0,4							10
BR	0							

Tableau 4 : Analyses préliminaires des interactions hormonales dans la mycorhize mature

La deuxième colonne (gris claire) indique les valeurs de *p-value* pour le test de corrélation effectué entre les gènes régulés dans la mycorhize mature et les gènes de réponse aux différentes hormones: Métyljasmonates (Mja), à l'ACC (pour 1-Amino-Cyclopropane-Carboxylate ; intermédiaire direct de l'éthylène), aux cytokinines (CK), à l'acide abscissique (ABA), aux gibbérellines (GA) et aux brassinostéroïdes (BR ; Nemhauser *et al.*, 2006). L'effectif des gènes de réponse aux hormones est indiqué dans la deuxième ligne. La matrice en gris représente le nombre de gènes de réponse en commun aux différentes hormones étudiées deux à deux, dans les gènes régulés dans la mycorhize mature.

2.3 Gènes dont l'expression est uniquement induite dans la mycorhize mature

Dans les 7091 gènes différentiellement exprimés dans les mycorhizes ([Partie I](#)), l'expression de 577 gènes est uniquement induite au cours de l'interaction avec *L. bicolor*, c'est-à-dire non exprimés dans les racines témoins. Parmi ces gènes, 466 s'expriment exclusivement dans la mycorhize mature à 3 semaines. Parmi ces gènes, un nombre important de gènes (17 gènes) codent pour des facteurs de transcription de type AP2/ERF (pour APetala 2/Ethylene-Responsive element binding Factor) dont *PtaERF1*, *PtaERF24*, *PtaERF21*, *PtaERF16*, *PtaABR1* (pour ABA Response Factor 1) et *PtaCRF2* (pour Cytokinine Response Factor 2), de la famille des facteurs de transcription à domaine GRAS (GAI, RGA, SCR) tels qu'un membre de la sous famille des SCR (pour SCRarecrow) et des MADS box dont *PtaAGL94* (pour Agamous Like 94). Des gènes codant des transporteurs de nitrate tels que PtaNRT1:2 et une nitrilase (*PtaNIT4*), présente aussi une forte expression spécifique à la mycorhize mature, en accord avec sa fonction symbiotique.

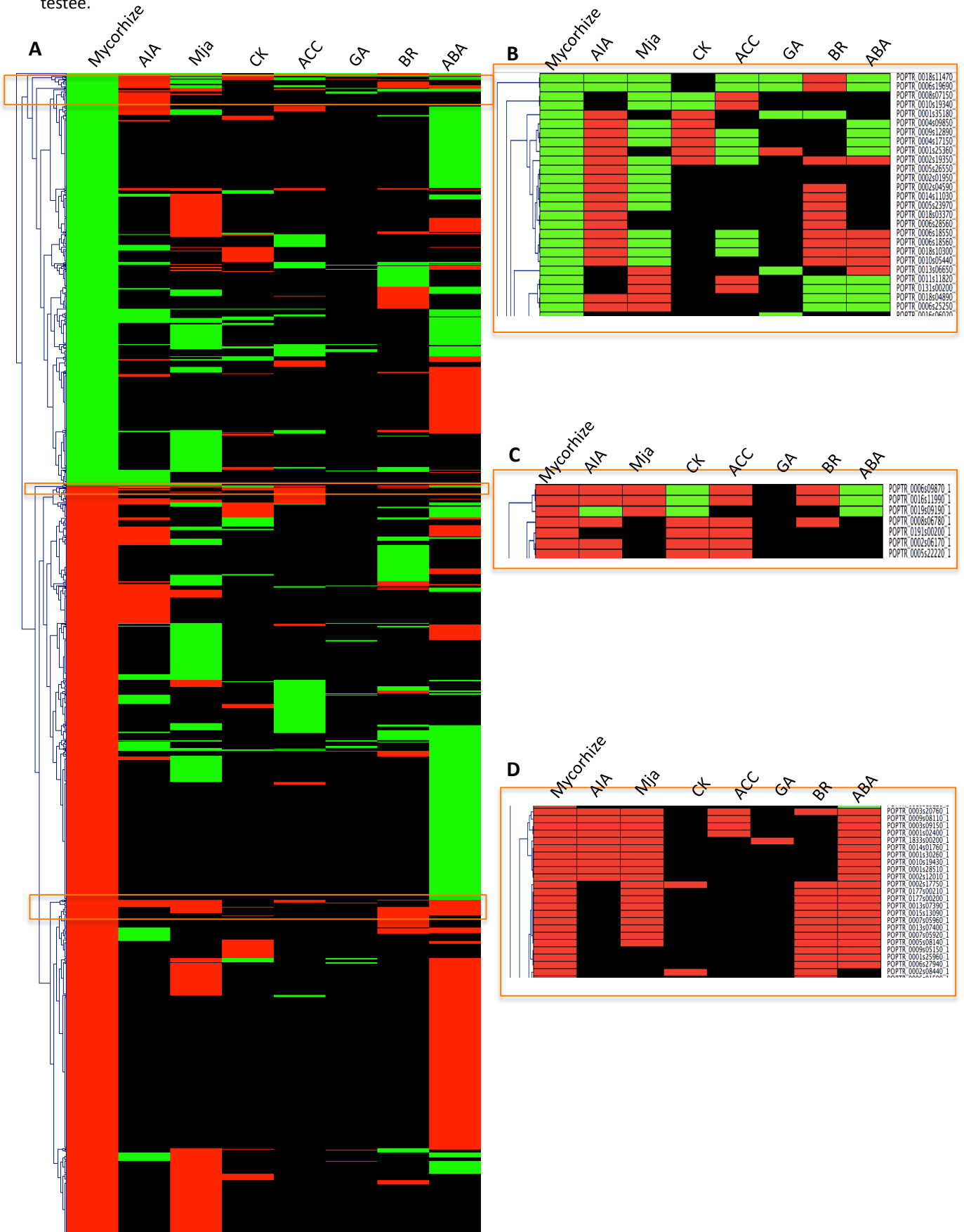
Parmi ces gènes candidats, nous avons donc identifié un nombre important de facteurs de transcription qui sont connus dans *A. thaliana* pour être impliqués dans la réponse à différentes voies hormonales tels que l'éthylène, les gibbérellines (GA) et l'acide abscisique (ABA).

2.4 L'analyse des données transcriptomiques suggère des interactions hormonales dans la mycorhize mature

Parmi les gènes dont l'expression est différentielle dans la mycorhize mature, nous avons analysé l'enrichissement des gènes de réponse à l'auxine (AIA), au Méthyljasmonates (Mja), à l'ACC (pour 1-Amino-Cyclopropane-Carboxylate ; intermédiaire direct de la biosynthèse de l'éthylène), aux cytokinines (CK), à l'acide abscisique (ABA), aux gibbérellines (GA) et au brassinostéroïdes (BR) en utilisant un test de randomisation (voir [Matériels et Méthodes Partie I](#)). Comme décrit précédemment dans ce manuscrit, pour ce test nous avons utilisé les listes de gènes de réponse aux différentes hormones disponibles

Figure 42 : Regroupement des gènes régulés dans la mycorhize et en réponse aux différentes hormones

(A) Analyse en Average linkage clustering (GENESIS ; Sturn *et al.*, 2002) des gènes différentiellement régulés dans la mycorhize mature dont l'orthologue dans *A. thaliana* est identifié comme un gène de réponse à au moins une hormone. B à D : Zone d'intérêt de ce regroupement. Auxine (AIA), Métyljasmonates (Mja), l'ACC (pour 1-Amino-Cyclopropane-Carboxylate ; intermédiaire direct de la biosynthèse de l'éthylène), aux cytokinines (CK), à l'acide abscissique (ABA), aux gibbérellines (GA) et au bassinostéroïdes (BR ; Nemhauser *et al.*, 2006). La couleur rouge représente une accumulation plus importante des transcrits et la couleur verte une accumulation moins importante des transcrits dans la condition testée.



dans le modèle *A. thaliana* (Nemhauser *et al.*, 2006). Un enrichissement des gènes de réponse de l'ensemble des hormones étudiées a été identifié dans la mycorhize mature (p -value=0), excepté pour les GA (p -value=0,4 ; [Tableau 4](#)). Les résultats obtenus pour les GA s'expliquent par le faible nombre de gènes de réponse identifiés dans l'étude de Nemhauser et ses collaborateurs (125 gènes). Ces données suggèrent que la mise en place et le fonctionnement de l'ECM affectent profondément l'homéostasie, non seulement de l'auxine, mais de la majorité des hormones. Cette étude *in silico* de l'analyse des gènes de réponse aux différentes hormones suggère un réseau complexe des voies hormonales de la plante dans la racine ECM. Des données précédentes avaient été obtenues dans ce sens, dans d'autres modèles d'interaction (Duplessis *et al.*, 2005 ; Le Quéré *et al.*, 2005 ; Tarkka *et al.*, 2013).

La [figure 42](#) représente l'analyse en Average linkage clustering (GENESIS ; Sturn *et al.*, 2002) qui regroupe différences réponses des hormones, selon leurs expressions dans la mycorhize mature. Etant donné le faible nombre de gènes régulés en réponse à toutes les hormones, il est difficile de regrouper les gènes ([Figure 42A](#)). Des analyses plus précises pour trouver des groupes de gènes candidats de ces régulations sont en cours ([Figures 42B à 42D](#)). Ces analyses pourraient nous permettre d'identifier des gènes toujours régulés en réponse à un stress biotique et abiotique dans la racine de peuplier ([Figure 42D](#)). Mais aussi, des candidats putatifs impliqués dans la croissance racinaire pourrait être identifiés en comparant les gènes régulés différemment selon que l'hormone est un effet positif ou négatif sur la croissance. Ces hypothèses seront à valider en quantifiant l'expression de ces gènes de réponse aux différentes hormones dans les racines de peuplier. Des études globales de l'expression des gènes dans les racines de peuplier traitées à l'ACC et à l'acide jasmonique sont en cours au laboratoire (A. Kohler, communication personnelle). Peu de données sont disponibles chez le peuplier, l'analyse globale de l'expression des gènes de réponse aux différentes hormones dans les différents tissus pourrait être un atout pour les recherches futures.

Tableau Supplémentaire 4 : Liste des gènes du peuplier différenciellement exprimés après 1 semaine de co-culture avec *L. bicolor*

Les gènes sont considérés différenciellement exprimés s'ils suivent les critères suivants : rapport > 2 et que le test ANOVA corrigé de Benjamini et Hochberg possède une *p-value* < 0,05.

Gene ID ^b	Gene ID ^c	Arabidopsis gene ID ^d	Rapport ^e	test ANOVA Benjamini et Hochberg	Expression dans les racines témoin à 1 semaine ^f	Expression dans les racines en co-culture à 1 semaine ^f	Possibilité d'hybridation croisée des amorces sur la puce	<i>A. thaliana</i> annotation ^g
POPTR_0011s15940	Potri.011G155900.1	AT4G20800.1	24,98	0,0240	nd	343		FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0002s07370	Potri.002G072700.1	AT1G21460.1	23,27	0,0207	nd	2264	x	nodulin MtN3 family protein
POPTR_0014s02640	Potri.014G026600.1	AT5G67360.1	17,57	0,0026	nd	1517		ARA12; serine-type endopeptidase
POPTR_0002s07360	Potri.002G072800.1	AT1G21460.1	17,57	0,0166	nd	3072	x	nodulin MtN3 family protein
POPTR_0002s07350	Potri.002G072600.1	AT1G21460.1	17,22	0,0440	nd	2398	x	nodulin MtN3 family protein
POPTR_0010s20860	Potri.010G201000.1	AT1G17010.1	16,77	0,0061	nd	1616		oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
POPTR_0017s13320	Potri.017G098800.1	AT3G29970.1	13,57	0,0006	nd	3934		germination protein-related
no blast hit	no blast hit	AT2G38870.1	11,61	0,0222	nd	2183	x	protease inhibitor, putative
POPTR_0004s17430	Potri.004G167000.1	AT3G29970.1	11,27	0,0038	nd	3068		germination protein-related
POPTR_0019s10730	Potri.019G078600.1	AT5G36110.1	11,24	0,0000	552	6206		CYP716A1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
POPTR_0010s20850	Potri.010G200900.1	AT3G21420.1	11,08	0,0442	nd	450		oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
POPTR_0455s00200	Potri.010G153700.1	AT3G53480.1	10,96	0,0219	nd	2394		PDR9 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
POPTR_0010s11550	Potri.010G104800.1	AT1G68040.1	10,60	0,0101	nd	1218		S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein
POPTR_0001s24120	Potri.001G234500.1	AT2G28630.1	10,11	0,0101	nd	2033		KCS12 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 12); acyltransferase/ catalytic/ transferase, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
POPTR_0006s22880	Potri.006G212200.1	AT2G38870.1	9,15	0,0451	361	3303	x	protease inhibitor, putative
POPTR_0004s11630	Potri.004G117300.1	AT4G23180.1	8,83	0,0440	nd	808		CRK10 (CYSTEINE-RICH RLK10); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase
POPTR_0010s16340	Potri.010G153600.1	AT3G53480.1	8,67	0,0250	316	2736		PDR9 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
POPTR_0015s15430	Potri.015G120900.1	AT4G37760.1	6,47	0,0291	368	2378		SQE3 (squalene epoxidase 3); squalene monooxygenase
no blast hit	no blast hit	no arabidopsis blast hit	4,95	0,0440	870	4310		
POPTR_0013s12670	Potri.013G122400.1	AT4G35160.1	4,21	0,0417	967	4071		O-methyltransferase family 2 protein
POPTR_0021s00960	Potri.011G001500.1	AT5G36110.1	4,19	0,0291	1413	5925		CYP716A1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
POPTR_0013s04920	Potri.013G052100.1	AT5G39110.1	3,97	0,0166	2131	8465	x	germin-like protein, putative
POPTR_0013s04880	Potri.013G052300.1	AT3G05950.1	3,84	0,0030	2798	10742	x	germin-like protein, putative
POPTR_0013s04870	Potri.T151800.1	AT5G39110.1	3,83	0,0128	2934	11224	x	germin-like protein, putative
POPTR_0006s15610	Potri.006G151600.1	AT4G37370.1	3,82	0,0450	845	3223		CYP81D8; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
no blast hit	no blast hit	AT5G53550.1	3,40	0,0258	1965	6691		YSL3 (YELLOW STRIPE LIKE 3); oligopeptide transporter
POPTR_0011s07830	Potri.012G028300.1	no arabidopsis blast hit	3,31	0,0118	2717	8999		
POPTR_0011s07830	Potri.012G028300.1	AT5G53550.1	3,24	0,0071	2871	9302	x	YSL3 (YELLOW STRIPE LIKE 3); oligopeptide transporter
no blast hit	no blast hit	AT5G39110.1	3,11	0,0037	4343	13503	x	germin-like protein, putative
POPTR_0012s03180	Potri.012G024700.1	AT5G53550.1	3,08	0,0223	2195	6757	x	YSL3 (YELLOW STRIPE LIKE 3); oligopeptide transporter
POPTR_0007s10350	Potri.007G050300.1	AT2G14960.1	2,94	0,0207	3498	10295		GH3.1
POPTR_0014s06260	Potri.014G067100.1	AT2G45220.1	2,72	0,0100	4337	11783		pectinesterase family protein
POPTR_0006s22860	Potri.006G212000.1	AT2G19590.1	2,51	0,0222	5731	14369		ACO1 (ACC OXIDASE 1); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
POPTR_0012s00700	Potri.012G006800.1	AT1G05260.1	2,31	0,0018	8142	18768		RCI3 (RARE COLD INDUCIBLE GENE 3); peroxidase
POPTR_0014s06740	Potri.014G071700.1	AT3G60900.1	0,26	0,0303	11148	2931		FLA10
POPTR_0001s13280	Potri.001G062100.1	no arabidopsis blast hit	0,15	0,0442	4429	649		
POPTR_0021s00760	Potri.011G003300.1	AT1G11700.1	0,11	0,0205	5170	594		unknown protein
POPTR_0001s08430	Potri.001G112900.1	AT1G12560.1	0,09	0,0389	10438	954		ATEXPA7 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A7)
POPTR_0005s18730	Potri.005G143900.1	AT3G61430.1	0,03	0,0450	1287	nd		PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A); water channel

^aGene modèle de la version 7.0; ^bGene modèle de la version V9.0; ^c*A. thaliana* gene ID orthologue du *Populus* gene ID (Phytozome annotation); ^dRapport de la fluorescence observée en condition de contact avec *L. bicolor* / condition control, sans *L. bicolor*. ^eLes gènes possédant une valeur de fluorescence < 300 est considéré comme non détecté (nd); ^fTAIR annotation

Tableau Supplémentaire 5 : Liste des gènes du peuplier différenciellement exprimés après 2 semaine de co-culture avec *L. bicolor*

Les gènes sont considérés différenciellement exprimés s'ils suivent les critères suivants : rapport > 2 et que le test ANOVA corrigé de Benjamini et Hochberg possède une *p-value* $< 0,05$.

Gene ID ^b	Gene ID ^c	Arabidopsis gene ID ^d	Rapport	test ANOVA Benjamini et Hochberg	Expression dans les racines témoin à 2 semaine ^f	Expression dans les racines en co-culture à 2 semaine ^f	Possibilité d'hybridation croisée des amorces sur la puce	<i>A. thaliana</i> annotation ^e
POPTR_0014s02640.1	Potri.014G026600.1	AT5G67360.1	103,22	0,0000	nd	1577		ARA12; serine-type endopeptidase
POPTR_0010s20860.1	Potri.010G201000.1	AT1G17010.1	68,65	0,0002	nd	3077		oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
POPTR_0006s22880.1	Potri.006G212200.1	AT2G38870.1	54,46	0,0011	nd	2025	x	protease inhibitor, putative
POPTR_0006s22860.1	Potri.006G212000.1	AT2G38870.1	47,44	0,0014	nd	3002	x	protease inhibitor, putative
POPTR_0006s25600.1	Potri.006G239500.1	AT4G28890.1	46,05	0,0002	nd	692		protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding
POPTR_0016s07970.1	Potri.016G078800.1	AT2G38870.1	38,11	0,0047	nd	666		protease inhibitor, putative
POPTR_0001s46360.1	Potri.001G459200.1	AT4G20800.1	35,26	0,0014	nd	1032		FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0016s07980.1	Potri.016G078900.1	AT2G38870.1	34,91	0,0140	nd	1203		protease inhibitor, putative
POPTR_0002s07360.1	Potri.002G072800.1	AT1G21460.1	32,63	0,0014	nd		x	nodulin MtN3 family protein
POPTR_0016s07990.1	Potri.016G079100.1	AT2G38870.1	32,48	0,0210	nd	1265	x	protease inhibitor, putative
POPTR_0010s20850.1	Potri.010G200900.1	AT3G21420.1	31,56	0,0014	nd	702		oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
POPTR_0002s07350.1	Potri.002G072600.1	AT1G21460.1	28,75	0,0015	nd	1881	x	nodulin MtN3 family protein
POPTR_0002s07370.1	Potri.002G072700.1	AT1G21460.1	28,54	0,0017	nd	1693	x	nodulin MtN3 family protein
POPTR_0016s04840.1		AT5G06800.1	27,28	0,0212	nd	1381		myb family transcription factor
POPTR_0003s00530.1	Potri.T036800.1	no arabidopsis blast hit	27,09	0,0071	nd	1089		
POPTR_0004s05080.1	Potri.004G051500.1	AT5G28010.1	27,06	0,0333	nd	1425		Bet v I allergen family protein
POPTR_0009s14940.1	Potri.009G147100.1	AT2G36380.1	25,42	0,0255	nd	598		PDR6; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
POPTR_0003s00210.1	Potri.T036500.1	no arabidopsis blast hit	22,47	0,0336	nd	1096		
POPTR_0003s00200.1		no arabidopsis blast hit	20,49	0,0045	nd	3428		
POPTR_0003s00450.1		AT1G68840.1	20,13	0,0137	nd	715		RAV2 (REGULATOR OF THE ATPASE OF THE VACUOLAR MEMBRANE); DNA binding / transcription factor/ transcription repressor
POPTR_0455s00200.1	Potri.010G153700.1	AT3G53480.1	20,08	0,0014	nd	3699		PDR9 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
POPTR_0453s00230.1		AT5G06800.1	20,01	0,0142	nd	2238		myb family transcription factor
POPTR_0016s01950.1		AT1G22340.1	18,41	0,0308	nd	373		AtUGT85A7 (UDP-glucosyl transferase 85A7); UDP-glycosyltransferase/ glucuronosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups
POPTR_0010s16340.1	Potri.010G153600.1	AT3G53480.1	17,58	0,0014	nd	4104		PDR9 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
POPTR_0021s00520.1	Potri.011G005400.1	no arabidopsis blast hit	17,52	0,0140	nd	1121		
POPTR_0012s05940.1	Potri.012G062200.1	AT5G15630.1	16,60	0,0115	nd	3364		IRX6
POPTR_0021s00570.1	Potri.011G004900.1	no arabidopsis blast hit	16,30	0,0048	nd	1803	x	
POPTR_0001s46600.1	Potri.001G461700.1	AT4G20820.1	15,79	0,0155	nd	1883	x	FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0008s23030.1	Potri.008G213100.1	AT1G24020.1	15,61	0,0107	nd	2815		MLP423 (MLP-LIKE PROTEIN 423)
POPTR_0021s00510.1	Potri.011G005500.1	no arabidopsis blast hit	15,44	0,0049	nd	1435	x	
POPTR_0011s16120.1	Potri.011G157900.1	AT5G44440.1	15,19	0,0336	nd	1033		FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0019s10730.1	Potri.019G078600.1	AT5G36110.1	15,07	0,0005	495	7458		CYP716A1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
POPTR_0007s03640.1		AT1G73260.1	14,83	0,0378	nd	493		trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein
POPTR_0001s46620.1	Potri.001G461900.1	AT4G20820.1	13,16	0,0115	nd	2172	x	FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0017s06760.1	Potri.017G040200.1	AT3G22060.1	12,77	0,0416	nd	534		receptor protein kinase-related
POPTR_0217s00210.1		AT3G60140.1	12,14	0,0241	nd	1102	x	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
POPTR_0001s36280.1	Potri.001G335900.1	AT1G19250.1	12,01	0,0457	nd	408		FMO1 (FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1); FAD binding / NADP or NADPH binding / electron carrier/ flavin-containing monooxygenase/ monooxygenase/ oxidoreductase
POPTR_0014s10440.1	Potri.014G108800.1	AT4G01575.1	11,90	0,0014	732	8705		serine protease inhibitor, Kazal-type family protein
POPTR_0004s18990.1		AT5G42260.1	10,70	0,0499	nd	1151		BGLU12 (BETA GLUCOSIDASE 12); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds

Tableau Supplémentaire 5 : Liste des gènes du peuplier différentiellement exprimés après 2 semaine de co-culture avec *L. bicolor*

Les gènes sont considérés différentiellement exprimés si ils suivent les critères suivants : rapport > 2 et que le test ANOVA corrigé de Benjamini et Hochberg possède une *p-value* < 0,05.

Gene ID ^b	Gene ID ^c	Arabidopsis gene ID ^d	Rapport ^e	test ANOVA Benjamini et Hochberg	Expression dans les racines témoin à 2 semaine ^f	Expression dans les racines en co-culture à 2 semaine ^f	Possibilité d'hybridation croisée des amorces sur la puce	<i>A. thaliana</i> annotation ^g
POPTR_0001s23080.1	Potri.001G223300.1	AT2G44480.1	10,29	0,0404	nd	1665	x	BGLU17 (BETA GLUCOSIDASE 17); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
POPTR_0019s02560.1	Potri.019G011000.1	AT1G73260.1	10,11	0,0310	nd	1740		trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein
POPTR_0001s23070.1	Potri.001G222900.1	AT5G42260.1	10,10	0,0394	nd	1873	x	BGLU12 (BETA GLUCOSIDASE 12); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
POPTR_0019s02570.1	Potri.019G010900.1	AT1G73260.1	10,01	0,0445	nd	1695		trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein
POPTR_0019s02590.1	Potri.019G010800.1	AT5G42260.1	9,98	0,0410	nd	950		BGLU12 (BETA GLUCOSIDASE 12); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
POPTR_0004s10900.1	Potri.T018600.1	AT5G42260.1	9,94	0,0333	nd	1685	x	BGLU12 (BETA GLUCOSIDASE 12); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
POPTR_0013s13990.1	Potri.013G136400.1	AT4G35160.1	8,57	0,0108	618	5297	x	O-methyltransferase family 2 protein
POPTR_0013s14000.1	Potri.013G136400.1	AT4G35160.1	8,38	0,0062	561	4701	x	O-methyltransferase family 2 protein
POPTR_0005s18730.1	Potri.005G143900.1	AT4G37370.1	8,06	0,0248	330	2664		CYP81D8; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
POPTR_0013s04920.1	Potri.013G052100.1	AT5G39110.1	7,83	0,0014	981	7686	x	germin-like protein, putative
POPTR_0021s00960.1	Potri.011G001500.1	AT5G36110.1	7,55	0,0104	1032	7786		CYP716A1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
POPTR_0001s27780.1	Potri.001G270900.1	AT4G15350.1	7,10	0,0155	649	4603		CYP705A2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
POPTR_0013s04870.1	Potri.T151800.1	AT5G39110.1	6,88	0,0016	1448	9955	x	germin-like protein, putative
POPTR_0011s04090.1		no arabidopsis blast hit	6,75	0,0248	522	3521		
POPTR_0013s04880.1	Potri.013G052300.1	AT3G05950.1	6,67	0,0014	1452	9691	x	germin-like protein, putative
POPTR_0009s06940.1	Potri.009G065000.1	AT4G15350.1	6,43	0,0499	956	6141	x	CYP705A2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
POPTR_0001s46910.1	Potri.001G464800.1	AT1G30700.1	6,40	0,0103	658	4210		FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0013s12670.1	Potri.013G122400.1	AT4G35160.1	6,22	0,0115	784	4878		O-methyltransferase family 2 protein
POPTR_0004s02300.1		AT4G23180.1	5,94	0,0404	478	2841		CRK10 (CYSTEINE-RICH RLK10); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase
POPTR_0001s46650.1	Potri.001G462100.1	AT4G20820.1	5,29	0,0171	893	4729	x	FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0013s04910.1		AT5G39110.1	5,26	0,0014	2424	12740	x	germin-like protein, putative
POPTR_0014s10450.1		no arabidopsis blast hit	4,75	0,0416	1048	4974		
POPTR_0001s46580.1	Potri.001G461500.1	AT4G20820.1	4,54	0,0173	1180	5359	x	FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0007s10350.1	Potri.007G050300.1	AT2G14960.1	4,27	0,0043	2907	12411		GH3.1
POPTR_0013s04840.1	Potri.013G051600.1	AT3G05950.1	4,26	0,0499	1059	4515	x	germin-like protein, putative
POPTR_0001s46610.1	Potri.001G461800.1	AT5G44440.1	4,06	0,0210	2232	9072	x	FAD-binding domain-containing protein
POPTR_0487s00210.1		AT1G31130.1	3,88	0,0417	1413	5475	x	unknown protein
POPTR_0013s12510.1	Potri.013G120800.1	AT4G35160.1	3,75	0,0212	2418	9071	x	O-methyltransferase family 2 protein
POPTR_0013s06000.1	Potri.013G063000.1	AT5G39130.1	3,75	0,0016	2822	10571	x	germin-like protein, putative
POPTR_1158s00200.1	Potri.013G064100.1	AT5G39130.1	3,65	0,0210	2464	8996	x	germin-like protein, putative
POPTR_0014s06260.1	Potri.014G067100.1	AT2G45220.1	3,61	0,0014	4056	14625		pectinesterase family protein
POPTR_0019s05170.1	Potri.019G036100.1	AT5G19790.1	3,46	0,0499	2200	7619		RAP2.11 (related to AP2 11); DNA binding / transcription factor
POPTR_0003s20330.1		no arabidopsis blast hit	2,92	0,0324	3712	10830		
POPTR_0011s00410.1	Potri.011G026100.1	AT1G24020.1	2,21	0,0394	5573	12339	x	MLP423 (MLP-LIKE PROTEIN 423)
POPTR_0007s00740.1	Potri.007G111600.1	AT1G05670.1	0,34	0,0363	8070	2725		UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
POPTR_0018s11440.1		AT5G48930.1	0,27	0,0445	6661	1823		HCT (HYDROXYCINNAMOYL-COA SHIKIMATE/QUINATE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE)

^aGene modèle de la version 7.0; ^bGene modèle de la version V9.0; ^d*A. thaliana* gene ID orthologue du *Populus* gene ID (Phytozome annotation); ^eRapport de la fluorescence observée en condition de contact avec *L. bicolor* / condition control, sans *L. bicolor*. ^fLes gènes possédant une valeur de fluorescence < 300 est considéré comme non détecté (nd); ^gTAIR annotation

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wiśniewska J, Wirniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C** (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* **8**: 249–56
- Abel S, Nguyen MD, Theologis a** (1995) The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in Arabidopsis thaliana. *J Mol Biol* **251**: 533–49
- Aguilar M, Ashby JM, Richards AM, Loake AJM, Watson MD, Shaw CH** (1988) Chemotaxis of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *J Gen Microbiol* **134**: 2741–2746
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* **17**: 73–90
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Bliilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R, Scheres B** (2004) The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* **119**: 109–120
- Bajguz A, Piotrowska A** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**: 957–69
- Baker RF, Leach KA, Braun DM** (2012) SWEET as Sugar : New Sucrose Effluxers in Plants. *Mol Plant* **1–3**
- Bao F, Shen J, Brady SR, Muday GK, Asami T, Yang Z** (2004) Brassinosteroids Interact with Auxin to Promote Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**: 1624–1631
- Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C** (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* **485**: 119–122
- Barlow PW** (2003) The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function. *J Plant Growth Regul* **21**: 261–286
- De Bary A** (1887) Comparative Morphology and Biology of the fungi Mycetozoa and bacteria.
- Baum S, Dubrovsky JG, Rost TL** (2002) Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) roots. *Am J Bot* **89**: 908–920
- Bécard G, Douds DD, Pfeffer PE** (1992) Extensive In Vitro Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO₂ and Flavonols. *Appl Environ Microbiol* **58**: 821–5
- Beemster GT, Baskin TI** (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **116**: 1515–1526
- Beguiristain BYT, Lapeyrie F, Forestiere EDM** (1997) Host plant stimulates hypaphorine accumulation in Pisolithus tinctorius hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytol* **525–532**
- Bender RL, Fekete ML, Klinkenberg PM, Hampton M, Bauer B, Malecha M, Lindgren K, A Maki J, Perera MADN, Nikolau BJ, et al** (2013) PIN6 is required for nectary auxin response and short stamen development. *Plant J* **74**: 893–904
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591–602
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA** (1996) Arabidopsis AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* (80-) **273**: 948–950
- Bent A, Innes R, Ecker JR, Staskawicz B** (1992) Disease development in ethylene-insensitive Arabidopsis thaliana infected with virulent and avirulent Pseudomonas and Xanthomonas pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**: 372–378
- Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G** (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. *Plant J* **29**: 325–32
- Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Amoresano A, Carpentieri A, Pucci P, Defez R** (2006) Indole-3-acetic acid improves Escherichia coli's defences to stress. *Arch Microbiol* **185**: 373–382
- Bibikova T, Gilroy S** (2003) Root Hair Development. *J Plant Growth Regul* **21**: 383–415
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, et al** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 131–47
- Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert J V, Finlay R, Botton B, Chalot M** (2000) Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. *Mycol Res* **104**: 1366–1371
- Bliilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**: 39–44

- Bogeat-Triboulot M-B, Bartoli F, Garbaye J, Marmeisse R, Tagu D** (2004) Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. *Plant Soil* **267**: 213–223
- Bonfante P, Genre A** (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* **1**: 1–48
- Braun N, Wyrzykowska J, Muller P, David K, Couch D, Perrot-Rechenmann C, Fleming AJ** (2008) Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* **20**: 2746–62
- Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, Rombauts S, Raes J, Cannoot B, Engler G, et al** (2002) Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14825–30
- Brunoud G, Wells DM, Oliva M, Larrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beeckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ, et al** (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**: 103–106
- Bruns TD** (1995) Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **170**: 63–73
- Burgess T, Dell B, Malajczuk N** (1996) In vitro synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza* **6**: 189–196
- Busov VB, Strauss SH, Pilate G** (2010) Transformation as a Tool for Genetic Analysis in *Populus*. In S Jansson, R Bhalerao, A Groover, eds, *Genet. Genomics Popul.* Springer New York, New York, NY, pp 113–133
- Calderon-Villalobos LI, Tan X, Zheng N, Estelle M** (2010) Auxin perception—structural insights. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a005546
- Cambridge A, Morris D** (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **199**: 583–588
- Cardozo T, Pagano M** (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 739–51
- Carraro N, Forestan C, Canova S, Traas J, Varotto S** (2006) ZmPIN1a and ZmPIN1b encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. *Plant Physiol* **142**: 254–64
- Carraro N, Tisdale-Orr TE, Clouse RM, Knöller AS, Spicer R** (2012) Diversification and Expression of the PIN, AUX/LAX, and ABCB Families of Putative Auxin Transporters in *Populus*. *Front Plant Sci* **3**: 17–37
- Casieri L, Ait Lahmidi N, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty P-E, Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, et al** (2013) Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza* **23**: 597–625
- Casimiro I, Marchant a, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, et al** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**: 843–52
- Cazonnelli CI, Vanstraelen M, Simon S, Yin K, Carron-Arthur A, Nisar N, Tarle G, Cuttriss AJ, Searle IR, Benkova E, et al** (2013) Role of the *Arabidopsis* PIN6 Auxin Transporter in Auxin Homeostasis and Auxin-Mediated Development. *PLoS One* **8**: e70069
- Chalot M, Blaudez D, Brun A** (2006) Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends Plant Sci* **11**: 263–266
- Chassot C, Nawrath C, Métraux J-P** (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J* **49**: 972–80
- Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones a M** (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* **15**: 902–11
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH** (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15112–15117
- Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN** (2007) *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 20131–20136
- Chung KR, Tzeng DD** (2004) Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid by the Gall-inducing Fungus *Ustilago esculenta*. *J Biol Sci* **4**: 744–750
- Cohen D, Bogeat-Triboulot M-B, Tisserant E, Balzergue S, Martin-Magniette M-L, Lelandais G, Ningre N, Renou J-P, Tamby J-P, Le Thiec D, et al** (2010) Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* **11**: 630

- Dal Bosco C, Dovzhenko A, Liu X, Woerner N, Rensch T, Eismann M, Eimer S, Hegermann J, Paponov IA, Ruperti B, et al** (2012) The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis. *Plant J* **860**–870
- Darwin C** (1880) The power of movement in plants. *Sleep Rochester* **13**: 592
- Davies RT, Goetz DH, Lasswell J, Anderson MN, Bartel B** (1999) IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 365–376
- Depuydt S, Hardtke CS** (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* **21**: R365–73
- DesRochers A** (2013) Les liens racinaires, une communication souterraine entre les arbres. *Le soleil* **6ème édit**: 9
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441–5
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M** (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**: 109–119
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof Y-D, Friml J** (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **17**: 520–7
- Dhonukshe P, Huang F, Galvan-Ampudia CS, Mähönen AP, Kleine-Vehn J, Xu J, Quint A, Prasad K, Friml J, Scheres B, et al** (2010) Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development* **137**: 3245–55
- Dickmann D** (2006) Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: Then and now. *Biomass and Bioenergy* **30**: 696–705
- Ding Z, Friml J** (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 12046–12051
- Ding Z, Wang B, Moreno I, Dupláková N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Pěňčík A, Chen X, Tejos R, et al** (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nat Commun* **3**: 941
- Ditengou F a, Béguiristain 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**: 722–8
- Ditengou F a, 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**: 151–8
- Ditengou FA, Teale WD, Kochersperger P, Flittner KA, Kneuper I, van der Graaff E, Nziengui H, Pinosa F, Li X, Nitschke R, et al** (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18818–23
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z** (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* **38**: W64–70
- Dubrovsky JG, Gambetta G a, Hernández-Barrera a, Shishkova S, González I** (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot* **97**: 903–15
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucially-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E** (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8790–4
- Duplessis S, Courty P-E, Tagu D, Martin F** (2005) Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytol* **165**: 599–611
- Evangelisti E, Govetto B, Kuhn M** (2013) The *Phytophthora parasitica* RXLR effector Penetration-Specific Effector 1 favours *Arabidopsis thaliana* infection by interfering with auxin physiology. *New Phytol* **199**: 476–489
- Evans M, Ishikawa H, Estelle M** (1994) Responses of *Arabidopsis* roots to auxin studied with high temporal resolution: Comparison of wild type and auxin-response mutants. *Planta*. doi: 10.1007/BF00196390
- Felten J** (2009) Développement racinaire du peuplier en réponse aux signaux fongiques lors de la mise en place de l'ectomycorhize. 1–105
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V** (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* **151**: 1991–2005
- Felten J, Legué V, Ditengou FA** (2010) Lateral root stimulation in the early interaction between *Arabidopsis thaliana* and the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: is fungal auxin the trigger? *Plant Signal Behav* **5**: 864–867

- Felten J, Martin F, Legué V** (2012) Signalling in ectomycorrhizal symbiosis. *Signal. Commun. Plant Symbiosis*. pp 123–142
- Ferreira P, Hemerly IAS, Engler JDA, Van Montagu MCE, Engler G, Inzé D** (1994) Developmental Expression of the Arabidopsis Cyclin Gene *cyc1At*. *Plant Cell* **6**: 1763–1774
- Flores-Monterroso A, Canales J, Torre F de la** (2013) Identification of genes differentially expressed in ectomycorrhizal roots during the *Pinus pinaster*–*Laccaria bicolor* interaction. *Planta* 1–14
- Fourcroy P, Sis P, Sudre D, Abadia J, Alvarez-fern A** (2013) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency.
- Frettinger P, Derory J, Herrmann S, Plomion C, Lapeyrie F, Oelmüller R, Martin F, Buscot F** (2007) Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum*. *Planta* **225**: 331–40
- Friml J, Benková E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jürgens G, et al** (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**: 661–73
- Friml J, Benková E, Mayer U, Palme K, Muster G** (2003) Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *Plant J Cell Mol Biol* **34**: 115–124
- Fu X, Harberd NP** (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740–3
- Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A, Tasaka M** (2005) Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. *Plant J* **44**: 382–395
- Fukaki H, Tasaka M** (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* **69**: 437–449
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B** (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**: 1053–7
- Gälweiler L, Guan Ch, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K** (1998) Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in Arabidopsis Vascular Tissue. *Science* (80-) **282**: 2226–2230
- Gamas P, Niebel F de C, Lescure N, Cullimore J** (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol plant-microbe Interact* **9**: 233–242
- Garay-Arroyo A, De La Paz Sánchez M, García-Ponce B, Azpeitia E, Alvarez-Buylla ER** (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Dev Dyn* **241**: 1867–85
- Gay G, Debaud JC** (1987) Applied Microbiology Biotechnology Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**: 141–146
- Gay G, NORMAND L, Marmesse R, Sotta B, Debaud J c.** (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytol* **128**: 645–657
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL, et al** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* **44**: 179–94
- Gogala N** (1991) Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* **47**: 331–340
- Gojon A, Nacry P, Davidian J-C** (2009) Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 328–338
- Golldack D, Vera P, Dietz K-J** (2003) Expression of subtilisin-like serine proteases in Arabidopsis thaliana is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiol Plant* **118**: 64–73
- Gonzales-Garcia M-P, Vilarrasa-blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-garcía S, Russinova E, Caño-delgado AI** (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Dev stem cells* **859**: 849–859
- Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB** (2010) Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell* **22**: 623–39
- Graham JH, Linderman RG** (1980) Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pini*, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir roots. *Can J Microbiol* **26**: 1340–1347
- Gray WM, Pozo JC, Walker L, Hobbie L, Risseeuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M** (1999) Identification of an SCF ubiquitin – ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* 1678–1691

- Grieneisen VA, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P, Scheres B** (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008–1013
- Gruen HE** (1959) Auxins and Fungi. *Annu Rev Plant Physiol* **10**: 405–440
- Grunewald W, Cannoot B, Friml J, Gheysen G** (2009a) Parasitic nematodes modulate PIN-mediated auxin transport to facilitate infection. *PLoS Pathog* **5**: e1000266
- Grunewald W, van Noorden G, Van Isterdael G, Beekman T, Gheysen G, Mathesius U** (2009b) Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *Plant Cell* **21**: 2553–2562
- Hacham Y, Holland N, Butterfield C, Ubeda-Tomas S, Bennett MJ, Chory J, Savaldi-Goldstein S** (2011) Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* **138**: 839–848
- Hacquard S, Delaruelle C, Legué V, Tisserant E, Kohler A, Frey P, Martin F, Duplessis S** (2010) Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 1275–86
- Hacquard S, Tisserant E, Brun A, Legué V, Martin F, Kohler A** (2013) Laser microdissection and microarray analysis of *Tuber melanosporum* ectomycorrhizas reveal functional heterogeneity between mantle and Hartig net compartments. *Environ Microbiol* **15**: 1853–69
- Hagen G, Guilfoyle T** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**: 373–385
- Hager A** (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res* **116**: 483–505
- Hahn A, Zimmermann R, Wanke D, Harter K, Edelmann HG** (2008) The root cap determines ethylene-dependent growth and development in maize roots. *Mol Plant* **1**: 359–67
- Hardtke CS, Ckurshumova W, Vidaurre DP, Singh S a, Stamatiou G, Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ, Berleth T** (2004) Overlapping and non-redundant functions of the Arabidopsis auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development* **131**: 1089–100
- Hay A, Tsiantis M** (2005) From genes to plants via meristems. *Development* **132**: 2679–84
- Hayashi K** (2012a) The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol* **53**: 965–75
- Hayashi K** (2012b) Visualization of cellular auxin distribution by chemical biology approach biology approach. *Auxin 2012*. Waikoloa Beach Drive Waikoloa; Hawaii, p 15
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy G V, Long J a, Meyerowitz EM** (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**: 1899–911
- Heller G, Adomas A, Li G, Osborne J, van Zyl L, Sederoff R, Finlay RD, Stenlid J, Asiegbu FO** (2008) Transcriptional analysis of *Pinus sylvestris* roots challenged with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Plant Biol* **8**: 19
- Hemerly a S, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inzé D** (1993) *cdc2a* expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**: 1711–23
- Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ** (2000) Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* **407**: 506–8
- Hibbett DS, Matheny PB** (2009) The relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts estimated using Bayesian relaxed molecular clock analyses. *BMC Biol* **7**: 13
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**: 75–83
- Horan DP, Chilvers GA, Lapeyrie FF** (1988) Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytol* **109**: 451–458
- Iijima M, Higuchi T, Barlow PW** (2004) Contribution of root cap mucilage and presence of an intact root cap in maize (*Zea mays*) to the reduction of soil mechanical impedance. *Ann Bot* **94**: 473–7
- Ikeda Y, Men S, Fischer U, Stepanova AN, Alonso JM, Ljung K, Grebe M** (2009) Local auxin biosynthesis modulates gradient-directed planar polarity in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* **11**: 731–8
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S** (2007) Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol CB* **17**: 678–682
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S** (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**: 1380–4
- Ishida T, Adachi S, Yoshimura M, Shimizu K, Umeda M, Sugimoto K** (2010) Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in Arabidopsis. *Development* **137**: 63–71

- Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG** (2008) Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **55**: 335–347
- Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hoggett J, Ashford D a, Bowles DJ** (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**: 4350–6
- Jaillais Y, Chory J** (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 642–5
- Jiang F, Hartung W** (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot* **59**: 37–43
- Johansson T, Le Quéré A, Ahren D, Söderström B, Erlandsson R, Lundeberg J, Uhlén M, Tunlid A** (2004) Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 202–15
- Johri MM** (2008) Hormonal regulation in green plant lineage families. *Physiol Mol Biol Plants* **14**: 23–38
- Jones a M, Venis M a** (1989) Photoaffinity labeling of indole-3-acetic acid-binding proteins in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6153–6
- Jones B, Ljung K** (2012) Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 97–102
- Joo JH, Bae YS, Lee JS** (2001) Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism. *Plant Physiol* **126**: 1055–1060
- Jung JKH, McCouch S** (2013) Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Front Plant Sci* **4**: 1–32
- Jurado S, Abraham Z, Manzano C, López-Torrejón G, Pacios LF, Del Pozo JC** (2010) The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell* **22**: 3891–904
- Jurado S, Díaz-Triviño S, Abraham Z, Manzano C, Gutierrez C, del Pozo C** (2008) SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant J* **53**: 828–41
- Kageyama S, Mandyam K, Jumpponen A, Varma A** (2008) Diversity, function and potential applications of the root-associated endophytes. *Mycorrhiza* **128**
- Kai K, Horita J, Wakasa K, Miyagawa H** (2007) Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**: 1651–63
- Kalluri UC, Difazio SP, Brunner AM, Tuskan G a** (2007) Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* **7**: 59
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretschmar T, Lee Y, Martinoia E** (2011) Plant ABC Transporters. *Arab B* **9**: 1–25
- Karabaghli C, Frey-Klett P, Sotta B, Bonnet M, Le Tacon F** (1998) In vitro effects of *Laccaria bicolor* S238 N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. *Tree Physiol* **18**: 103–111
- Karabaghli-Degron C, Botta B, Bonnet M, Gay G, Le Tacon F** (1998) The auxin transport inhibitor 2 , 3 , 5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria*. *New Phytol* **723–733**
- Kepinski S, Leyser O** (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446–51
- Kim J, Harter K, Theologis A** (1997) Protein–protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 11786–11791
- Korasick D a, Enders T a, Strader LC** (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* **64**: 2541–55
- Křeček P, Skůpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zažímalová E** (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* **1–11**
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, et al** (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell* **18**: 927–37
- Kubeš M, Yang H, Richter GL, Cheng Y, Młodzińska E, Wang X, Blakeslee JJ, Carraro N, Petrášek J, Zažímalová E, et al** (2012) The *Arabidopsis* concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *Plant J* **69**: 640–54
- Lagrange H, Jay-Allmand 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, Breemen N Van** (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* **16**: 248–254

- Langenfeld-Heysler R, Gao J, Ducic T, Tachd P, Lu CF, Fritz E, Gafur a, Polle a** (2007) Paxillus involutus mycorrhiza attenuate NaCl-stress responses in the salt-sensitive hybrid poplar *Populusxcanescens*. *Mycorrhiza* **17**: 121–31
- Laplaze L, Ribeiro a, Franche C, Duhoux E, Auguy F, Bogusz D, Pawlowski K** (2000) Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa* ag12. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 113–7
- Laskowski M, Biller S, Stanley K, Kajstura T, Prusty R** (2006) Expression Profiling of Auxin-treated Arabidopsis Roots: Toward a Molecular Analysis of Lateral Root Emergence. *Plant Cell Physiol* **47**: 788–792
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex IM** (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**: 3303–3310
- Lee C, Chronis D, Kenning C, Peret B, Hewezi T, Davis EL, Baum TJ, Hussey R, Bennett M, Mitchum MG** (2011) The novel cyst nematode effector protein 19C07 interacts with the Arabidopsis auxin influx transporter LAX3 to control feeding site development. *Plant Physiol* **155**: 866–80
- Lemcke K, Prinsen E, van Onckelen H, Schmülling T** (2000) The ORF8 gene product of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA has tryptophan 2-monooxygenase activity. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 787–90
- Lenhard M, Bohnert a, Jürgens G, Laux T** (2001) Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**: 805–14
- Leple J, Brasileiro A, Michel M, Delmotte F, Jouanin L** (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep* **11**: 137–141
- Leveau JHJ, Lindow SE** (2005) Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2365–2371
- Liskay A, Zalm E Van Der, Schopfer P** (2004) Production of Reactive Oxygen Intermediates (O_2^{2-} , H_2O_2 , and OH) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth. *Plant J* **136**: 3114–3123
- Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943–50
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**: 1090–1104
- Long J a, Ohno C, Smith ZR, Meyerowitz EM** (2006) TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. *Science* **312**: 1520–3
- Lucas M, Guédon Y, Jay-Allemand C, Godin C, Laplaze L** (2008) An Auxin Transport-Based Model of Root Branching in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0003673
- Lucic E, Fourrey C, Kohler A, Martin F, Chalot M, Brun-Jacob A** (2008) A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytol* **180**: 343–64
- Ludwig-Muller J** (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* **62**: 1757–1773
- Lugtenberg B, Kamilova F** (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* **63**: 541–556
- Luo Z-B, Janz D, Jiang X, Göbel C, Wildhagen H, Tan Y, Rennenberg H, Feussner I, Polle A** (2009) Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. *Plant Physiol* **151**: 1902–17
- Luschnig C, Gaxiola R a, Grisafi P, Fink GR** (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* **12**: 2175–87
- Maathuis FJM** (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 250–8
- Maeda H, Dudareva N** (2012) The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 73–105
- Maher EP, Martindale SJB** (1980) Mutants of Arabidopsis thaliana with altered responses to auxins and gravity. *Biochem Genet* **18**: 1041–1053
- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci* **2**: 390–396
- Manulis S, Haviv-Chesner a, Brandl MT, Lindow SE, Barash I** (1998) Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 634–42
- Maraschin FDS, Memelink J, Offringa R** (2009) Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J* **59**: 100–9
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklöf J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G** (2002) AUX1 Promotes Lateral Root Formation by Facilitating Indole-3-Acetic Acid Distribution between Sink and Source Tissues in the Arabidopsis Seedling. *Plant Cell* **14**: 589–597

- Marhavý P, Vanstraelen M, De Rybel B, Zhaojun D, Bennett MJ, Beeckman T, Benková E** (2013) Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *EMBO J* **32**: 149–58
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition of higher plants. San Diego **Academic P**: 889
- Martin F, Aerts a, Ahrén D, Brun a, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler a, Lindquist E, Pereda V, et al** (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88–92
- 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, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, et al** (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **464**: 1033–8
- Martin F, Nehls U** (2009) Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 508–515
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, et al** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18512–18517
- Massicotte HB, Peterson RL, E. AA** (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae . I . Light microscopy and scanning electron microscopy. *Can J Bot* **65**: 1927–1939
- McClure B a, Hagen G, Brown CS, Gee M a, Guilfoyle TJ** (1989) Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean. *Plant Cell* **1**: 229–39
- Men S, Boutté Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof Y-D, Hartmann M-A, Moritz T, Grebe M** (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol* **10**: 237–244
- Merret R, Moulia B, Hummel I, Cohen D, Dreyer E, Bogeat-Triboulot M-B** (2010) Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanics formalism. *BMC Biol* **8**: 18
- De Meutter J, Tytgat T, Prinsen E, Gheysen G, Van Onckelen H** (2005) Production of auxin and related compounds by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Commun Agric Appl Biol Sci* **70**: 51–60
- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, et al** (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**: 1044–56
- Miersch O, Bohlmann H, Wasternack C** (1999) Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* **50**: 517–523
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM** (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. *Mycorrhizal Funct. an Integr. plantfungal Process.* pp 357–423
- Morel M, Jacob C, Kohler A, Johansson T, Martin F, Chalot M, Brun A** (2005) Identification of Genes Differentially Expressed in Extraradical Mycelium and Ectomycorrhizal Roots during *Paxillus involutus*-*Betula pendula* Ectomycorrhizal Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 382–391
- Moreno-Risueno MA, Norman JM Van, Moreno A, Zhang J, Ahnert SE, Benfey PN** (2010) Oscillating Gene Expression Determines Competence for Periodic *Arabidopsis* Root Branching. *Science (80-)* **329**: 1306–1311
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S** (2010) The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* **20**: 1138–43
- Mouchel CF, Osmont KS, Hardtke CS** (2006) BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* **443**: 458–61
- Mravec J, Skůpa P, Bailly A, Hoyerová K, Krecek P, Bielach A, Petrásek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof Y-D, et al** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**: 1136–40
- Müller a, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant a, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K** (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* **17**: 6903–11
- Müller A, Volmer K, Mishra-Knyrim M, Polle A** (2013) Growing poplars for research with and without mycorrhizas. *Front Plant Sci* **4**: 332
- Müller T, Avolio M, Olivi M, Benjdia M, Rikirsch E, Kasaras A, Fitz M, Chalot M, Wipf D** (2007) Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum*-*Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* **68**: 41–51

- Nagy NE, Fossdal CG** (2013) Host responses in Norway spruce roots induced to the pathogen *Ceratocystis polonica* are evaded or suppressed by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Plant Biol (Stuttg)* **15**: 99–110
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436–439
- Nehls U, Mikolajewski S, Magel E, Hampp R** (2001) Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytol* **533**–541
- Nemhauser J, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **467**–475
- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC** (2008) Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol* **179**: 595–614
- Niemi K, Vuorinen T, Ernsten 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
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA** (2003) Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *423*: 999–1002
- Novák O, Hényková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T, Ljung K** (2012) Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J* **523**–536
- Nystedt B, Street N, Wetterbom A, Zuccolo A** (2013) The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* **579**–84
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, et al** (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**: 444–463
- Oldroyd GED** (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252–63
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS** (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 93–113
- Ostin a, Kowalczyk M, Bhalerao RP, Sandberg G** (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **118**: 285–96
- Ouellet F, Overvoorde PJ, Theologis a** (2001) IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* **13**: 829–41
- Ouyang J, Shao X, Li J** (2000) Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **24**: 327–33
- Paciorek T, Sauer M, Balla J, Wiśniewska J, Friml J** (2006) Immunocytochemical technique for protein localization in sections of plant tissues. *Nat Protoc* **1**: 104–107
- Padmanabhan MS, Kramer SR, Wang X, Culver JN** (2008) Tobacco Mosaic Virus Replicase-Auxin / Indole Acetic Acid Protein Interactions: Reprogramming the Auxin Response Pathway To Enhance Virus Infection. *J Virol* **82**: 2477–85
- Paponov IA, Teale W, Lang D, Paponov M, Reski R, Rensing SA, Palme K** (2009) The evolution of nuclear auxin signalling. *BMC Evol Biol* **9**: 126
- Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I, Palme K** (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* **10**: 170–177
- Parizot B, Beeckman T** (2013) Genomics of Root Development. *Root genomics soil Interact.* pp 3–28
- Park J-E, Park J-Y, Kim Y-S, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim S-Y, Kim J, Lee Y-H, Park C-M** (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**: 10036–46
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M, Estelle M** (2009) Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 22540–22545
- Parry G, Marchant A, May S, Swarup R, Swarup K, James N, Graham N, Allen T, Martucci T, Yemm A, et al** (2001) Quick on the Uptake: Characterization of a Family of Plant Auxin Influx Carriers. *J Plant Growth Regul* **20**: 217–225
- Pawlowski K, Demchenko KN** (2012) The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma*. doi: 10.1007/s00709-012-0388-4
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplace L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399–408

- Péret B, Swarup R, Jansen L, Devos G, Auguy F, Collin M, Santi C, Hocher V, Franche C, Bogusz D, et al** (2007) Auxin influx activity is associated with Frankia infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*. *Plant Physiol* **144**: 1852–62
- Perrine-Walker F, Doumas P, Lucas M, Vaissayre V, Beauchemin NJ, Band LR, Chopard J, Crabos A, Conejero G, Péret B, et al** (2010) Auxin carriers localization drives auxin accumulation in plant cells infected by Frankia in *Casuarina glauca* actinorhizal nodules. *Plant Physiol* **154**: 1372–80
- Perrot-Rechenmann C** (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: 1–15
- Petersson S V., Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K** (2009) An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *Plant Cell* **21**: 1659–1668
- Petrásek J, Friml J** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675–88
- Petrásek J, Mravec J, Bouchard R** (2006) PIN Proteins Perform a Rate-Limiting Function in Cellular Auxin Efflux. *Science* (80-) **32**: 914–918
- Pfabel C, Eckhardt K-U, Baum C, Struck C, Frey P, Weih M** (2012) Impact of ectomycorrhizal colonization and rust infection on the secondary metabolism of poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*). *Tree Physiol* **32**: 1357–64
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**: 308–16
- Plassard C, Louche J, Ali M a., Duchemin M, Legname E, Cloutier-Hurteau B** (2011) Diversity in phosphorus mobilisation and uptake in ectomycorrhizal fungi. *Ann For Sci* **68**: 33–43
- Plett JM, Kempainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F** (2011) A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr Biol* **21**: 1197–1203
- Plett JM, Martin F** (2011) Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends Genet* **27**: 14–22
- Plett JM, Martin F** (2012) Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant Signal Behav* **7**: 12–5
- Pollmann S, Neu D, Lehmann T, Berkowitz O, Schäfer T, Weiler EW** (2006) Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**: 1241–53
- Del Pozo JC, Diaz-Trivino S, Cisneros N, Gutierrez C** (2006) The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 2224–35
- Le Quéré A, Wright DP, Söderström B, Tunlid A, Johansson T** (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 659–73
- Rapparini F, Cohen JD, Slovin JP** (1999) Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Lemna gibba* studied using stable isotope labeled anthranilate and tryptophan. *Plant Growth Regul* **139**–144
- Rapparini F, Tam YY, Cohen JD, Slovin JP, Nazionale C, Arboree P** (2002) Indole-3-Acetic Acid Metabolism in *Lemna gibba* Undergoes Dynamic Changes in Response to Growth Temperature 1. **128**: 1410–1416
- Rashotte a M, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK** (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**: 481–90
- Rathnayake AP, Kadono H, Toyooka S, Miwa M** (2008) A novel optical interference technique to measure minute root elongations of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Seibold & Zucc.) seedlings infected with ectomycorrhizal fungi. *Environ Exp Bot* **64**: 314–321
- Read DJ, Perez-Moreno J** (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? *New Phytol* **157**: 475–492
- Regvar ZM, Gogala NN** (1997) Jasmonic acid affects mycorrhization of spruce seedlings with *Laccaria laccata*. *Trees* **11**: 511–514
- Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse CW** (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol* **9**: 339–355
- Rezzonico E, Flury N, Meins F, Beffa R** (1998) Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related beta-1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiol* **117**: 585–92
- Ribeiro A, Akkermans AD, van Kammen A, Bisseling T, Pawlowski K** (1995) A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell* **7**: 785–794

- Rincón 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 Physiol* **23**: 785–791
- Robert HS, Friml J** (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nat Chem Biol* **5**: 325–32
- Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, Vanneste S, Zhang J, Simon S, Čovanová M, et al** (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* **143**: 111–21
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG** (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **49**: 317–43
- Rojas-Pierce M, Titapiwatanakun B, Sohn EJ, Fang F, Larive CK, Blakeslee J, Cheng Y, Cutler SR, Cuttler S, Peer W a, et al** (2007) *Arabidopsis* P-glycoprotein19 participates in the inhibition of gravitropism by gravacin. *Chem Biol* **14**: 1366–76
- Rousseau JVD, Sylvia DM, Fox AJ** (1994) Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol* **128**: 639–644
- Rudawska ML, Kieliszewska-Rokicka B** (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-like changes in the morphology of root organ cultures of Mugo pine. *Physiol Plant* **64**: 316–322
- Růžička K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, Friml J, Benková E** (2007) Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution. *Plant Cell* **19**: 2197–2212
- Ruzicka K, Simásková M, Duclercq J, Petrásek J, Zazimalová E, Simon S, Friml J, Van Montagu MCE, Benková E** (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4284–4289
- Ruzicka K, Strader LC, Bailly A, Yang H, Blakeslee J, Langowski L, Nejedlá E, Fujita H, Itoh H, Syono K, et al** (2010) *Arabidopsis* PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 10749–53
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, et al** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**: 463–72
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B** (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev* **17**: 354–358
- Sauer M, Kleine-Vehn J** (2011) AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *Plant Cell* **23**: 2033–43
- Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J** (2013) Auxin: simply complicated. *J Exp Bot* **64**: 2565–77
- Scacchi E, Salinas P, Gujas B, Santuari L, Krogan N, Ragni L, Berleth T, Hardtke CS** (2010) Spatio-temporal sequence of cross-regulatory events in root meristem growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 22734–22739
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G, Wagner A** (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**: 821–8
- Sebastiana M, Figueiredo A, Acioli B, Sousa L, Pessoa F, Baldé A, Pais MS** (2009) Identification of plant genes involved on the initial contact between ectomycorrhizal symbionts (*Castanea sativa* – European chestnut and *Pisolithus tinctorius*). *Eur J Soil Biol* **45**: 275–282
- Shinshi H, Mohnen D, Meins F** (1987) Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 89–93
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M** (1993) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **59**: 4211–5
- Simon S, Kubeš M, Baster P, Robert S, Dobrev PI, Friml J, Petrášek J, Zazimalová E** (2013) Defining the selectivity of processes along the auxin response chain: a study using auxin analogues. *New Phytol* **4**: 1034–1048
- Simon S, Petrášek J** (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci* **180**: 454–60
- Sjödín A, Street NR, Sandberg G, Gustafsson P, Jansson S** (2009) The *Populus* Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. *New Phytol* **182**: 1013–1025
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF dit, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, et al** (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**: 681–690
- Smith SE, Read DJ** (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, Edition, T.

- Sorefan K, Girin T, Liljegren SJ, Ljung K, Robles P, Galván-Ampudia CS, Offringa R, Friml J, Yanofsky MF, Østergaard L** (2009) A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **459**: 583–6
- Spaepen S, Vanderleyden J** (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: 1–13
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R** (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 425–48
- Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I, Karlovsky P** (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol* **150**: 2018–29
- Staswick P** (2009) The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *Plant Physiol* **150**: 1310–1321
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W** (2005) Characterization of an *Arabidopsis* Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *Plant Cell* **17**: 616–627
- Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM** (2005) A Link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2230–2242
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie D-Y, Dolezal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM** (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**: 177–191
- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM** (2011) The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* **23**: 3961–3973
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z** (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinforma Appl note* **18**: 207–208
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H** (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 5430–5
- Sukumar P, Legué V, Vayssières A, Martin F, Tuskan G a, Kalluri UC** (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell Environ* **36**: 909–19
- Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, et al** (2009) *Arabidopsis* ASA1 Is Important for Jasmonate-Mediated Regulation of Auxin Biosynthesis and Transport during Lateral Root Formation. *Plant Cell* **21**: 1495–1511
- Svistoonoff S, Laplaze L, Auguy F, Runions J, Duponnois R, Haseloff J, Franche C, Bogusz D** (2003) cg12 expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocauarina verticillata* actinorhizal nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 600–7
- Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HMO, Haseloff J, Beemster GTS, Bhalerao R, Bennett MJ** (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat Cell Biol* **7**: 1057–1065
- Swarup R, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* **15**: 2648–2653
- Swarup R, Péret B** (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Front Plant Sci* **3**: 1–11
- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GTS, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ** (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* **19**: 2186–2196
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng CX, Robinson C V, Estelle M, Zheng N** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640–645
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J** (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci C* **63**: 2738–2754
- Tao Y, Ferrer J-L, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, et al** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**: 164–176
- Tarkka MT, Herrmann S, Wubet T, Feldhahn L, Recht S, Kurth F, Mailänder S, Bönn M, Neef M, Angay O, et al** (2013) OakContigDF159.1, a reference library for studying differential gene expression in *Quercus robur*

- during controlled biotic interactions: use for quantitative transcriptomic profiling of oak roots in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **199**: 529–540
- Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, Sato A, Watahiki MK, Harper RM, Liscum E, Yamamoto KT** (2004) MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 379–393
- Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee R, Richards EL, Murphy AS, Sato F, et al** (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* **17**: 2922–2939
- Thimann K V** (1938) HORMONES AND THE ANALYSIS OF GROWTH. *Plant Physiol* **13**: 437–449
- Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, et al** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**: 27–44
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T** (2003) The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *15*: 533–543
- Tognetti VB, Mühlenbock P, Van Breusegem F** (2012) Stress homeostasis - the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environ* **35**: 321–33
- 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
- Trappe JM, Fogel RD** (1977) Ecosystematic functions of mycorrhizae. *Belowgr. Ecosyst. a Synth. plantassociated Process.* pp 205–213
- Tromas A, Braun N, Muller P, Khodus T, Paponov I a, Palme K, Ljung K, Lee J-Y, Benfey P, Murray J a H, et al** (2009) The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS One* **4**: e6648
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM** (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**: 705–713
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ** (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr Biol CB* **19**: 1194–1199
- Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ** (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* **10**: 625–8
- Uehara T, Okushima Y, Mimura T, Tasaka M, Fukaki H** (2008) Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**: 1025–38
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T** (1997a) ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements. *Science (80-)* **276**: 1865–1868
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**: 309–19
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997b) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963–1971
- Valdés M, Asbjornsen H, Gómez-Cárdenas M, Juárez M, Vogt K a** (2006) Drought effects on fine-root and ectomycorrhizal-root biomass in managed *Pinus oaxacana* Mirov stands in Oaxaca, Mexico. *Mycorrhiza* **16**: 117–24
- Vanneste S, Friml J** (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005–16
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, et al** (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* **7**: 508
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J** (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521–31
- 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**: 181–191
- Wang B, Qiu Y-L** (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299–363

- Wang J, Wang L, Mao Y, Cai W, Xue H, Chen X** (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *17*: 2204–2216
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681–97
- Weijers D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jürgens G** (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* **24**: 1874–1885
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Onckelen H Van, Schmulling T** (2003) Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell* **15**: 2532–2550
- Willemsen V, Friml J, Grebe M, Toorn A Van Den, Palme K, Scheres B** (2003) Cell Polarity and PIN Protein Positioning in Arabidopsis Require STEROL METHYLTRANSFERASE1 Function. *15*: 612–625
- Win J, Chaparro-Garcia a, Belhaj K, Saunders DGO, Yoshida K, Dong S, Schornack S, Zipfel C, Robatzek S, Hogenhout S a, et al** (2012) Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **77**: 235–47
- Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao Y** (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18518–18523
- Wright DP, Johansson T, Quéré A Le, Söderström B, Tunlid A** (2005) Spatial patterns of gene expression in the extramatrical mycelium and mycorrhizal root tips formed by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in association with birch (*Betula pendula*) seedlings in soil microcosms. *New Phytol* **167**: 579–596
- Wu G, Lewis DR, Spalding EP** (2007) Mutations in Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* **19**: 1826–37
- Xu G, Fan X, Miller AJ** (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 153–82
- 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**: 660–4
- Yamamoto Y, Kamiya N, Morinaka Y, Matsuoka M, Sazuka T** (2007) Auxin Biosynthesis by the YUCCA Genes in Rice. *Plant Physiol* **143**: 1362–1371
- Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP, Nielsen E** (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol* **16**: 1123–7
- Zazimalová E, Murphy AS, Yang H, Hoyerová K, Hosek P** (2010) Auxin transporters--why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: 1–14
- Zhang J, Nodzynski T, Pencík A, Rolcík J, Friml J** (2010a) PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 918–22
- Zhang Z, Ogawa M, Fleet CM, Zentella R, Hu J, Heo J** (2010b) SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 2160–2165
- Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* **16**: 3100–3112
- Zimmer W, Wesche M, Timmermans L** (1998) Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Curr Microbiol* **36**: 327–331

Contrôle de l'auxine dans les modifications du développement racinaire du peuplier en réponse au champignon ectomycorhizien, *Laccaria bicolor*

Le système racinaire des arbres peut établir des symbioses ectomycorhiziennes (ECM) avec des champignons rhizosphériques. La mise en place de la symbiose est accompagnée d'une stimulation de la formation des racines latérales (RLs), et d'une modification de la croissance racinaire. Ces processus développementaux conduisent à la formation de racines courtes typiques des ECMs. Il a été montré que l'auxine est une phytohormone clef dans la formation des RLs ainsi que dans la croissance racinaire. Notre projet s'est focalisé sur l'étude de la régulation des voies de l'auxine dans la racine de peuplier en réponse à *L. bicolor*.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un arrêt de croissance des RLs et des racines adventives du peuplier *Populus tremula* x *P. alba*, après deux semaines de co-culture avec *L. bicolor*. De plus, nous avons aussi montré que cet arrêt n'est pas conditionné par la présence du réseau de Hartig. Une analyse de l'expression globale des gènes de peuplier dans la mycorhize a été réalisée au cours de la formation de la mycorhize. Cette analyse, couplée à des observations du gradient auxinique *via* le patron d'expression du promoteur DR5, montre que la signalisation auxinique est affectée dans l'organe symbiotique. La quantification de l'auxine (acide indole 3-acétique, AIA) et des métabolites associés a permis de mettre en évidence un environnement symbiotique riche en auxine dans la mycorhize, qui pourrait expliquer les modifications de la signalisation auxinique. De plus, un changement de la conjugaison et de la dégradation de l'AIA est détecté dans la racine, ainsi qu'une dégradation de l'AIA dans les hyphes de *L. bicolor*.

En parallèle, une analyse fonctionnelle de PtaPIN9, un orthologue de AtPIN2, responsable du transport basipète de l'auxine à l'apex racinaire chez *Arabidopsis thaliana*, a été réalisée au cours de la mycorhization avec *L. bicolor*. L'immunolocalisation de PtaPIN9 dans les racines de peuplier a montré une localisation similaire à AtPIN2, dans les cellules épidermiques. Les lignées transgéniques ayant une modification de l'expression de ce gène ne répondent pas à *L. bicolor* en terme de stimulation de RLs. Dans les racines mycorhizées, PtaPIN9 n'est plus observée, mais les modifications de l'expression de *PtaPIN9* ne modifient ni l'arrêt de croissance racinaire, ni la formation du réseau de Hartig.

Ces résultats montrent des modifications majeures des voies de l'auxine du peuplier par le champignon symbiotique *L. bicolor*. Cette étude ouvre des perspectives sur la compréhension du rôle de l'auxine dans le développement racinaire ainsi que dans le contexte des interactions plantes-microorganismes.

Mots-clés : Architecture racinaire, Auxine, Mycorhize, Racines latérales, croissance racinaire, Peuplier, *Laccaria bicolor*

Auxin control in poplar root development in response to the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*

Root systems of host trees are known to establish the ectomycorrhizal (ECM) symbiosis with rhizospheric fungi. This mutualistic association leads to modifications of root development that including a stimulation of lateral host roots, and a modification in root growth. The phytohormone auxin (Indole-3-acetic acid, IAA) is known to regulate LRs formation and root growth. Our research focussed on auxin pathways in poplar root in response to *L. bicolor*.

In this study, our data showed that the poplar-*Laccaria bicolor* interaction leads to the arrest of LRs and adventitious root growth after two weeks of interaction. We also showed that this arrest is not regulated by the Hartig net. Differential auxin responses were analyzed by using an auxin-responsive *DR5::GUS* marker line and revealed a loss of auxin response in ECM roots. An oligoarray-based transcript profiling of poplar roots in contact with *L. bicolor* highlights a differential expression of auxin associated genes in ECM. Measurement of auxin metabolite in ECM and in the free living partners revealed an IAA accumulation, an activation of the IPyA (Indol-3-Pyruvic Acid) dependant IAA biosynthesis pathway in both partners, as well as changes in IAA conjugation pathways in poplar and in IAA degradation pathways in *L. bicolor*. Our findings illustrate the impact of *L. bicolor* colonization on root auxin metabolism and response, and also suggest a role of auxin as a signal in the formation of ECM and in the regulation of ECM function.

In parallel, PtaPIN9 function analysis in response to *L. bicolor* has been performed. PtaPIN9 immunolocalization in poplar roots showed similar localization to AtPIN2 in epidermis cells. Transgenic lines having a modification in *PtaPIN9* expression, did not formed new LRs in respond to *L. bicolor*. In ECM roots, the loss of PtaPIN9 signal is observed but modifications of *PtaPIN9* expression did not modify the root growth arrest and the Hartig net formation.

These results show major changes in auxin associate pathways in poplar root by the symbiotic fungus *L. bicolor*, during the formation of the mycorrhiza root. Our results offer perspectives on the role of auxin in root development and in the context plants-microbes interactions.

Keywords: Root architecture, Auxin, Mycorrhiza, Lateral root, Root growth, Poplar, *Laccaria bicolor*